



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118126157 A

(43) 申请公布日 2024.06.04

(21) 申请号 202410297683.5

(22) 申请日 2018.08.03

(30) 优先权数据

62/540692 2017.08.03 US

62/616733 2018.01.12 US

(62) 分案原申请数据

201880064079.0 2018.08.03

(71) 申请人 美国安进公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 K·M·K·Z·阿利

N·J·阿拉瓦尔 G·肯南

I·富尔茨 Z·王 D·贝茨

M·莫克 S·塔克纳卡

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 罗文锋 彭昶

(51) Int.Cl.

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书102页

序列表(电子公布) 附图33页

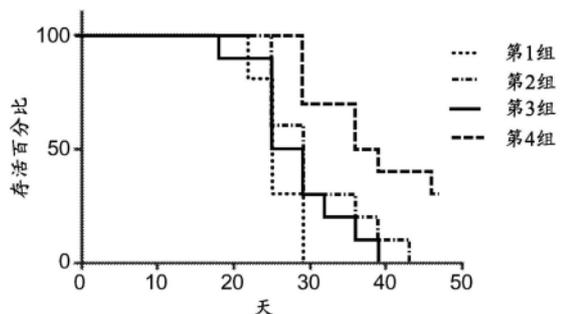
(54) 发明名称

白介素-21突变蛋白和治疗方法

(57) 摘要

本发明涉及白介素-21突变蛋白和治疗方法。本文提供用于在治疗疾病的方法中使用的IL-21突变蛋白和包含其的融合蛋白。本文还提供相关结合物、核酸、载体、宿主细胞、药物组合物和试剂盒。本披露内容提供制造这些IL-21突变蛋白和包含其的融合蛋白的方法,以及治疗有需要的受试者的方法。进一步提供PD-1抗原结合蛋白。

存活比例



同种型对比IL-21, p=ns, 0.1269
同种型对比αPD-1 mAb, p=0.0408
同种型组合, p=0.0002
αPD-1 mAb 对比组合, p=0.0143
IL-21 对比组合, p=0.0047

1. 一种IL-21突变蛋白,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,
 QGQDX HMXXM XXXXX XVDXL KNXVN DLVPE FLPAPEDVET NCEWS AFSCF QKAQL KSANT
 GNNEX XIXXX XXXLXXXXXX TNAGR RQKHR LTCPS CDSYE KKPPK EFLXX FXXLLXXMXX QHXSS
 RTHGS EDS(SEQ ID NO:2),

其中“X”表示任何氨基酸,且

其中所述IL-21突变蛋白氨基酸序列与人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)差异至少1个氨基酸;

其中所述差异出现在SEQ ID NO:2的氨基酸5、9、73和/或76处。

2. 如权利要求1所述的IL-21突变蛋白,其包含与人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)差异1个或2个氨基酸的氨基酸序列。

3. 如权利要求1或2所述的IL-21突变蛋白,其包含相对于人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)具有一个氨基酸取代的氨基酸序列。

4. 如权利要求3所述的IL-21突变蛋白,其包含的氨基酸取代:

- a. 在SEQ ID NO:1的位置5、9、73或76处,其中取代氨基酸为脂肪族氨基酸;
- b. 在SEQ ID NO:1的位置5、9、73或76处,其中取代氨基酸为酸性氨基酸;
- c. 在SEQ ID NO:1的位置5、9、73或76处,其中取代氨基酸为碱性氨基酸;
- d. 在SEQ ID NO:1的位置5、9或76处,其中取代氨基酸为芳族氨基酸;
- e. 在SEQ ID NO:1的位置5、9、73或76处,其中取代氨基酸为包含侧链酰胺的氨基酸;
- f. 在SEQ ID NO:1的位置5、9、73或76处,其中取代氨基酸为包含侧链羟基的非芳族氨基酸;
- g. 在SEQ ID NO:1的位置73或76处,其中取代氨基酸为亚氨基酸;
- h. 在SEQ ID NO:1的位置5、9或76处,其中取代氨基酸为包含含硫侧链的氨基酸;或
- i. 或其组合。

5. 如权利要求3所述的IL-21突变蛋白,其包含氨基酸位于根据下表的位置处的氨基酸取代:

SEQ ID NO: 1 的 氨基酸位置	氨基酸 (按单字母代码)
5	A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、S、 T、V 或 Y
9	A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、S、 T、V 或 Y
73	A、D、E、G、H、I、N、P、Q、S 或 V
76	A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、 S、T、V 或 Y

6. 如权利要求1所述的IL-21突变蛋白,其中所述IL-21突变蛋白包含SEQ ID NO:73-87、94-108、145-155和159-174的任一个的氨基酸序列。

7. 如权利要求1或2所述的IL-21突变蛋白,其包含相对于人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)具有两个氨基酸取代的氨基酸序列,其中这些氨基酸取代出现在SEQ ID NO:1的

位置5、9、73和76中的两个处。

8. 如权利要求7所述的IL-21突变蛋白,其中这些取代中的一个出现在SEQ ID NO:1的位置76处;任选地其中在SEQ ID NO:1的位置76处的取代氨基酸为脂肪族氨基酸或酸性氨基酸。

9. 如权利要求7或8所述的IL-21突变蛋白,其包含:

(a) 在SEQ ID NO:1的位置5、9或73处的氨基酸取代,其中取代氨基酸为脂肪族氨基酸或酸性氨基酸;或

(b) 在SEQ ID NO:1的位置5处的氨基酸取代,其中取代氨基酸为具有侧链酰胺的氨基酸;

任选地其中:

(i) 该脂肪族氨基酸为丙氨酸;

(ii) 该酸性氨基酸为谷氨酸;和/或

(iii) 该具有侧链酰胺的氨基酸为谷氨酰胺。

10. 如权利要求7所述的IL-21突变蛋白,其中所述IL-21突变蛋白包含选自由SEQ ID NO:208、210、211、216、222、224、225和233-245组成的组的氨基酸序列。

11. 一种IL-21突变蛋白,其包含SEQ ID NO:244的氨基酸序列。

12. 如前述权利要求中任一项所述的IL-21突变蛋白:

(a) 其中该IL-21突变蛋白以相对于野生型IL-21对IL-21受体的亲和力有所降低的亲和力结合IL-21受体;和/或

(b) 其结合IL-21受体 α 链,其中所述IL-21受体 α 链包含SEQ ID NO:256的氨基酸序列;和/或

(c) 其结合IL-21受体 γ 链,其中所述IL-21受体 γ 链包含SEQ ID NO:257的氨基酸序列;和/或

(d) 其以大于或等于约0.04nM的Kd结合人类IL-21受体。

13. 一种结合物,其包含:

如前述权利要求中任一项所述的IL-21突变蛋白,和
异源部分。

14. 如权利要求13所述的结合物,其中该IL-21突变蛋白:

(a) 直接附接于该异源部分;或

(b) 经由接头附接于该异源部分;任选地其中该接头包含肽;任选地其中该肽包含Gly-Gly-Gly-Ser的氨基酸序列(SEQ ID NO:262)。

15. 如权利要求13或14所述的结合物,其中该异源部分为:

(a) 多肽;

(b) 抗原结合蛋白;或

(c) 抗体。

16. 如权利要求13至15所述的结合物,其中:

(a) 该IL-21突变蛋白直接附接于该抗体的Fc或经由接头附接于该抗体的Fc;和/或

(b) 这些抗体重链包含电荷对突变。

17. 如权利要求15或16所述的结合物,其中所述结合物:

(a) 包含单一IL-21突变蛋白,其中所述单一IL-21突变蛋白连接于两个抗体重链中的一个的C端;或

(b) 包含两个IL-21突变蛋白,其中第一IL-21突变蛋白连接于第一抗体重链的C端,且第二IL-21突变蛋白连接于第二抗体重链的C端;其中所述第一IL-21突变蛋白:

(i) 具有与所述第二IL-21突变蛋白相同的氨基酸序列;或

(ii) 具有与所述第二IL-21突变蛋白不同的氨基酸序列。

18. 一种融合多肽或融合蛋白,其包含如权利要求1至12中任一项所述的IL-21突变蛋白、和异源多肽或异源肽;任选地其中所述异源多肽或异源肽包含免疫球蛋白或其抗原结合抗体片段。

19. 一种核酸,其编码如权利要求1至12中任一项所述的IL-21突变蛋白;或一种载体,其包含所述核酸;或一种宿主细胞,其包含所述核酸或所述载体。

20. 一种试剂盒,其包含如前述权利要求中任一项所述的IL-21突变蛋白、核酸、载体、宿主细胞、结合物、融合多肽或融合蛋白或其组合和容器。

21. 一种药物组合物,其包含如前述权利要求中任一项所述的IL-21突变蛋白、核酸、载体、宿主细胞、结合物、融合多肽或融合蛋白或其组合和药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂。

22. 一种制造IL-21突变蛋白的方法,其包括培养如权利要求19所述的宿主细胞以表达该IL-21突变蛋白以及收获所表达的IL-21突变蛋白。

23. 如权利要求21所述的药物组合物,其用于治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括以有效治疗该受试者的量向该受试者施用所述药物组合物;

任选地其中该受试者具有实体瘤且该药物组合物是以有效治疗该受试者的该实体瘤的量施用至该受试者。

白介素-21突变蛋白和治疗方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本文根据35U.S.C. §119 (e) 要求2017年8月3日提交的美国临时专利申请号62/540,692的权益和2018年1月12日提交的美国临时专利申请号62/616,733的权益,且其披露内容通过引用特此并入本文。

[0003] 通过引用并入以电子方式提交的材料

[0004] 通过引用以其全文并入与本文同时提交的计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表,并且标识如下:名称为“51633_Seqlisting.txt”的975,000字节ASCII(文本)文件,创建于2018年7月25日。

背景技术

[0005] PD-1/PD-L1轴与癌症中T细胞免疫反应的抑制有关。已在临床上在许多实体瘤适应症中证实此路径的拮抗剂。纳武单抗(Nivolumab)和派姆单抗(pembrolizumab)是靶向PD-1路径的两种此类抑制剂,且每种已经获得美国食品与药物管理局(U.S. Food and Drug Administration, FDA)批准用于治疗转移性黑色素瘤。近来,研究人员已在其他肿瘤类型背景下测试检查点抑制的范例。虽然已获得一些进展,但检查点抑制疗法仍然处在其他癌症治疗选择的阴影中。

[0006] 有关检查点抑制剂与其他药剂组合的研究正在进行中或近来已完成。举例而言,在III期临床试验中对患有不可切除的III期或IV期黑色素瘤的患者测试纳武单抗与伊匹单抗(ipilimumab)(一种CTLA-4受体阻断抗体)的组合。在此项研究中,在接受纳武单抗与伊匹单抗的组合的患者中实现完全缓解的患者的百分比最高,打败在接受任一单独药物的组中的患者所展现的结果。当前还正在探索其他组合。

[0007] 白介素-21(IL-21)是调节先天性与适应性免疫细胞的活性的T细胞衍生多效性细胞因子。IL-21可加强T细胞存活和效应功能。因为其在抗肿瘤和抗病毒反应中起关键作用,所以除对导致自体免疫性疾病和炎性疾病发生的炎性反应发挥重大作用以外,IL-21已成为若干疗法的有吸引力的靶标。

[0008] 但是,基于IL-21的疗法的研发是复杂的。显示增强,或令人困惑地,抑制IL-21作用引起治疗作用的研究使得研究复杂化。由于IL-21受体(IL-21R)广泛表达,所以存在另外的挑战。IL-21R不仅在T细胞上表达,且还在B细胞、NK细胞和骨髓细胞上表达。因此,必须小心地限制白血球中广泛的IL-21活化且避免毒性可能性。对IL-21信号传导的限制必须是平衡且具有选择性的。触发IL-21的作用必须设计成在适当时候和地方进行。

[0009] 实际上,利用IL-21部分作为单一疗法或与检查点抑制剂组合未获得任何成功,尤其是临床上的成功。因此,仍然需要利用IL-21的治疗模式,包括将IL-21部分与检查点抑制剂组合的模式。还仍然需要与免疫检查点抑制组合的IL-21疗法。

发明内容

[0010] 本披露内容提供包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的IL-21突变蛋白,其中SEQ ID

NO:2为

[0011] QGQDX HMXXM XXXXX XVDXL KNXVN DLVPE FLPAPEDVET NCEWS AFSCF QKAQL KSANT GNNEX XIXXX XXXLXXXXXX TNAGR RQKHR LTCPS CDSYE KKPPK EFLXX FXXLLXXMXX QHXSS RTHGS EDS (SEQ ID NO:2), 且X为任何氨基酸, 且其中该IL-21突变蛋白氨基酸序列与人类IL-21的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 差异至少1个氨基酸。

[0012] 因此, 在一个方面中, 本披露内容还提供相对于在本文中SEQ ID NO:1提供的野生型IL-21氨基酸序列仅仅包含一个氨基酸取代的IL-21突变蛋白。在示例性方面中, 氨基酸取代位于选自由以下组成的组的氨基酸位置处: 根据SEQ ID NO:1的氨基酸位置编号, 5、8、9、11、12、13、14、15、16、19、23、65、66、68、69、70、72、73、75、76、77、78、79、80、109、110、112、113、116、117、119、120或123。

[0013] 本披露内容进一步提供相对于SEQ ID NO:1仅仅包含两个氨基酸取代的IL-21突变蛋白。在示例性方面中, 氨基酸取代位于选自由以下组成的组的两个氨基酸位置处: 根据SEQ ID NO:1的氨基酸位置编号, 5、9、15、70、71、72、73和76。

[0014] 在示例性实施例中, IL-21突变蛋白以相对于野生型IL-21对IL-21受体的亲和力有所降低的亲和力结合IL-21受体 (IL-21R)。在示例性方面中, IL-21突变蛋白以大于或等于约0.04nM的 K_D 结合人类IL-21R。在示例性方面中, IL-21突变蛋白以大于或等于约0.055nM的 K_D 结合食蟹猕猴IL-21R。

[0015] 本披露内容还提供包含与异源部分连接的本披露内容的IL-21突变蛋白的结合物。在示例性方面中, 异源部分为多肽, 从而使得结合物为融合蛋白。因此, 本披露内容提供包含本披露内容的IL-21突变蛋白的融合蛋白。在示例性方面中, 融合蛋白包含与诸如抗体或其抗原结合抗体片段的抗原结合蛋白连接的本披露内容的IL-21突变蛋白。

[0016] 在特定实施例中, 融合蛋白包含与本披露内容的PD-1抗原结合蛋白 (例如PD-1抗原结合抗体) 连接的IL-21突变蛋白。

[0017] 本披露内容还提供PD-1抗原结合蛋白和包含PD-1抗原结合蛋白的结合物和融合蛋白。

[0018] 本披露内容进一步提供包含编码本披露内容的IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白 (例如PD-1抗原结合抗体) 或包含IL-21突变蛋白和PD-1抗原结合蛋白 (例如PD-1抗原结合抗体) 的融合蛋白的核苷酸序列的核酸。在示例性方面中, 核酸分子包含编码本披露内容的结合物或融合蛋白的核苷酸序列。此外, 本文提供包含本披露内容的核酸的载体和包含本披露内容的核酸的宿主细胞。

[0019] 本披露内容另外提供包含本披露内容的IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白 (例如PD-1抗原结合抗体)、结合物、融合蛋白 (例如包含IL-21突变蛋白和PD-1抗原结合蛋白 (例如PD-1抗原结合抗体) 的融合蛋白)、核酸、载体或宿主细胞或其组合的试剂盒。

[0020] 本文提供包含本披露内容的IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白 (例如PD-1抗原结合抗体)、结合物、融合蛋白 (例如包含IL-21突变蛋白和PD-1抗原结合蛋白 (例如PD-1抗原结合抗体) 的融合蛋白)、核酸、载体或宿主细胞或其组合的药物组合物。

[0021] 本文提供制造IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白 (例如PD-1抗原结合抗体) 和包含IL-21突变蛋白和PD-1抗原结合蛋白 (例如PD-1抗原结合抗体) 的融合蛋白的方法。在示例性实施例中, 该方法包括培养本披露内容的宿主细胞以表达IL-21突变蛋白、PD-1抗原结

合蛋白(例如PD-1抗原结合抗体)或包含IL-21突变蛋白和PD-1抗原结合蛋白(例如PD-1抗原结合抗体)的融合蛋白,且收获所表达的IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白(例如PD-1抗原结合抗体)或包含IL-21突变蛋白和PD-1抗原结合蛋白(例如PD-1抗原结合抗体)的融合蛋白。

[0022] 本披露内容另外提供治疗方法。在示例性实施例中,该方法为一种治疗有需要的受试者的方法,其包括向有需要的受试者施用有效治疗受试者的量的本披露内容的药物组合物。在示例性方面中,受试者具有肿瘤(例如实体瘤、血液系统恶性肿瘤或淋巴类恶性肿瘤)且向该受试者施用有效治疗受试者的肿瘤的量的药物组合物。在其他示例性方面中,肿瘤为非小细胞肺癌(NSCLC)(例如III期或IV期NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、头颈部癌、肾癌、乳癌、黑色素瘤、卵巢癌、肝癌、胰脏癌、结肠癌、前列腺癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞癌、具有高微卫星不稳定性的癌症(即高MSI癌症)、淋巴瘤或白血病。

附图说明

[0023] 图1A表示植入CT26/3E5结肠癌细胞的BALB/c小鼠的肿瘤体积(mm^3)作为时间(天)的函数的图。在第12天,测量肿瘤,且在第12天、第15天和第18天,向小鼠腹膜内(IP)注射300 μg 同种型对照抗体(mIgG1)。

[0024] 图1B表示植入CT26/3E5结肠癌细胞的BALB/c小鼠的肿瘤体积(mm^3)作为时间(天)的函数的图。在第12天,测量肿瘤,且在第12天、第15天和第18天,向小鼠IP注射300 μg 抗PD-1抗体。

[0025] 图1C表示植入CT26/3E5结肠癌细胞的BALB/c小鼠的肿瘤体积(mm^3)作为时间(天)的函数的图。在第12天,测量肿瘤,且每周给予小鼠50 μg 重组鼠科IL-21(rmIL-21)三次,历时3周。在第33天结束给药。

[0026] 图1D表示植入CT26/3E5结肠癌细胞的BALB/c小鼠的肿瘤体积(mm^3)作为时间(天)的函数的图。在第12天,测量肿瘤,且在第12天、第15天和第18天,给予小鼠300 μg 抗PD-1抗体,且每周给予50 μg rmIL-21三次,历时3周。在第33天结束给药。

[0027] 图2表示植入CT26/3E5结肠癌细胞的四组BALB/c小鼠的存活百分比的图。在第12天、第15天和第18天,向第1组小鼠腹膜内(IP)注射300 μg 同种型对照抗体(mIgG1)。在第12天、第15天和第18天,向第2组小鼠IP注射300 μg 抗PD-1抗体。每周给予第3组小鼠50 μg rmIL-21三次,历时3周。在第12天、第15天和第18天,给予第4组小鼠300 μg 抗PD-1抗体,且每周给予50 μg rmIL-21三次,历时3周。与单一疗法rmIL-21或抗PD-1相比,施用抗PD-1与rmIL-21的组合显著延长存活。

[0028] 图3示出包含与IL-21突变蛋白融合的阻断PD-1抗体的融合蛋白($\alpha\text{PD-1}$:IL-21突变蛋白)的作用机制的假设。不受特定理论束缚,据信该融合物结合CD8+T细胞上的IL-21R,同时阻断PD-1与PD-L1之间的信号转导。

[0029] 图4A示出包含与IL-21突变蛋白同源二聚体融合的抗PD-1抗体的融合蛋白。该融合蛋白无接头。该抗体可包含减少或消除Fc相关的效应结合和功能(例如缺乏与Fc γ 受体(例如SEFL2-2)相互作用的能力)的恒定区。

[0030] 图4B示出包含与IL-21突变蛋白同源二聚体融合的抗PD-1抗体的融合蛋白。该融合蛋白可在抗体的重链恒定区与IL-21突变蛋白之间包含GGGGS(G4S)接头。抗体还可包含

SEFL2-2修饰。

[0031] 图4C示出包含与IL-21突变蛋白单体融合的抗PD-1抗体的融合蛋白。该融合蛋白可在抗体的重链恒定区与IL-21突变蛋白之间包含G4S接头。抗体重链包含电荷对突变(cpm;例如V1、V4、V103或V131)以帮助异源二聚体Fc区优先缔合。抗体还可包含SEFL2-2修饰。

[0032] 图5A表示暴露于以下的PD-1^{-ve} Hut78 T细胞中STAT3信号传导的图:(i)单独重组人类IL-21(rhIL-21)(具有实心圆的实线);(ii)单独抗PD-1 mAb(具有实心菱形的实线);(iii)在无接头下与IL-21同源二聚体融合的抗PD-1 mAb(具有实心三角形的实线);(iv)在接头下与IL-21同源二聚体融合的抗PD-1 mAb(具有空心三角形的虚线);(v)在无接头下与IL-21单体融合的抗PD-1 mAb(具有实心正方形的实线);或(vi)在接头下与IL-21单体融合的抗PD-1 mAb(具有空心正方形的虚线)。

[0033] 图5B表示暴露于以下的PD-1^{+ve} Hut78 T细胞中STAT3信号传导的图:(i)单独重组人类IL-21(rhIL-21)(具有实心圆的实线);(ii)单独抗PD-1 mAb(具有实心菱形的实线);(iii)在无接头下与IL-21同源二聚体融合的抗PD-1 mAb(具有实心三角形的实线);(iv)在接头下与IL-21同源二聚体融合的抗PD-1 mAb(具有空心三角形的虚线);(v)在无接头下与IL-21单体融合的抗PD-1 mAb(具有实心正方形的实线);或(vi)在接头下与IL-21单体融合的抗PD-1 mAb(具有空心正方形的虚线)。

[0034] 图6表示以低剂量(250μg/kg)或高剂量(1000μg/kg)静脉内施用于6只动物的包含与抗PD-1 mAb融合的WT IL-21的同源二聚体融合蛋白的血清浓度的图。IgG抗体结构域(150μg/kg)充当对照。

[0035] 图7表示暴露于对IL-21R α 的亲合力有所降低的IL-21突变蛋白的PD-1^{-ve} Hut78细胞(空心条)或PD-1^{+ve} Hut78细胞(实心条)的IL-21活性的减少倍数(相对于rhIL-21活性)的图。

[0036] 图8表示暴露于对IL-21R γ 的亲合力有所降低的IL-21突变蛋白的PD-1^{-ve} Hut78细胞(空心条)或PD-1^{+ve} Hut78细胞(实心条)的IL-21活性的减少倍数(相对于rhIL-21活性)的图。

[0037] 图9A表示在暴露于以下的PD-1^{-ve} Hut78 T细胞中STAT3信号传导的图:(i)单独重组人类IL-21(rhIL-21)(具有实心圆的实线);(ii)与WT IL-21同源二聚体融合的抗PD-1 mAb(具有空心圆的虚线);(iii)与WT IL-21单体融合的抗PD-1 mAb(具有实心圆的虚线);和(iv)与IL-21突变蛋白51同源二聚体(R65P)融合的抗PD-1 mAb(具有实心三角形的点线)。

[0038] 图9B表示在暴露于以下的PD-1^{+ve} Hut78 T细胞中STAT3信号传导的图:(i)单独重组人类IL-21(rhIL-21)(具有实心圆的实线);(ii)与WT IL-21同源二聚体融合的抗PD-1 mAb(具有空心圆的虚线);(iii)与WT IL-21单体融合的PD-1 mAb(具有实心圆的虚线);和(iv)与IL-21突变蛋白51同源二聚体(R65P)融合的抗PD-1 mAb(具有实心三角形的点线)。

[0039] 图10表示包含以下的融合蛋白的血清浓度的图:(i)与IL-21 R76E突变蛋白同源二聚体融合的抗PD-1 mAb(具有实心圆的点线);(ii)与IL-21 R76A突变蛋白同源二聚体融合的抗PD-1 mAb(具有实心三角形的虚线);(iii)与IL-21D15N突变蛋白同源二聚体融合的抗PD-1 mAb(具有X的虚线);(iv)抗PD-1抗体(8.25mg/kg;具有空心菱形的虚线);和(v)与

WT IL-21突变蛋白同源二聚体融合的抗PD-1 mAb(具有实心正方形的实线)。

[0040] 图11表示通过混合淋巴细胞反应的细胞分泌的IL-2(pg/mL)作为以下各项中的抗体浓度的函数的图:(i)抗PD-1抗体(具有实心圆的实线);(ii)包含IL-21 R5Q/R76E双重突变蛋白同源二聚体的融合蛋白(具有空心圆的虚线);(iii)抗PD-1 mAb与rhIL-21的组合(具有空心正方形的点线);(iv)包含IL-21 R76E单一突变蛋白同源二聚体的融合蛋白(实心正方形);(v)IgG对照物(具有空心菱形的点线)和(vi)rhIL-21(具有空心三角形的折线)。

[0041] 图12A表示暴露于以下的细胞的STAT3活性的相对平均荧光强度(MFI)的变化倍数的图:(i)包含IL-21 R5E/R76A双重突变蛋白的融合蛋白(具有空心三角形的线);(ii)IgG1对照物(具有实心菱形的点线);(iii)rhIL-21(具有空心正方形的虚线);(iv)抗PD-1 mAb(具有空心椭圆形的实线);(v)rhIL-21与抗PD-1 mAb的组合(具有实心椭圆形的虚线);或(vi)包含IL-21 R76E单一突变蛋白的融合蛋白(具有空心菱形的线)。

[0042] 图12B表示暴露于以下的细胞的STAT3活性的相对MFI的变化倍数的图:(i)包含IL-21 R5Q/R76E双重突变蛋白的融合蛋白(具有空心三角形的线);(ii)IgG1对照物(具有实心菱形的点线);(iii)rhIL-21(具有空心正方形的虚线);(iv)抗PD-1 mAb(具有空心椭圆形的实线);(v)rhIL-21与抗PD-1 mAb的组合(具有实心椭圆形的虚线);或(vi)包含IL-21 R76E单一突变蛋白的融合蛋白(具有空心菱形的线)。

[0043] 图12C表示暴露于以下的细胞的STAT3活性的相对MFI的变化倍数的图:(i)包含IL-21R9E/R76A双重突变蛋白的融合蛋白(具有空心三角形的线);(ii)IgG1对照物(具有实心菱形的点线);(iii)rhIL-21(具有空心正方形的虚线);(iv)抗PD-1 mAb(具有空心椭圆形的实线);(v)rhIL-21与抗PD-1 mAb的组合(具有实心椭圆形的虚线);或(vi)包含IL-21 R76E单一突变蛋白的融合蛋白(具有空心菱形的线)。

[0044] 图13A表示通过暴露于以下的CTL的特异性溶解%(y轴)相对于效应:靶标细胞比率(x轴)的图:(i)rhIL-21(具有实心圆的实线);(ii)hIgG4对照抗体(具有空心圆的虚线);(iii)抗PD-1 mAb(具有实心三角形的虚线);(iv)rhIL-21与抗PD-1 mAb的组合(具有空心三角形的点线);或(v)包含IL-21 R5E/R76A的融合蛋白(具有X的折线)。

[0045] 图13B表示通过暴露于以下的CTL的特异性溶解%的图,表示通过暴露于以下的CTL的特异性溶解%的图:(i)rhIL-21(具有实心圆的实线);(ii)hIgG4对照抗体(具有空心圆的虚线);(iii)抗PD-1 mAb(具有实心三角形的虚线);(iv)rhIL-21与抗PD-1 mAb的组合(具有空心三角形的点线);或(v)包含IL-21 R5Q/R76E的融合蛋白(具有X的折线)。

[0046] 图13C表示通过暴露于以下的CTL的特异性溶解%的图:(i)rhIL-21(具有实心圆的实线);(ii)hIgG4对照抗体(具有空心圆的虚线);(iii)抗PD-1 mAb(具有实心三角形的虚线);(iv)rhIL-21与抗PD-1 mAb的组合(具有空心三角形的点线);或(v)包含IL-21 R9E/R76A的融合蛋白(具有X的折线)。

[0047] 图14表示以下各项的血清浓度:(i)抗PD-1 mAb(具有实心正方形的实线);(ii)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R5Q/R76E同源二聚体的融合蛋白(具有实心圆的实线);(iii)包含抗PD-1 mAb与IL-21 R76E同源二聚体的融合蛋白(实线);(iv)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R5E/R76A同源二聚体的融合蛋白(具有X的虚线);(v)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R76A同源二聚体的融合蛋白(具有实心菱形的虚线);或(vi)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R76E单体的融合

蛋白(具有实心三角形的实线)。

[0048] 图15A表示细胞取样(空心箭头)和施用(实心箭头)的时间线。

[0049] 图15B表示在给予一定剂量以下各项的动物中如在第7天所测量的PD-1⁺/CD4⁺细胞的变化倍数(相对于第-5天)的图:(i)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R76E突变蛋白的融合蛋白(具有水平线的条);(ii)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R76E单一突变蛋白单体的融合蛋白(具有垂直线的条);或(iii)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R5Q/R76E双重突变蛋白同源二聚体的融合蛋白(空心条)(各在第0天施用)。

[0050] 图15C表示在给予一定剂量以下各项的动物中如在第7天所测量的PD-1⁺/CD8⁺细胞的变化倍数(相对于第-5天)的图:(i)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R76E突变蛋白的融合蛋白(具有水平线的条);(ii)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R76E单一突变蛋白单体的融合蛋白(具有垂直线的条);或(iii)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R5Q/R76E双重突变蛋白同源二聚体的融合蛋白(空心条)(各在第0天施用)。

[0051] 图15D表示在给予第一剂量以下各项的动物中如在第21天所测量的PD-1⁺/CD8⁺细胞的变化倍数(相对于第-5天)的图:(i)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R76E突变蛋白的融合蛋白(具有水平线的条);(ii)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R76E单一突变蛋白单体的融合蛋白(具有垂直线的条);或(iii)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R5Q/R76E双重突变蛋白同源二聚体的融合蛋白(空心条)(第一剂量在第0天施用且第二剂量在第8天施用)。

[0052] 图16表示PD-1⁺/CD8⁺细胞的扩增(相对于第-5天)作为PD-1⁺/CD8⁺细胞上的PD-1受体占用率(R0)的函数的图。IL-21单一突变体(801、802、807和808)显示在蓝色圆内且IL-21双重突变体(803、804、805和806)显示在粉红色圆内。这些数据证明双重突变体的优良药代动力学特性允许更佳的靶标覆盖且与更佳的药效学反应相关,如通过PD-1+靶标群体的扩增所测量。蓝线指示单一突变体与双重突变体之间的总体描绘。

[0053] 图17表示用单一突变体同源二聚体构建体(动物801和802)、双重突变体同源二聚体构建体(动物803-806)或单一突变体单体构建体(动物807和808)处理的个别动物的流程图。PD-1⁺T细胞通过非竞争性或竞争性检测抗体检测。靶标覆盖百分比计算为竞争性与非竞争性PD-1抗体之间的比率百分比。数据显示所有构建体均在第21天重复给药之后显示稳固的靶标覆盖。

[0054] 图18A表示暴露于包含十种不同抗PD-1 mAb中的一种和IL-21 R5Q/R76E突变蛋白同源二聚体的融合蛋白的PD-1^{-ve} Hut78 T细胞的STAT3活性的变化倍数(相对于rhIL-21(具有圆形X的实线))的图。十种抗PD-1 mAb包括20A2.003(具有菱形的线)、20C1.006(红色正方形)、20C1.009(具有三角形的线)和22D4.006(具有空心圆形的线)。

[0055] 图18B表示暴露于包含十种不同抗PD-1 mAb中的一种和IL-21 R5Q/R76E突变蛋白同源二聚体的融合蛋白的PD-1^{+ve} Hut78 T细胞的STAT3活性的变化倍数(相对于rhIL-21(具有圆形X的实线))的图。十种抗PD-1 mAb包括20A2.003(具有菱形的线)、20C1.006(红色正方形)、20C1.009(具有三角形的线)和22D4.006(具有空心圆形的线)。图18A与图18B的比较指示pSTAT3信号传导需要PD-1靶向且当与不同抗PD-1 mAb融合时突变蛋白的活性相似。

[0056] 图19A表示暴露于包含七种不同抗PD-1 mAb中的一种和IL-21 R9E/R76A突变蛋白同源二聚体的融合蛋白的PD-1^{-ve} Hut78 T细胞的STAT3活性的变化倍数(相对于rhIL-21(具有圆形X的实线))的图。七种抗PD-1 mAb包括20A2.003(具有空心三角形的线)、

20C1.006 (具有空心正方形的线)、20C1.009 (具有空心菱形的线) 和22D4.006 (具有空心圆形的线)。

[0057] 图19B表示暴露于包含七种不同抗PD-1 mAb中的一种和IL-21 R9E/R76A突变蛋白同源二聚体的融合蛋白的PD-1^{+ve} Hut78 T细胞的STAT3活性的变化倍数 (相对于rhIL-21 (具有圆形X的实线)) 的图。图19A与图19B的比较指示pSTAT3信号传导需要PD-1靶向且当与不同抗PD-1 mAb融合时突变蛋白的活性相似。七种抗PD-1 mAb包括20A2.003 (具有空心三角形的线)、20C1.006 (具有空心正方形的线)、20C1.009 (具有空心菱形的线) 和22D4.006 (具有空心圆形的线)。

[0058] 图20A-20D表示在若干抗PD-1 mAb-IL-21单体或二聚双重突变蛋白融合物下观察到的pSTAT3信号传导的量。具有实心圆的实线 (图顶部) 为rhIL-21; 具有空心圆的虚线 (图底部) 为IgG1对照物; 具有X的线 (图底部) 为IgG2对照物; 具有实心正方形的点线 (图底部) 为用于IL-21突变蛋白融合物中的22D4.006抗PD-1 mAb (呈mAb存在; 即不呈融合物); 具有空心正方形的虚线和具有空心菱形的点线 (图底部) 为对照抗PD-1 mAb; 剩余线为抗PD-1 mAb (22D4.006) - IL-21单体或二聚双重突变蛋白融合物 (具有多种电荷对突变), 其中双重突变体为R5E/R76A; R9E/R76A; R5A/R76E或R5Q/R76E。rhIL-21在PD-1^{-ve}与PD-1^{+ve}细胞中显示活性, 单体和同二聚体双重突变蛋白融合物无法在PD-1^{-ve}细胞中显示pSTAT3 (基于IL-21) 活性, 且单体和同二聚体双重突变蛋白融合物能够在PD-1^{+ve}细胞中显示pSTAT3 (基于IL-21) 活性。因此, 具有IL-21双重突变体的单体融合物展现与其对应二聚融合物类似水平的在PD-1^{-ve}细胞中的IL-21活性减弱和PD-1^{+ve}细胞中的IL-21活性拯救。图20A和20B为PD-1^{-ve}细胞上pSTAT3测定的重复操作。图20C和20D为PD-1^{+ve}细胞上pSTAT3测定的重复操作。

[0059] 图21A-21D表示利用在图20A-20D中评估的相同抗PD-1 mAb (22D4.006) - IL-21单体或二聚双重突变蛋白融合物的PD-1报道基因测定 (RGA; 图21A和21B) 和MLR测定 (图21C和21D) 的结果。图21A-21D显示抗PD-1 mAb (22D4.006) - IL-21单体和二聚双重突变蛋白融合物能够诱导PD-1活性。具有实心圆的实线 (图底部) 为rhIL-21; 具有空心圆的线 (图底部) 为IgG1对照物; 具有X的线 (图底部) 为IgG2对照物; 具有实心正方形的点线 (图顶部) 为用于IL-21突变蛋白融合物中的22D4.006抗PD-1 mAb (呈mAb存在; 即不呈融合物); 具有空心正方形的虚线和具有空心菱形的点线 (图顶部) 为对照抗PD-1 mAb; 剩余线为抗PD-1 mAb-IL-21单体或二聚双重突变蛋白融合物。图21A和21B为PD-1 RGA测定的重复操作。图20C和20D为MLR测定的重复操作。

[0060] 图22A-22D表示测试与图20A-20D中的那些构建体相同的构建体的pSTAT3测定的结果, 不同之处在于抗PD-1 mAb-IL-21单体和二聚双重突变蛋白融合物中使用不同抗PD-1 mAb (20A2.003)。图22A-22D中的结果类似于图20A-20D中所见的结果。具有实心圆的实线 (图顶部) 为rhIL-21; 具有空心圆的虚线 (图底部) 为IgG1对照物; 具有X的线 (图底部) 为IgG2对照物; 具有实心正方形的点线 (图底部) 为用于IL-21突变蛋白融合物中的20A2.003抗PD-1 mAb (呈mAb存在; 即不呈融合物); 具有空心正方形的虚线和具有空心菱形的点线 (图底部) 为对照抗PD-1 mAb; 剩余线为抗PD-1 mAb (20A2.003) - IL-21单体或二聚双重突变蛋白融合物 (具有多种电荷对突变), 其中双重突变体为R5E/R76A; R9E/R76A; R5A/R76E或R5Q/R76E。图22A和22B为PD-1^{-ve}细胞上pSTAT3测定的重复操作。图22C和22D为PD-1^{+ve}细胞上pSTAT3测定的重复操作。

[0061] 图23A-23D表示测试与图21A-21D中的那些构建体相同的构建体的PD-1报道基因测定(图23A和23B)和MLR测定(图23C和23D)的结果,不同之处在于抗PD-1 mAb-IL-21单体和二聚双重突变蛋白融合物中使用不同抗PD-1 mAb(20A2.003)。图23A-23D中的结果类似于图21A-21D中所见的那些结果。具有实心圆的实线(图底部)为rhIL-21;具有空心圆的虚线(图底部)为IgG1对照物;具有X的线(图底部)为IgG2对照物;具有实心正方形的点线(图顶部)为用于IL-21突变蛋白融合物中的20A2.003抗PD-1 mAb(呈mAb存在;即不呈融合物);具有空心正方形的虚线和具有空心菱形的点线(图顶部)为对照抗PD-1 mAb;剩余线为抗PD-1 mAb(20A2.003)-IL-21单体或二聚双重突变蛋白融合物。图23A和23B为PD-1 RGA测定的重复操作。图23C和23D为MLR测定的重复操作。

[0062] 图24表示经纯化的抗PD-1抗体的NFAT/荧光素酶活性作为mAb浓度的函数的图。

[0063] 图25A为在暴露于融合蛋白[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)或抗PD-1抗体[22D4.017]后Ki67+/CD3+/CD4+细胞数目相对于基线的变化倍数的图。

[0064] 图25B为在暴露于融合蛋白[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)或抗PD-1抗体[22D4.017]后Ki67+/CD3+/CD8+细胞数目相对于基线的变化倍数的图。

[0065] 图25C为在暴露于融合蛋白[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)或抗PD-1抗体[22D4.017]后pSTAT3+/CD3+/CD4+细胞数目相对于基线的变化倍数的图。

[0066] 图25D为在暴露于融合蛋白[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)或抗PD-1抗体[22D4.017]后pSTAT3+/CD3+/CD8+细胞数目相对于基线的变化倍数的图。

[0067] 图25E为在暴露于融合蛋白[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)或抗PD-1抗体[22D4.017]后CD3+/CD4+细胞数目相对于基线的变化倍数的图。

[0068] 图25F为在暴露于融合蛋白[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)或抗PD-1抗体[22D4.017]后CD3+/CD8+细胞数目相对于基线的变化倍数的图。

[0069] 图25G为在暴露于融合蛋白[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)或抗PD-1抗体[22D4.017]后PD-1+/CD3+/CD4+细胞数目相对于基线的变化倍数的图。

[0070] 图25H为在暴露于融合蛋白[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)或抗PD-1抗体[22D4.017]后PD-1+/CD3+/C84+细胞数目相对于基线的变化倍数的图。

[0071] 图25I为在暴露于融合蛋白[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)或抗PD-1抗体[22D4.017]72小时后血清穿孔素的量相对于基线的变化倍数的图。

[0072] 图25J为在暴露于融合蛋白[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)或抗PD-1抗体[22D4.017]72小时后相对于基线的Ki67+细胞%作为穿孔素增加倍数的函数的图。

[0073] 图26A为吸光度(nm)作为时间(sec)的函数的图,其用于确定抗体22D4.017对人类PD-1抗原的指示 K_D 。

[0074] 图26B为吸光度(nm)作为时间(sec)的函数的图,其用于确定抗体20C1.009对人类PD-1抗原的指示 K_D 。

[0075] 图26C为吸光度(nm)作为时间(sec)的函数的图,其用于确定抗体20A2.003对人类PD-1抗原的指示 K_D 。

[0076] 图26D为吸光度(nm)作为时间(sec)的函数的图,其用于确定IgG1抗PD-1 mAb对人类PD-1抗原的指示 K_D 。

[0077] 图26E为吸光度(nm)作为时间(sec)的函数的图,其用于确定IgG4 PD-1 mAb对人

类PD-1抗原的指示 K_D 。

[0078] 图26F为吸光度 (nm) 作为时间 (sec) 的函数的图,其用于确定抗体22D4.017对食蟹猕猴PD-1抗原的指示 K_D 。

[0079] 图26G为吸光度 (nm) 作为时间 (sec) 的函数的图,其用于确定抗体20C1.009对食蟹猕猴PD-1抗原的指示 K_D 。

[0080] 图26H为吸光度 (nm) 作为时间 (sec) 的函数的图,其用于确定抗体20A2.003对食蟹猕猴PD-1抗原的指示 K_D 。

[0081] 图26I为吸光度 (nm) 作为时间 (sec) 的函数的图,其用于确定IgG1抗PD-1 mAb对食蟹猕猴PD-1抗原的指示 K_D 。

[0082] 图26J为吸光度 (nm) 作为时间 (sec) 的函数的图,其用于确定IgG4抗PD-1 mAb对食蟹猕猴PD-1抗原的指示 K_D 。

[0083] 图27为抗PD-1抗体22D4.017和20C1.009的 C_p (千卡/摩尔/°C) 作为温度函数的图。

[0084] 图28为抗PD-1抗体22D4.017和20C1.009的黏度针对剪切速率绘制的图。

[0085] 图29A-29D为一系列绘出以下中信号作为抗体浓度的函数的图:(图29A)PD-1阳性的变体Hut78 T细胞系;(图29B)TIGIT阳性的变体Hut78 T细胞系;(图29C)LAG3阳性的变体Hut78 T细胞系;和(图29D)不内源性表达PD-1、TIGIT或LAG3的亲本Hut78T细胞系。

具体实施方式

[0086] 仍然需要新颖的免疫增强方法,其可运用免疫系统以安全且有效的方式抵抗癌细胞,尤其根据以下事实:当前免疫疗法仅仅在少数患者中有效,且可能具有显著且常常不可预知的毒性。在一个方面中,新颖类别的包含可阻断PD-1/PD-L1相互作用的PD-1靶向抗体与本文披露的经工程化的亲和力减弱的白介素-21突变蛋白融合的双官能融合分子满足此需求。本文所述的抗体/细胞因子融合物克服与细胞因子治疗剂有关的重大障碍,尤其允许IL-21细胞因子以靶向PD-1的方式像抗体般给药和选择性递送。当与抗PD-1抗体融合时,IL-21突变蛋白可在体内选择性地活化且扩增表达PD-1的T细胞。因此,本文所述的抗体/细胞因子融合物可改善和延长当前处于临床测试中的抗PD-1治疗剂的效用。

[0087] 细胞因子与共抑制受体激动剂或拮抗剂的组合仍具有挑战性,因为存在增加毒性的风险且需要复杂的临床试验设计(参见例如Ott等人, *J Immunother Cancer [癌症免疫治疗杂志]* 5,16 (2017);和Hermel等人, *Cancer Metastasis Rev [癌症转移研究]* 36,43-50 (2017))。关于细胞因子,还可能活化抑制反馈路径,可能引起免疫抑制(参见例如Portielje等人, *Clin Cancer Res [临床癌症研究]* 9,76-83 (2003);Wan等人, *Immunity [免疫力]* 38,514-527 (2013);和Mooradian等人, *Oncoimmunology [肿瘤免疫学]* 7,e1423172 (2018))。白介素-21(IL-21)为一种I型细胞因子和常见细胞因子受体 γ 链(c γ 链)细胞因子家族的一员,其已显现为有前景的治疗癌症的免疫治疗剂。IL-21由活化CD4 T细胞和自然杀伤T(NKT)细胞产生,且通过由与常见 γ 链相关的离散IL-21受体(IL-21R)亚单元构成的异源二聚体受体复合物进行信号传导(参见例如Spolski等人, *Nat Rev Drug Discov [自然评论药物发现]* 13,379-395 (2014))。IL-21R复合物的活化引起JAK/STAT信号传导路径的活化。IL-21R广泛地在包括T和B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞和骨髓细胞的造血细胞中表达。虽然并非必需生长或分化因子,但IL-21为NK细胞和活化T细胞的有效丝裂原和存活因子。

IL-21可支持CD4(+)T辅助17(Th17)细胞以及滤泡辅助T细胞(Tfh)的分化且可对抗调节T细胞(Treg)分化。此外,IL-21可加强CD8 T细胞的存活,且保护不太活化但更持久的T细胞表型,此允许增强肿瘤和病毒控制。

[0088] 细胞因子免疫疗法中的一个挑战方面为除活化免疫细胞来加强免疫反应外,相同细胞因子还可活化逆调节路径。举例而言,IL-2和IFN γ 可分别活化保护性免疫反应以及调节T细胞反应和抑制路径(诸如PD-L1)。在树突状细胞(DC)中,IL-21可抑制DC成熟与活化,可诱导常规DC的细胞凋亡,可有力地抑制混合培养物中T细胞的激活,且可在耐受性的诱导中起作用。在人类中,IL-21已作为非靶向性游离细胞因子在若干癌症适应症中进行测试,但尽管存在有前景的临床前数据和早先I期临床数据,但此方法的发展尚未进展至比II期测试更远(参见例如Thompson等人,J Clin Oncol[临床肿瘤学杂志]26,2034-2039(2008);和Davis等人,Clin Cancer Res[临床癌症研究]15,2123-2129(2009))。在更近期的临床前模型中,重组IL-21细胞因子与共抑制受体拮抗剂(例如抗CTLA-4和抗PD-1)的组合已证明IL-21可延长这些治疗的功效。现在此类组合处于临床测试中,不过临床功效尚有待证实(Lewis等人,Oncoimmunology[肿瘤免疫学]7,e1377873(2017))。

[0089] 不受理论束缚,本文所述的抗体/细胞因子融合物经设计以利用IL-21的免疫增强活性(此对于解决毒性和脱靶免疫抑制而言为必要的)、最大化功效和提高临床中给药的可行性。

[0090] IL-21和IL-21突变蛋白

[0091] 白介素-21(IL-21)为由T细胞、B细胞、NK细胞和骨髓细胞表达的细胞因子,且调节先天性与适应性免疫细胞的活性且改善T细胞存活和效应功能。若干I期和II期临床试验包括IL-21作为研究用药品,用于治疗癌症、炎症性疾病和自体免疫性疾病,包括黑色素瘤、肾细胞癌、急性骨髓性白血病、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、卵巢癌、结肠直肠癌、全身性红斑狼疮、克罗恩氏病(Crohn's disease)和类风湿性关节炎。

[0092] IL-21具有四螺旋束结构且呈单体存在。在人类中,已知IL-21的两种异构体,各来源于前驱分子。第一IL-21异构体包含162个氨基酸(aa),其中开始29个氨基酸构成信号肽;且第二IL-21异构体包含153aa,其中如第一异构体中,开始29个氨基酸构成信号肽。第一和第二IL-21异构体的氨基酸序列(包括信号肽)在本文中分别以SEQ ID NO:258和SEQ ID NO:259提供。

[0093] IL-21结合T细胞、B细胞和NK细胞的表面上表达的异源二聚体IL-21受体(IL-21R)。IL-21R的结构与IL-2受体和IL-15受体类似,因为这些细胞因子受体中的每个均包含常见 γ 链(γ c)。除 γ c外,IL-21R包含对于结合IL-21而言重要的 α 链。人类IL-21受体 α 链存在两种异构体:异构体1和异构体2。异构体1和异构体2的氨基酸序列在本文中分别以SEQ ID NO:256和261提供。人类常见 γ 链的氨基酸序列在本文中SEQ ID NO:257提供。

[0094] 当IL-21结合IL-21R时,Jak/STAT信号传导路径经活化,从而活化的靶标基因。虽然诱导IL-21的信号传导为治疗学上所必需的,但考虑到IL-21的广泛表达概况和由于IL-21能够加强CD8 T细胞反应以及抑制抗原呈递和T细胞激活,需要谨慎考虑信号传导的时机和位置。本文中第一次呈现的数据支持使用小心设计的IL-21突变蛋白在适当时间和地方实现IL-21信号传导。

[0095] 本披露内容提供相对于在本文中SEQ ID NO:1提供的野生型IL-21氨基酸序列

包含至少一个氨基酸取代的IL-21突变蛋白。举例而言,IL-21突变蛋白包含至少一个且至多34个氨基酸取代。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含至少一个且至多X个氨基酸取代,其中X为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33或34。在示例性实施例中,IL-21突变蛋白包含与人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)差异不超过10个氨基酸、15个氨基酸、20个氨基酸或25个氨基酸的氨基酸序列。在示例性实施例中,IL-21突变蛋白包含与人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)差异不超过7个氨基酸或至多5个氨基酸的氨基酸序列。在示例性实施例中,IL-21突变蛋白包含与人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)差异3个、4个、5个或6个氨基酸的氨基酸序列。在示例性实施例中,IL-21突变蛋白包含与人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)差异3至6个氨基酸或1至5个氨基酸的氨基酸序列。在示例性实施例中,IL-21突变蛋白包含与人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)差异一个或两个氨基酸的氨基酸序列。

[0096] 在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:2为

[0097] QGQDX HMXXM XXXXX XVDXL KNXVN DLVPE FLPAPEDVET NCEWS AFSCF QKAQL KSANT GNNEX XIXXX XXXLXXXXXX TNAGR RQKHR LTCPS CDSYE KKPPK EFLXX FXXLLXXMXX QHXSS RTHGS EDS (SEQ ID NO:2),其中X表示任何氨基酸,且其中该IL-21突变蛋白氨基酸序列与人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)差异至少1个氨基酸。

[0098] 因此,在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含SEQ ID NO:2的序列,其中SEQ ID NO:2与SEQ ID NO:1差异在于在SEQ ID NO:2中由X表示的位置处的至少一个氨基酸。在示例性方面中,包含SEQ ID NO:2的IL-21突变蛋白与SEQ ID NO:1具有至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含与SEQ ID NO:1具有至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。

[0099] 在示例性实施例中,IL-21突变蛋白包含相对于野生型IL-21氨基酸序列包含至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,且氨基酸取代出现在氨基酸序列的N端半部内。举例而言,氨基酸取代出现在根据SEQ ID NO:1的氨基酸位置编号位置5-25或8-23(包括端点)内。

[0100] 在示例性实施例中,IL-21突变蛋白包含相对于野生型IL-21氨基酸序列包含至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,且氨基酸取代出现在氨基酸序列的C端半部内。举例而言,氨基酸取代出现在根据SEQ ID NO:1的氨基酸位置编号位置100-133或109-123(包括端点)内。

[0101] 在示例性实施例中,IL-21突变蛋白包含相对于野生型IL-21氨基酸序列包含至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,且氨基酸取代出现在氨基酸序列的中间三分之一内。举例而言,氨基酸取代出现在根据SEQ ID NO:1的氨基酸位置编号位置55-85或65-80(包括端点)内。

[0102] 本披露内容还提供相对于在本文中以SEQ ID NO:1提供的野生型IL-21氨基酸序列包含仅仅一个氨基酸取代的IL-21突变蛋白。在示例性方面中,氨基酸取代位于选自自由以

下组成的组的氨基酸位置处:根据SEQ ID NO:1的氨基酸位置编号,5、8、9、11、12、13、14、15、16、19、23、65、66、68、69、70、71、72、73、75、76、77、78、79、80、109、110、112、113、116、117、119、120或123。在其他示例性方面中,氨基酸取代位于选自由以下组成的组的氨基酸位置处:根据SEQ ID NO:1的氨基酸位置编号,5、8、9、11、12、13、14、15、16、19、23、65、66、68、69、70、72、73、75、76、77、78、79、80、109、110、112、113、116、117、119、120或123。在其他示例性方面中,IL-21突变蛋白包含SEQ ID NO:3-21和23-37的氨基酸序列中的任一个。

[0103] 本披露内容进一步提供相对于SEQ ID NO:1仅仅包含两个氨基酸取代的IL-21突变蛋白。在示例性方面中,氨基酸取代位于选自由以下组成的组的两个氨基酸位置处:根据SEQ ID NO:1的氨基酸位置编号,5、8、9、11、12、13、14、15、16、19、23、65、66、68、69、70、71、72、73、75、76、77、78、79、80、109、110、112、113、116、117、119、120或123。在其他示例性方面中,氨基酸取代位于选自由以下组成的组的两个氨基酸位置处:根据SEQ ID NO:1的氨基酸位置编号,5、9、15、70、71、72、73和76。在其他示例性方面中,氨基酸取代位于选自由以下组成的组的两个氨基酸位置处:根据SEQ ID NO:1的氨基酸位置编号,5、9、73和76。在示例性方面中,两个氨基酸取代中的至少一个位于根据SEQ ID NO:1的氨基酸位置编号位置76处。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含SEQ ID NO:199-208和210-212的氨基酸序列中的任一个。

[0104] 在示例性实施例中,IL-21突变蛋白包含相对于野生型IL-21氨基酸包含至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,且氨基酸取代为保守氨基酸取代。如本文所用,术语“保守氨基酸取代”是指一个氨基酸经具有类似性质,例如尺寸、电荷、疏水性、亲水性和/或芳香性的另一个氨基酸取代,且包括在以下五组中的一个内的交换:

[0105] I. 小的脂肪族、非极性或非极性残基:Ala、Ser、Thr、Pro、Gly;

[0106] II. 极性、带负电残基及其酰胺和酯:Asp、Asn、Glu、Gln、磺基丙氨酸和高磺基丙氨酸;

[0107] III. 极性带正电残基:His、Arg、Lys;鸟氨酸(Orn)

[0108] IV. 大的脂肪族非极性残基:Met、Leu、Ile、Val、Cys、正亮氨酸(Nle)、高半胱氨酸;

[0109] V. 大的芳族残基:Phe、Tyr、Trp、乙酰基苯丙氨酸。

[0110] 在示例性实施例中,IL-21突变蛋白包含相对于野生型IL-21氨基酸包含至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,且氨基酸取代为非保守氨基酸取代。如本文所用,术语“非保守氨基酸取代”在本文中定义为一个氨基酸经具有不同性质,例如尺寸、电荷、疏水性、亲水性和/或芳香性的另一个氨基酸取代,且包括在以上五组外的交换。

[0111] 在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含相对于野生型IL-21氨基酸序列包含至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,且取代氨基酸为天然存在的氨基酸。“天然存在的氨基酸”或“标准氨基酸”或“典型氨基酸”意指在真核生物中发现的直接由通用遗传密码的密码子编码的20种 α 氨基酸(Ala、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Pro、Arg、His、Lys、Asp、Glu)中的一个。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含相对于野生型IL-21氨基酸序列包含至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,且取代氨基酸为非标准氨基酸或在翻译期间未并入蛋白质中的氨基酸。非标准氨基酸包括(但不限于):硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸、 β -氨基酸(例如 β -丙氨酸、 β -氨基异丁酸、 β -苯丙氨酸、 β -高苯丙氨酸、 β -谷氨酸、 β -谷氨酰胺、 β -高色氨酸、 β -亮氨酸、 β -赖氨酸)、高氨基酸(例如高苯丙氨酸、

高丝氨酸、高精氨酸、单半胱氨酸、高胱氨酸)、N-甲基氨基酸(例如L-红豆碱、N-甲基-丙氨酸、N-甲基-异亮氨酸、N-甲基-亮氨酸)、2-氨基辛酸、7-氨基头孢霉烷酸、4-氨基肉桂酸、 α -氨基环己烷丙酸、氨基-(4-羟苯基)乙酸、4-氨基-烟酸、3-氨基苯乙酸等。

[0112] 在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)具有至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、12、14、15、65、66、69、70、72、73、75、76、77、80、116和119中的一个或多个处,且取代氨基酸为脂肪族氨基酸。在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于SEQ ID NO:1具有仅仅一个氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、12、14、15、65、66、69、70、72、73、75、76、77、80、116或119中的一个或多个处,且取代氨基酸为脂肪族氨基酸。

[0113] 在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)具有至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、11、12、13、14、15、16、19、23、65、66、69、70、72、73、75、76、77、78、79、110、112、116、117、119、120或123中的一个或多个处,且取代氨基酸为酸性氨基酸。在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于SEQ ID NO:1具有仅仅一个氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、11、12、13、14、15、16、19、23、65、66、69、70、72、73、75、76、77、78、79、110、112、116、117、119、120或123中的一个或多个处,且取代氨基酸为酸性氨基酸。

[0114] 在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)具有至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置5、9、73、76、109、113或116中的一个或多个处,且取代氨基酸为碱性氨基酸。在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于SEQ ID NO:1具有仅仅一个氨基酸取代的氨基酸序列,且在SEQ ID NO:1的位置5、9、73、76、109、113或116处的氨基酸为碱性氨基酸。

[0115] 在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)具有至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、70或76中的一个或多个处,且取代氨基酸为芳族氨基酸。在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于SEQ ID NO:1具有仅仅一个氨基酸取代的氨基酸序列,氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、70或76处,且取代氨基酸为芳族氨基酸。

[0116] 在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)具有至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、12、15、73、76、116或119中的一个或多个处,且取代氨基酸为包含侧链酰胺的氨基酸。在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于SEQ ID NO:1具有仅仅一个氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、12、15、73、76、116或119中的一个或多个处,且取代氨基酸为包含侧链酰胺的氨基酸。

[0117] 在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)具有至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、11、12、14、15、73、76、116或119中的一个或多个处,且取代氨基酸为包含侧链羟基的氨基酸。在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于SEQ ID NO:1具有仅仅一个氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、11、12、14、

15、73、76、116或119中的一个或多个处,且取代氨基酸为包含侧链羟基的氨基酸。

[0118] 在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)具有至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置65、66、69、70、72、73、75、76、77或80中的一个或多个处,且取代氨基酸为亚氨基酸。在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于SEQ ID NO:1具有仅仅一个氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置65、66、69、70、72、73、75、76、77或80中的一个或多个处,且取代氨基酸为包含亚氨基酸的氨基酸。

[0119] 在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)具有至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置5、9、15、76、116或119中的一个或多个处,且取代氨基酸为包含含硫侧链的氨基酸。在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于SEQ ID NO:1具有仅仅一个氨基酸取代的氨基酸序列,该氨基酸取代在SEQ ID NO:1的位置5、9、15、76、116或119处,且取代氨基酸为包含含硫侧链的氨基酸。

[0120] 在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)具有至少一个氨基酸取代的氨基酸序列,其中该至少一个氨基酸取代展示于表A中。

[0121] 表A

SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置	取代氨基酸的实例 (按单字母代码)	示例性 SEQ ID NO:
5	A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、 V、Y	38
8	A、D、E、G、N、S	39
9	A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、 V、Y	40
11	D、S	41

SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置	取代氨基酸的实例 (按单字母代码)	示例性 SEQ ID NO:
12	A、D、E、N、S、T、V	42
13	D	43
14	A、D、S	44
15	A、E、I、M、N、Q、S、T、V	45
16	D、E	46
19	D	47
23	D	48
65	D、G、P	49
66	D、G、P	50
68	Q	51
69	D、G、P	52
70	E、G、P、Y、T	53
71	L	54
72	A、D、G、P	55
[0123] 73	A、D、E、G、H、I、N、P、Q、S、V	56
75	D、G、P	58
76	A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、 T、V、Y	59
77	D、G、P	60
78	D	61
79	D	62
80	G、P	63
109	K	64
110	D	65
112	D	66
113	K	67
116	A、D、E、I、K、L、M、N、S、T、V	68
117	D	69
119	A、D、E、M、N、Q、S、T	70
120	D	71
123	D	72

[0124] 在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于SEQ ID NO:1具有仅仅一个氨基酸取代的氨基酸序列,且该氨基酸取代表A中所示的氨基酸取代。在其他实施例中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含相对于SEQ ID NO:1具有两个氨基酸取代的氨基酸序列,且该氨基酸取代表A中所示的氨基酸取代中的两个。

[0125] 在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含表B中所示的氨基酸序列。

[0126] 表B

[0127]

氨基酸取代	SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置	取代氨基酸	SEQ ID NO:	氨基酸取代	SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置	取代氨基酸	SEQ ID NO:
R5A	5	A	73	S70E	70	E	136
R5D	5	D	74	S70G	70	G	137
R5E	5	E	75	S70P	70	P	138
R5G	5	G	76	S70Y	70	Y	139
R5H	5	H	77	S70T	70	T	140
R5I	5	I	78	K72D	72	D	141
R5K	5	K	79	K72G	72	G	142
R5L	5	L	80	K72P	72	P	143
R5M	5	M	81	K72A	72	A	144
R5N	5	N	82	K73A	73	A	145
R5Q	5	Q	83	K73D	73	D	146
R5S	5	S	84	K73E	73	E	147
R5T	5	T	85	K73G	73	G	148
R5V	5	V	86	K73H	73	H	149
R5Y	5	Y	87	K73I	73	I	150
I8A	8	A	88	K73N	73	N	151
I8D	8	D	89	K73P	73	P	152
I8E	8	E	90	K73Q	73	Q	153
I8G	8	G	91	K73S	73	S	154
I8N	8	N	92	K73V	73	V	155
I8S	8	S	93	K75D	75	D	156
R9A	9	A	94	K75G	75	G	157
R9D	9	D	95	K75P	75	P	158
R9E	9	E	96	R76A	76	A	159
R9G	9	G	97	R76D	76	D	160
R9H	9	H	98	R76E	76	E	161
R9I	9	I	99	R76G	76	G	162
R9K	9	K	100	R76H	76	H	163
R9L	9	L	101	R76I	76	I	164
R9M	9	M	102	R76K	76	K	165

[0128]

氨基酸取代	SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置	取代氨基酸	SEQ ID NO:	氨基酸取代	SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置	取代氨基酸	SEQ ID NO:
R9N	9	N	103	R76L	76	L	166
R9Q	9	Q	104	R76M	76	M	167
R9S	9	S	105	R76N	76	N	168
R9T	9	T	106	R76P	76	P	169
R9V	9	V	107	R76Q	76	Q	170
R9Y	9	Y	108	R76S	76	S	171
R11D	11	D	109	R76T	76	T	172
R11S	11	S	110	R76V	76	V	173
Q12A	12	A	111	R76Y	76	Y	174
Q12D	12	D	249	K77D	77	D	175
Q12E	12	E	250	K77G	77	G	176
Q12N	12	N	251	K77P	77	P	177
Q12S	12	S	252	P78D	78	D	61
Q12T	12	T	253	P79D	79	D	62
Q12V	12	V	254	S80G	80	G	178
L13D	13	D	112	S80P	80	P	179
I14A	14	A	114	E109K	109	K	64
I14D	14	D	115	R110D	110	D	65
I14S	14	S	116	K112D	112	D	66
D15A	15	A	117	S113K	113	K	67
D15E	15	E	118	Q116A	116	A	180
D15I	15	I	119	Q116D	116	D	181
D15M	15	M	120	Q116E	116	E	182
D15N	15	N	121	Q116I	116	I	183
D15Q	15	Q	122	Q116K	116	K	184
D15S	15	S	123	Q116L	116	L	185
D15T	15	T	283	Q116M	116	M	186
D15V	15	V	124	Q116N	116	N	187
I16D	16	D	125	Q116S	116	S	188
I16E	16	E	126	Q116T	116	T	189
Q19D	19	D	47	Q116V	116	V	190
Y23D	23	D	48	K117D	117	D	69
R65D	65	D	127	I119A	119	A	191
R65G	65	G	128	I119D	119	D	192

氨基酸取代	SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置	取代氨基酸	SEQ ID NO:	氨基酸取代	SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置	取代氨基酸	SEQ ID NO:
R65P	65	P	129	I119E	119	E	193
I66D	66	D	130	I119M	119	M	194
I66G	66	G	131	I119N	119	N	195
I66P	66	P	132	I119Q	119	Q	196
N68Q	68	Q	51	I119S	119	S	197
V69D	69	D	133	I119T	119	T	198
V69G	69	G	134	H120D	120	D	71
V69P	69	P	135	L123D	123	D	72

[0129] 在示例性实施例中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含SEQ ID NO:47、48、51、61、62、64-67、69、71-112、114-198、249-254或283中的任一个的氨基酸序列。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含与SEQ ID NO:47、48、51、61、62、64-67、69、71-112、114-198、249-254或283中的一个具有至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。

[0131] 本披露内容进一步提供相对于SEQ ID NO:1包含仅仅两个氨基酸取代的IL-21突变蛋白,且两个氨基酸取代出现在SEQ ID NO:1的位置5、9、15、70、71、72、73和76中的两个处。在示例性方面中,IL-21突变蛋白相对于SEQ ID NO:1包含仅仅两个氨基酸取代,且该两个取代出现在选自由以下组成的组的一对氨基酸位置处:5和76;9和76;15和70;15和71;15和72;15和73;70和73;70和76;71和73;71和76;72和73;72和76;以及73和76。在示例性方面中,IL-21包含SEQ ID NO:199-208和210-212的氨基酸序列中的任一个。在其他方面中,本披露内容进一步提供相对于SEQ ID NO:1具有仅仅两个氨基酸取代的IL-21突变蛋白,且这两个氨基酸取代出现在SEQ ID NO:1的位置5、9、73和76中的两个处。在示例性方面中,这些取代中的一个出现在SEQ ID NO:1的位置76处。在示例性方面中,在SEQ ID NO:1的位置76处的取代氨基酸为脂肪族氨基酸或酸性氨基酸。在示例性方面中,脂肪族氨基酸为丙氨酸。在示例性方面中,酸性氨基酸为天冬氨酸或谷氨酸。在示例性方面中,酸性氨基酸为谷氨酸。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含在SEQ ID NO:1的位置76处的取代氨基酸和在SEQ ID NO:1的位置5、9或73处的脂肪族氨基酸或酸性氨基酸。在示例性方面中,在位置5、9或73处的取代氨基酸为脂肪族氨基酸、酸性氨基酸或具有侧链酰胺的氨基酸。在示例性方面中,脂肪族氨基酸为丙氨酸,酸性氨基酸为谷氨酸,且具有侧链酰胺的氨基酸为谷氨酰胺。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含在SEQ ID NO:1的位置76处的取代氨基酸(任选地脂肪族氨基酸或酸性氨基酸)和在位置5或9(根据SEQ ID NO:1编号)处的取代氨基酸。

[0132] 在示例性方面中,本披露内容的IL-21突变蛋白包含表C中所示的SEQ ID NO:中的任一个的氨基酸序列。

[0133] 表C

氨基酸取代	SEQ ID NO: 1 的第一氨基酸位置	第一取代氨基酸	SEQ ID NO: 1 的第二氨基酸位置	第二取代氨基酸	SEQ ID NO:
R5E、R76E	5	E	76	E	239
R5E、R76A	5	E	76	A	238
R5A、R76A	5	A	76	A	236
R5Q、R76A	5	Q	76	A	240
R5A、R76E	5	A	76	E	237
R5Q、R76E	5	Q	76	E	241
R9E、R76E	9	E	76	E	245
R9A、R76E	9	A	76	E	243
R9E、R76A	9	E	76	A	244
R9A、R76A	9	A	76	A	242
D15N、S70T	15	N	70	T	213
D15N、I71L	15	N	71	L	214
D15N、K72A	15	N	72	A	215
D15N、K73A	15	N	73	A	216
S70T、K73Q	70	T	73	Q	219
S70T、R76A	70	T	76	A	246
S70T、R76D	70	T	76	D	247
S70T、R76E	70	T	76	E	248
I71L、K73Q	71	L	73	Q	217
I71L、R76A	71	L	76	A	227
I71L、R76D	71	L	76	D	228
I71L、R76E	71	L	76	E	229
K72A、K73Q	72	A	73	Q	218
K72A、R76A	72	A	76	A	230
K72A、R76D	72	A	76	D	231
K72A、R76E	72	A	76	E	232
K73A、R76A	73	A	76	A	233
K73A、R76D	73	A	76	D	234
K73A、R76E	73	A	76	E	235

[0136] 在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含选自SEQ ID NO:213-219和227-248组成的组的氨基酸序列。在示例性方面中,IL-21包含与SEQ ID NO:213-219和227-248中的一个具有至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。

[0137] 肽长度

[0138] 本文所述的IL-21突变蛋白可包含具有任何数目的氨基酸的肽主链,即可具有任何肽长度。在一些实施例中,本文所述的肽的长度与SEQ ID NO:1近乎相同,即133(±约1至约20、±约1至约15、±约1至约10或±约1至约5)个氨基酸长。在一些实施例中,由于与另一

多肽链,例如包含约400至约600个氨基酸的抗体重链、包含约150至约300个氨基酸的抗体轻链融合,所以本发明的肽长度比133个氨基酸长,如本文中进一步描述。

[0139] 另外的肽修饰

[0140] 在本披露内容的替代或另外的实施例中,IL-21突变蛋白经脂质化(例如肉豆蔻酰化、棕榈酰化)、糖基化、酰胺化、羧酸化、磷酸化、酯化、酰化、乙酰化、环化或转变成酸加成盐和/或任选地二聚或聚合或结合,如本文进一步描述。

[0141] 药学上可接受的盐

[0142] 在示例性方面中,IL-21突变蛋白呈盐,例如药学上可接受的盐的形式。此类盐可在IL-21突变蛋白的最终分离和纯化期间当场制备,或通过游离碱官能团与合适酸反应而分开制备。可用以形成药学上可接受的酸加成盐的酸的实例包括例如无机酸,例如盐酸、氢溴酸、硫酸和磷酸;和有机酸,例如草酸、马来酸、丁二酸和柠檬酸。

[0143] 代表性酸加成盐包括(但不限于)乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、柠檬酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、二葡萄糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、富马酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙烷磺酸盐(异硫代硫酸盐)、乳酸盐、马来酸盐、甲烷磺酸盐、烟酸盐、2-萘磺酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯丙酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、丁二酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、磷酸盐、谷氨酸盐、碳酸氢盐、对甲苯磺酸盐和十一酸盐。

[0144] 碱加成盐还可在IL-21突变蛋白的最终分离和纯化期间当场制备,或通过使含羧酸的部分与合适碱,诸如药学上可接受的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐,或与氨或有机一级胺、二级胺或三级胺反应来制备。药学上可接受的盐尤其包括(但不限于)基于碱金属或碱土金属的阳离子,诸如锂盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐和铝盐等;以及无毒季铵和胺阳离子,包括铵、四甲铵、四乙铵、甲铵、二甲铵、三甲铵、三乙铵、二乙铵和乙铵。可用于形成碱加成盐的其他代表性有机胺包括例如乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌啶、哌嗪等。

[0145] 此外,含碱性氮的基团可用诸如以下的活性剂进行季铵化:低级烷基卤化物,诸如甲基、乙基、丙基和丁基氯化物,甲基、乙基、丙基和丁基溴化物,以及甲基、乙基、丙基和丁基碘化物;长链卤化物,诸如癸基氯、月桂基氯、肉豆蔻酰氯和硬脂酰氯,癸基溴、月桂基溴、肉豆蔻酰溴和硬脂酰溴,以及癸基碘、月桂基碘、肉豆蔻酰碘和硬脂酰碘;芳基烷基卤化物,如苯甲基溴和苯乙基溴以及其他。从而获得水溶性或油溶性或水可分散性或油可分散性产物。

[0146] 纯化

[0147] 可纯化本披露内容的IL-21突变蛋白。如本文所用的术语“纯化”意指增加纯度,其中“纯度”为相对术语,而不必要视为绝对纯度。在示例性方面中,化合物的纯度(例如在组合物中)为至少或约50%、至少或约60%、至少或约70%、至少或约80%、至少或约90%、至少或约95%或至少或约98%或约100%。

[0148] 肽模拟物

[0149] 在一些方面中,IL-21突变蛋白为肽模拟物,或突变蛋白的至少一部分为肽模拟物。肽模拟物及其制备方法为本领域中已知。参见例如Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics[氨基酸模拟和肽模拟物研究进展]、第1卷和第2卷,Abell,A.编辑,JAI Press Inc.[JAI出版社公司],Greenwich,CT[康涅狄格州格林威治],2006。在一些方

面中,肽模拟物为包含D-异构体氨基酸的D-肽肽模拟物。在一些方面中,肽模拟物为类肽,其中氨基酸的侧链连接至肽主链的 α 氮原子。类肽的制造方法是本领域中已知的。参见例如Zuckermann等人,JACS 114(26):10646-10647(1992)和Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Peptoids [新颖类肽的设计、合成与评价], Fowler, Sarah, University of Wisconsin-Madison [威斯康星大学麦迪逊分校], 2008。在一些方面中,肽模拟物为包含氨基键结合在 β 碳而非 α 碳的 β 氨基酸的 β 肽。 β -肽的制造方法为本领域中已知。参见例如Seebach等人, Helvetica Chimica Acta [瑞士化学学报] 79(4):913-941(1996)。

[0150] 结合特征

[0151] 在示例性实施例中, IL-21突变蛋白以相对于野生型IL-21对IL-21R的亲合力有所降低的亲合力结合IL-21受体(IL-21R)。在示例性实施例中, IL-21突变蛋白以相对于野生型人类IL-21对人类IL-21R的亲合力有所降低的亲合力结合人类IL-21R。在示例性实施例中, IL-21突变蛋白以相对于野生型人类IL-21对人类IL-21R的 α 链的亲合力有所降低的亲合力结合人类IL-21R的 α 链。在特定实施例中, 以相对于野生型人类IL-21对人类IL-21R的 α 链的亲合力有所降低的亲合力结合人类IL-21R的 α 链的IL-21突变蛋白含有一个、两个或更多个位于选自由以下组成的组的氨基酸位置处的取代: 根据SEQ ID NO:1的氨基酸位置编号, 5、8、9、12、13、16、19、23、65、66、69、70、72、73、75、76、77、78、79和80。本文中论述可在此类位置处进行的特定氨基酸取代(参见例如表A、B和C)。

[0152] 在示例性实施例中, IL-21突变蛋白以相对于野生型人类IL-21对人类IL-21R的 γ 链的亲合力有所降低的亲合力结合人类IL-21R的 γ 链。在特定实施例中, 以相对于野生型人类IL-21对人类IL-21R的 γ 链的亲合力有所降低的亲合力结合人类IL-21R的 γ 链的IL-21突变蛋白含有一个、两个或更多个位于选自由以下组成的组的氨基酸位置处的取代: 根据SEQ ID NO:1的氨基酸位置编号, 11、14、15、109、110、112、113、116、117、119、120和123。本文中论述可在此类位置处进行的特定氨基酸取代(参见例如表A、B和C)。

[0153] 在示例性实施例中, IL-21突变蛋白以相对于野生型IL-21对人类IL-21R的 α 链的亲合力有所降低的亲合力结合人类IL-21R的 γ 链。在示例性实施例中, IL-21突变蛋白以相对于野生型食蟹猕猴IL-21对食蟹猕猴IL-21R的亲合力有所降低的亲合力结合食蟹猕猴IL-21R。在示例性实施例中, IL-21突变蛋白以相对于野生型食蟹猕猴IL-21对食蟹猕猴IL-21R的 α 链的亲合力有所降低的亲合力结合食蟹猕猴IL-21R的 α 链。在示例性实施例中, IL-21突变蛋白以相对于野生型食蟹猕猴IL-21对食蟹猕猴IL-21R的 γ 链的亲合力有所降低的亲合力结合食蟹猕猴IL-21R的 γ 链。在示例性实施例中, IL-21突变蛋白以相对于野生型食蟹猕猴IL-21对食蟹猕猴IL-21R的 α 链的亲合力有所降低的亲合力结合食蟹猕猴IL-21R的 γ 链。

[0154] 本文提供的IL-21突变蛋白以非共价和可逆方式结合IL-21R。在示例性实施例中, 突变蛋白对IL-21R的结合强度可根据其亲合力描述, 亲合力为突变蛋白的结合位点与IL-21R之间的相互作用的强度的量度。在示例性方面中, 本文提供的IL-21突变蛋白对IL-21R具有高亲合力, 且因此将在比低亲合力IL-21突变蛋白短的时段内结合更大量的IL-21R。在示例性方面中, 本文提供的IL-21突变蛋白对IL-21R具有低亲合力, 且因此将在比高亲合力IL-21突变蛋白长的时段内结合更少量的IL-21R。在示例性方面中, IL-21突变蛋白具有平

平衡常数 K_A ,其为至少 $10^5 M^{-1}$ 、至少 $10^6 M^{-1}$ 、至少 $10^7 M^{-1}$ 、至少 $10^8 M^{-1}$ 、至少 $10^9 M^{-1}$ 或至少 $10^{10} M^{-1}$ 。如普通技术人员所了解, K_A 可受包括pH值、温度和缓冲液组成的因素影响。

[0155] 在示例性实施例中,IL-21突变蛋白与IL-21R的结合强度可根据其敏感性描述。 K_D 为IL-21突变蛋白与IL-21R之间的平衡解离常数, k_{off}/k_{on} 的比率。 K_D 与 K_A 逆相关。 K_D 值与突变蛋白的浓度(特定实验需要的突变蛋白的量)有关,因此 K_D 值愈低(需要浓度愈低),突变蛋白的亲合力愈高。在示例性方面中,IL-21突变蛋白与IL-21R的结合强度可根据 K_D 描述。在示例性方面中,本文提供的IL-21突变蛋白的 K_D 为约 $10^{-1} M$ 、约 $10^{-2} M$ 、约 $10^{-3} M$ 、约 $10^{-4} M$ 、约 $10^{-5} M$ 、约 $10^{-6} M$ 或更小。在示例性方面中,本文提供的IL-21突变蛋白的 K_D 为微摩尔、纳摩尔、皮摩尔或飞摩尔。在示例性方面中,本文提供的IL-21突变蛋白的 K_D 在约 10^{-4} 至 $10^{-6} M$,或 10^{-7} 至 $10^{-9} M$,或 10^{-10} 至 $10^{-12} M$,或 10^{-13} 至 $10^{-15} M$ 范围内。在示例性方面中,IL-21突变蛋白以大于或等于约0.04nM的 K_D 结合人类IL-21R。在示例性方面中,IL-21突变蛋白以约0.01nM至约20nM、0.02nM至20nM、0.05nM至20nM、0.05nM至15nM、0.1nM至15nM、0.1nM至10nM、1nM至10nM或5nM至10nM的 K_D 结合人类IL-21R。在示例性方面中,IL-21突变蛋白以大于或等于约0.055nM的 K_D 结合食蟹猕猴IL-21R。在示例性方面中,IL-21突变蛋白以约0.01nM至约20nM、0.02nM至20nM、0.05nM至20nM、0.05nM至15nM、0.1nM至15nM、0.1nM至10nM、1nM至10nM或5nM至10nM的 K_D 结合食蟹猕猴IL-21R。

[0156] 在示例性实施例中,IL-21突变蛋白展现对IL-21R α -链的结合亲合力降低。在示例性方面中,IL-21突变蛋白为展现对IL-21R α -链的结合亲合力降低约2倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、105倍、110倍、115倍、120倍、125倍、130倍、135倍、140倍、145倍、150倍、175倍、200倍、225倍、250倍、275倍、300倍、325倍、350倍、375倍、400倍、425倍、450倍、475倍、500倍、525倍、550倍、575倍、600倍、625倍、650倍、675倍、700倍、725倍、750倍、775倍、800倍、825倍、850倍、875倍、900倍、925倍、950倍、975倍、1000倍或更多的突变蛋白(例如单一或双重)。在示例性方面中,IL-21突变蛋白为展现对IL-21R α -链的结合亲合力有所降低的双重突变蛋白。

[0157] 在示例性方面中,与约0.025nM的野生型人类IL-21对IL-21R α -链的亲合力相比,上述IL-21突变蛋白(例如单一或双重突变蛋白)的结合亲合力降低引起对IL-21R α -链的亲合力降低。因此,如上所论述的亲合力降低2倍将引起IL-21突变蛋白对IL-21R α -链的亲合力为约0.05nM。因此,在示例性实施例中,IL-21突变蛋白(例如单一或双重)具有约0.05nM、0.125nM、0.25nM、0.375nM、0.5nM、0.625nM、0.75nM、0.875nM、1.0nM、1.125nM、1.25nM、1.375nM、1.5nM、1.625nM、1.75nM、1.875nM、2.0nM、2.125nM、2.25nM、2.375nM、2.5nM、2.625nM、2.75nM、2.875nM、3.0nM、3.125nM、3.25nM、3.375nM、3.5nM、3.625nM、3.75nM、4.375nM、5nM、5.625nM、6.25nM、6.875nM、7.5nM、8.125nM、8.75nM、9.375nM、10.0nM、10.625nM、11.25nM、11.875nM、12.5nM、13.125nM、13.75nM、14.375nM、15.0nM、15.625nM、16.25nM、16.875nM、17.5nM、18.125nM、18.75nM、19.375nM、20.0nM、20.625nM、21.25nM、21.875nM、22.5nM、23.125nM、23.75nM、24.375nM、25nM或更多的对IL-21R α -链的亲合力。在示例性方面中,IL-21突变蛋白为展现对IL-21R α -链的结合亲合力降低的双重突变蛋白。

[0158] 在示例性实施例中,如通过体外STAT3磷酸化测定所测量,IL-21突变蛋白展现活性降低。在示例性方面中,IL-21突变蛋白为如通过STAT3磷酸化测定所测量,展现约2倍、5

倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、105倍、110倍、115倍、120倍、125倍、130倍、135倍、140倍、145倍、150倍、175倍、200倍、225倍、250倍、275倍、300倍、325倍、350倍、375倍、400倍、425倍、450倍、475倍、500倍、525倍、550倍、575倍、600倍、625倍、650倍、675倍、700倍、725倍、750倍、775倍、800倍、825倍、850倍、875倍、900倍、925倍、950倍、975倍、1000倍或更多活性降低的突变蛋白(例如单一或双重)。在示例性方面中,如通过STAT3磷酸化测定所测量,IL-21突变蛋白为展现活性降低的双重突变蛋白。

[0159] IL-21突变蛋白结合物

[0160] 本披露内容还提供包含与异源部分连接的一种或多种本披露内容的IL-21突变蛋白的结合物。如本文所用,术语“异源部分”与术语“结合部分”同义,且是指与本文所述的IL-21突变蛋白不同的任何分子(化学或生物化学、天然存在或未编码)。可连接于本文所述的任一IL-21突变蛋白的示例性结合部分包括(但不限于)异源肽或多肽(包括例如免疫球蛋白或其部分(例如可变区、CDR或Fc区))、靶向剂、诊断标记(诸如放射性同位素、荧光团或酶标记)、包括水溶性聚合物的聚合物或其他治疗剂或诊断剂。在一些实施例中,提供包含本披露内容的IL-21突变蛋白和免疫球蛋白的结合物。在一些实施例中,结合物包含一种或多种本文所述的IL-21突变蛋白和以下一个或多个:肽(与本文所述的IL-21突变蛋白不同)、多肽、核酸分子、抗体或其片段、聚合物、量子点、小分子、毒素、诊断剂、碳水化合物、氨基酸。

[0161] 在示例性实施例中,本披露内容的结合物包含如本文所述的IL-21突变蛋白和异源部分,该异源部分为多肽(例如与本文所述的任一IL-21突变蛋白不同的多肽),且该结合物为融合多肽或融合蛋白或嵌合蛋白或嵌合多肽。本文在“融合蛋白”下提供有关此类结合物的另外的描述。

[0162] 在一些实施例中,异源部分经由非共价键或共价键连接于本披露内容的IL-21突变蛋白。在示例性方面中,在IL-21突变蛋白与异源部分之间的键经由共价化学键,例如肽键、二硫键等,或经由物理力,诸如静电、氢、离子、范德瓦耳斯(van der Waal)或疏水性或亲水性相互作用实现。可使用多种非共价偶合系统,包括例如生物素-亲和素、配体/受体、酶/底物、核酸/核酸结合蛋白、脂质/脂质结合蛋白、细胞黏附分子配偶体;或对彼此具有亲和力的任何结合配偶体或其片段。

[0163] 在示例性实施例中IL-21突变蛋白经由直接共价键,通过使IL-21突变蛋白的靶向氨基酸残基与能够与这些靶向氨基酸的所选侧链或N或C端残基反应的有机衍生剂反应来连接于结合部分。IL-21突变蛋白或结合部分上的反应基团包括例如醛、氨基、酯、硫醇、 α -卤乙酰基、马来酰亚胺基或胍基。衍生剂包括例如马来酰亚胺基苯甲酰基磺基丁二酰亚胺酯(经由半胱氨酸残基结合)、N-羟基丁二酰亚胺(经由赖氨酸残基)、戊二醛、丁二酸酐或本领域中已知的其他试剂。可替代地,结合部分可经由中间载剂,诸如多糖或多肽载剂间接连接于IL-21突变蛋白。多糖载剂的实例包括氨基葡聚糖。合适的多肽载剂的实例包括聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、其共聚物和这些氨基酸与例如丝氨酸的其他氨基酸的混合聚合物,以比较所得负载剂所需要的溶解特性。

[0164] 半胱氨酰残基最常与 α -卤乙酸酯(和对应胺),诸如氯乙酸、氯乙酰氨反应,以获得羧甲基或羧酰氨基甲基衍生物。半胱氨酰残基还通过与溴三氟丙酮、 α -溴- β -(5-咪唑基)丙

酸、氯乙酰基磷酸酯、N-烷基马来酰亚胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基2-吡啶基二硫化物、对氯汞基苯甲酸酯、2-氯汞基-4-硝基酚或氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑反应来衍生。

[0165] 组氨酰基残基通过与焦碳酸二乙酯在pH 5.5-7.0下反应来衍生,因为此试剂对组氨酰基侧链具有相对特异性。对溴苯甲酰甲基溴也是有用的;优选在0.1M二甲胂酸钠中在pH 6.0下进行反应。

[0166] 赖氨酰基和氨基端残基与丁二酸或其他羧酸酐反应。用这些试剂衍生化具有逆转赖氨酰基残基电荷的作用。其他适用于衍生含 α -氨基的残基的试剂包括亚氨酸酯,诸如吡啶亚氨酸甲酯、磷酸吡哆醛、吡哆醛、氯硼氢化物、三硝基苯磺酸、0-甲基异脲、2,4-戊二酮和转氨酶催化的与乙醛酸酯的反应。

[0167] 精氨酰基残基通过与一种或若干常规试剂反应来修饰,这些试剂尤其为苯甲酰甲醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮和茛三酮。精氨酸残基的衍生化需要反应在碱性条件下进行,因为胍官能团具有高pKa。此外,这些试剂可与赖氨酸以及精氨酸 ϵ -氨基的基团反应。

[0168] 可进行酪氨酰基残基的特定修饰,其中尤其关注通过与芳族重氮化合物或四硝基甲烷反应而将光谱标记引入酪氨酰基残基。最通常,N-乙酰基咪唑和四硝基甲烷分别用于形成O-乙酰基酪氨酰基物质和3-硝基衍生物。

[0169] 羧基侧基(天冬氨酰基或谷氨酰基)通过与碳化二亚胺(R-N=C=N-R')反应来选择性地修饰,其中R和R'为不同烷基,诸如1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳化二亚胺或1-乙基-3-(4-氮阳离子-4,4-二甲基苯基)碳化二亚胺。此外,天冬氨酰基和谷氨酰基残基通过与铵离子反应而转变成天冬酰胺酰基和谷酰胺基残基。

[0170] 其他修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基的磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(T.E.Creighton,Proteins:Structure and Molecular Properties[蛋白质:结构和分子特性],W.H.Freeman&Co.[W.H.弗里曼公司],San Francisco[旧金山],第79-86页(1983))、天冬酰胺或谷氨酰胺的脱酰胺化、N端氨的乙酰化和/或C端羧酸基的酰胺化或酯化。

[0171] 另一类型共价修饰包括化学上或通过酶将糖苷与IL-21突变蛋白偶合。糖可附接于(a)精氨酸和组氨酸;(b)游离羧基;(c)游离巯基,诸如半胱氨酸的游离巯基;(d)游离羟基,例如丝氨酸、苏氨酸或羟基脯氨酸的游离羟基;(e)芳族残基,诸如酪氨酸或色氨酸的芳族残基;或(f)谷氨酰胺的酰胺基。这些方法描述于1987年9月11日公开的W087/05330以及Aplin和Wriston,CRC Crit.Rev.Biochem.[CRC生物化学关键评论],第259-306页(1981)中。

[0172] 在示例性方面中,异源部分经由接头附接于本披露内容的IL-21突变蛋白。在一些方面中,接头包含具有1至约60个或1至30个原子或更长、2至5个原子、2至10个原子、5至10个原子或10至20个原子长的链。在一些实施例中,链原子均为碳原子。在一些实施例中,接头主链中的链原子选自由C、O、N和S组成的组。链原子和接头可根据其预期溶解性(亲水性)选择,以便提供更可溶的结合物。在一些实施例中,接头提供易由在靶标组织或器官或细胞中发现的酶或其他催化剂或水解条件裂解的官能团。在一些实施例中,接头长度足够长以减小位阻可能性。若接头为共价键或肽键且结合物为多肽,则整个结合物可为融合蛋白。此类肽基接头可为任何长度。示例性肽基接头为约1至50个氨基酸长,5至50、3至5、5至10、5至

15或10至30个氨基酸长,且为柔性或刚性。在示例性方面中,接头为包含约2至约20个氨基酸的肽。在示例性方面中,接头为包含约2至约15个氨基酸、约2至约10个氨基酸或约2至约5个氨基酸的肽。合适的肽接头为本领域中已知。参见例如Chen等人,Adv Drug Delivery Reviews[先进药物递送评论]65(10):1357-1369(2013);Arai等人,Protein Eng Des Sel[蛋白质工程化设计与选择]14(8):529-532(2001);和Wriggers等人,Curr Trends in Peptide Science[肽科学的当前趋势]80(6):736-746(2005)。在示例性方面中,接头为包含氨基酸序列GGGG(SAQ ID NO:262)的肽。

[0173] 融合蛋白

[0174] 在示例性实施例中,IL-21突变蛋白连接于与本文所述的任一IL-21突变蛋白不同的多肽,且结合物为融合多肽或融合蛋白或嵌合蛋白或嵌合多肽。因此,本披露内容提供包含本披露内容的IL-21突变蛋白和异源多肽或异源肽的融合多肽或融合蛋白。在示例性方面中,本披露内容的融合蛋白包含连接于抗原结合蛋白的本披露内容的IL-21突变蛋白。在示例性方面中,抗原结合蛋白为抗体或免疫球蛋白或其抗原结合抗体片段或抗体蛋白产物。

[0175] 总体上,抗体形成称为免疫球蛋白的血浆蛋白家族且由免疫球蛋白结构域构成。(Janeway等人,Immunobiology:The Immune System in Health and Disease[免疫生物学:健康与疾病的免疫系统],第4版,Elsevier Science Ltd./Garland Publishing[爱思唯尔科学有限公司/加兰出版社],1999)。如本文所用,术语“抗体”是指具有常规免疫球蛋白形式、包含重链和轻链且包含可变区和恒定区的蛋白质。举例而言,抗体可为IgG,其为具有两对一致多肽链的“Y形”结构,每个对具有一条“轻”链(通常具有约25kDa的分子量)和一条“重”链(通常具有约50-70kDa的分子量)。抗体具有可变区和恒定区。在IgG形式中,可变区一般为约100-110个或更多个氨基酸,包含三个互补决定区(CDR),主要负责抗原识别,并且与结合不同抗原的其他抗体差异很大。恒定区允许抗体募集免疫系统的细胞和分子。可变区由每条轻链和重链的N端区形成,而恒定区由每条重链和轻链的C端部分形成。(Janeway等人,“Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes[抗体分子结构与免疫球蛋白基因]”,Immunobiology:The Immune System in Health and Disease[免疫生物学:健康与疾病的免疫系统],第4版Elsevier Science Ltd./Garland Publishing[爱思唯尔科学有限公司/加兰出版社],(1999))。

[0176] 本领域中已描述抗体CDR的通用结构和性质。简言之,在抗体骨架中,CDR包埋在重链和轻链可变区中的框架内,其中这些CDR构成主要负责抗原结合和识别的区域。可变区通常包含至少三个重链或轻链CDR(Kabat等人,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫相关蛋白质序列],Public Health Service[公共卫生署]N.I.H.,Bethesda,Md.[贝塞斯达,马里兰州];还参见Chothia和Lesk,1987,J.Mol.Biol.[分子生物杂志]196:901-917;Chothia等人,1989,Nature[自然]342:877-883)在框架区(称为框架区1-4,FR1、FR2、FR3和FR4,Kabat等人,1991;还参见Chothia和Lesk,1987,同上)内。

[0177] 抗体可包含本领域中已知的任何恒定区。人类轻链分成 κ 和 λ 轻链。重链分成 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ,且将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。IgG具有若干个亚类,包括(但不限于)IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。IgM具有亚类,包括(但不限于)IgM1和IgM2。本披露内

容的实施例包括抗体的所有此类类别或同种型。轻链恒定区可为例如 κ 或 λ 型轻链恒定区,例如人类 κ 或 λ 型轻链恒定区。重链恒定区可为例如 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 型重链恒定区,例如人类 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 型重链恒定区。因此,在示例性实施例中,抗体为同种型IgA、IgD、IgE、IgG或IgM的抗体,包括IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中的任一个。

[0178] 抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体。在一些实施例中,抗体包含基本上类似于由哺乳动物,例如小鼠、兔、山羊、马、鸡、仓鼠、人类等产生的天然存在的抗体的序列。关于此,抗体可视为哺乳动物抗体,例如小鼠抗体、兔抗体、山羊抗体、马抗体、鸡抗体、仓鼠抗体、人类抗体等。在某些方面中,抗体为人类抗体。在某些方面中,抗体为嵌合抗体或人源化抗体。术语“嵌合抗体”是指含有来自两种或更多种不同抗体的结构域的抗体。嵌合抗体可例如含有来自一种物种的恒定域和来自第二物种的可变域,或更一般地,可含有来自至少两种物种的氨基酸序列的延伸。嵌合抗体还可含有相同物种内两种或更多种不同抗体的结构域。术语“人源化”在关于抗体使用时,是指具有至少来自非人类来源的CDR区的抗体,这些抗体经工程化以具有比原始来源抗体更类似于真实人类抗体的结构和免疫功能。举例而言,人源化可涉及移植来自非人类抗体,诸如小鼠抗体的CDR至人类抗体。人源化还可包括选择氨基酸取代以使非人类序列更类似于人类序列。

[0179] 抗体可通过酶,诸如木瓜蛋白酶和胃蛋白酶裂解成片段。木瓜蛋白酶使抗体裂解,以产生两个Fab片段和单个Fc片段。胃蛋白酶使抗体裂解,以产生F(ab')₂片段和pFc'片段。在本披露内容的示例性方面中,本披露内容的融合蛋白包含抗原结合抗体片段。如本文所用,术语“抗原结合抗体片段”是指能够结合抗体抗原的抗体分子的一部分且还称“抗原结合片段”或“抗原结合部分”。在示例性情况下,抗原结合抗体片段为Fab片段或F(ab')₂片段。

[0180] 抗体的构造已用于产生日益增大的一系列替代形式,其跨越至少约12-150kDa分子量范围且具有在从单体(n=1)、二聚体(n=2)、三聚体(n=3)、四聚体(n=4)且可能更高的化合价(n)范围;此类替代形式在本文中称为“抗体蛋白产物”。抗体蛋白产物包括基于完整抗体结构的产物和模拟保留完整抗原结合能力的抗体片段的产物,例如scFv、Fab和VHH/VH(以下论述)。保留完全抗原结合位点的最小抗原结合抗体片段为Fv片段,其完全由可变(V)区组成。可溶的柔性氨基酸肽接头用于连接V区至scFv(单链片段可变)片段以稳定分子,或将恒定(C)域添加至V区以产生Fab片段[抗原结合片段]。scFv与Fab片段均容易在宿主细胞,例如原核宿主细胞中产生。其他抗体蛋白产物包括经二硫键稳定的scFv(ds-scFv)、单链Fab(scFab)以及二聚体和多聚体抗体形式,如双功能抗体、三功能抗体和四功能抗体,或包含由连接于寡聚结构域的scFv组成的不同形式的迷你抗体(miniAb)。最小片段为骆驼科重链Ab的VHH/VH以及单域Ab(sdAb)。最常用于产生新颖抗体形式的构建基块为单链可变(V)域抗体片段(scFv),其包含由约15个氨基酸残基的肽接头连接的来自重链和轻链的V结构域(VH和VL结构域)。肽体或肽-Fc融合物为又一种抗体蛋白产物。肽体的结构由移植至Fc结构域上的生物活性肽组成。本领域中充分描述肽体。参见例如Shimamoto等人,mAbs 4(5):586-591(2012)。

[0181] 其他抗体蛋白产物包括单链抗体(single chain antibody,SCA);双功能抗体;三功能抗体;四功能抗体;双特异性或三特异性抗体等。双特异性抗体可分成五大类:BsIgG、附加IgG、BsAb片段、双特异性融合蛋白和BsAb结合物。参见例如Spiess等人,Molecular

Immunology[分子免疫学]67(2)部分A:97-106(2015)。

[0182] 在示例性方面中,本披露内容的融合蛋白包含这些抗体蛋白产物中的任一个。在示例性方面中,本披露内容的融合蛋白包含scFv、Fab VHH/VH、Fv片段、ds-scFv、scFab、二聚抗体、多聚抗体(例如双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体)、迷你抗体、骆驼科重链抗体的肽体VHH/VH、sdAb、双功能抗体;三功能抗体;四功能抗体;双特异性或三特异性抗体、BsIgG、附加IgG、BsAb片段、双特异性融合蛋白和BsAb结合物中的任一个。

[0183] 在示例性情况下,本披露内容的融合蛋白包含呈单体形式或聚合物、寡聚物或多聚体形式的抗体蛋白产物。在抗体包含两种或更多种不同抗原结合区片段的某些实施例中,抗体视为双特异性、三特异性或多特异性或者二价、三价或多价,视由抗体识别和结合的不同抗原决定基的数目而定。

[0184] 在示例性实施例中,抗体、抗原结合抗体片段或抗体蛋白产物结合肿瘤抗原。在示例性方面中,肿瘤抗原为源自于病毒蛋白的抗原、源自于点突变的抗原或由癌种系基因编码的抗原。在示例性方面中,肿瘤抗原为p53、KRAS、NRAS、MAGEA、MAGEB、MAGEC、BAGE、GAGE、LAGE/NY-ES01、SSX、酪氨酸酶、gp100/pm117、Melan-A/MART-1、gp75/TRP1、TRP2、CEA、RAGE-1、HER2/NEU、WT1。在示例性方面中,本披露内容的融合蛋白的抗体、抗原结合抗体片段或抗体蛋白产物结合免疫治疗剂或为免疫治疗剂,如本文所述。在示例性方面中,本披露内容的融合蛋白的抗体、抗原结合抗体片段或抗体蛋白产物结合细胞因子、淋巴因子、生长因子或造血因子,如本文所述。

[0185] 在示例性实施例中,本披露内容的融合蛋白包含细胞因子(例如本文所述的IL-21突变蛋白)和结合免疫检查点路径的蛋白质、肿瘤抗原、细胞因子、淋巴因子、生长因子或其他造血因子(包括(但不限于)本文所述的那些物质中的任一个)的抗体、其抗原结合抗体片段或抗体蛋白产物。在示例性实施例中,本披露内容的融合蛋白包含细胞因子(例如本文所述的IL-21突变蛋白)和结合选自由以下组成的组的免疫检查点路径的蛋白质的抗体、其抗原结合抗体片段或抗体蛋白产物:CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CEACAM-1、TIGIT、LAG3、CD112、CD112R、CD96、TIM3、BTLA或共刺激受体:ICOS、OX40、41BB、CD27、GITR。

[0186] 在其他实施例中,本披露内容的融合蛋白包含细胞因子和结合免疫检查点路径的蛋白质的抗体(或其抗原结合抗体片段)。合适的细胞因子包括例如增强TH-1型反应的细胞因子;和活化STAT 1、STAT 3、STAT 4或STAT 5的细胞因子。在一些实施例中,细胞因子为白介素。在其他实施例中,细胞因子为增强T细胞活性的白介素,诸如IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15或IL-21。此类细胞因子可经修饰(例如经由突变)以减弱其对其相应受体的亲和力。通过减少脱靶和不必要的相互作用,此类突变蛋白可展现提高的安全性概况。因此,细胞因子可经修饰以产生IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15或IL-21突变蛋白。在一个特定实施例中,细胞因子为本文所述的IL-21突变蛋白。结合免疫检查点路径的蛋白质的合适抗体(或其抗原结合抗体片段)包括例如结合以下的抗体:CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、TIGIT、LAG3、CD112、TIM3、BTLA或共刺激受体:ICOS、OX40、41BB或GITR。在一个特定实施例中,抗体(或其抗原结合抗体片段)结合PD-1(例如人类PD-1)。

[0187] 在其他实施例中,本披露内容的融合蛋白为包含细胞因子、抗体(或其抗原结合抗体片段)和至少一种另外的靶向部分的多特异性融合蛋白。举例而言,本披露内容的融合蛋白可为包含细胞因子、抗体(或其抗原结合抗体片段)和至少一种另外的靶向部分的三特异

性融合蛋白。

[0188] 在示例性实施例中,本披露内容的融合蛋白包含本文所述的IL-21突变蛋白和结合PD-1的拮抗剂。术语“结合PD-1的拮抗剂”是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与其一种或多种结合配偶体,诸如PD-L1、PD-L2的相互作用所引起的信号转导的分子。在一些实施例中,结合PD-1的拮抗剂为抑制PD-1与其一种或多种结合配偶体的结合的分子。在一个特定方面中,结合PD-1的拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。举例而言,结合PD-1的拮抗剂包括抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段、免疫黏附素、融合蛋白、寡肽和减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与PD-L1和/或PD-L2的相互作用所引起的信号转导的其他分子。在一个实施例中,结合PD-1的拮抗剂减少由或经由在T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白介导、经由PD-1介导的信号传导的负面共刺激信号,使得功能障碍性T细胞较少功能障碍(例如增强效应子对抗原识别的反应)。在一些实施例中,结合PD-1的拮抗剂为抗PD-1抗体。抗PD-1抗体的实例包括纳武单抗(BMS-936558)、派姆单抗(MK-3475)、BMS 936558、BMS-936559、TSR-042(Tesaro公司)、ePDR001(诺华公司(Novartis))和皮地利珠单抗(pidilizumab)(CT-011)。在下文提供结合PD-1的拮抗剂的另外的特定实例。

[0189] 在示例性实施例中,结合PD-1的拮抗剂包含结合PD-1的抗原结合蛋白、基本上由其组成或由其组成。在示例性方面中,抗原结合蛋白为结合PD-1的抗体、其抗原结合抗体片段或抗体蛋白产物。

[0190] 在示例性方面中,本披露内容的融合蛋白包含如本文所述的IL-21突变蛋白和抗PD-1抗体(如本文所述)、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物。在示例性情况下,抗PD-1抗体为单克隆IgG。在示例性情况下,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物为单价或二价的。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物结合人类PD-1,其具有SEQ ID NO:263的氨基酸序列。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物结合食蟹猕猴PD-1,其具有SEQ ID NO:264的氨基酸序列。在示例性情况下,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物结合人类PD-1与食蟹猕猴PD-1两者。在示例性情况下,本披露内容的融合蛋白包含IL-21突变蛋白(如本文所述)和抗PD-1抗体(如本文所述)。

[0191] 在示例性实施例下,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物与PD-1的结合强度可根据 K_D 来描述。在示例性方面中,本文提供的抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物的 K_D 为约 $10^{-1}M$ 、约 $10^{-2}M$ 、约 $10^{-3}M$ 、约 $10^{-4}M$ 、约 $10^{-5}M$ 、约 $10^{-6}M$ 、约 $10^{-7}M$ 、约 $10^{-8}M$ 、约 $10^{-9}M$ 或更少。在示例性方面中,本文提供的抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物的 K_D 为微摩尔、纳摩尔、皮摩尔或飞摩尔。在示例性方面中,本文提供的抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物的 K_D 在约 10^{-4} 至 $10^{-6}M$,或 10^{-7} 至 $10^{-9}M$,或 10^{-10} 至 $10^{-12}M$,或 10^{-13} 至 $10^{-15}M$ 范围内。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物对人类PD-1、食蟹猕猴PD-1或两者具有高亲和力。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物对人类PD-1的 K_D 小于100pM,任选地为约1pM至约50pM。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物对人类PD-1的 K_D 在约1pM至约20pM内或小于约10pM。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物对食蟹猕猴PD-1的 K_D 小于100pM,任选地为约1pM至约75pM。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗

PD-1抗体蛋白产物对食蟹猕猴PD-1的 K_D 在约1pM至约20pM内或小于约10pM。

[0192] 在示例性情况下,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物为减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与其一种或多种结合配偶体,诸如PD-L1、PD-L2的相互作用所引起的信号转导的结合PD-1的拮抗剂。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物阻断PD-1结合其配体PD-L1或PD-L2。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物抑制PD-1与PD-L1或PD-L2之间的结合相互作用至少50%。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物展现PD-1与PD-L1或PD-L2之间的结合相互作用至少约50%、至少约60%或至少约70%抑制。

[0193] 在示例性情况下,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物抑制混合淋巴细胞反应(MLR)中PD-1介导的T细胞的IL-2产生。在示例性方面中,MLR中抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物的 IC_{50} 在约0.1nM至约5nM内。在示例性方面中,MLR中抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物的 IC_{50} 小于2nM或小于1nM。在示例性方面中,MLR中抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物的 IC_{50} 为约0.5nM至约2nM。

[0194] 在示例性情况下,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含:(a)选自由SEQ ID NO:312、322、332、342、352、362、372和382(参见表D)组成的组的重链(HC)互补决定区(CDR)1氨基酸序列或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(b)选自由SEQ ID NO:313、323、333、343、353、363、373和383(参见表D)组成的组的HC CDR2氨基酸序列或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(c)选自由SEQ ID NO:314、324、334、344、354、364、374和384(参见表D)组成的组的HC CDR3氨基酸序列或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(d)选自由315、325、335、345、355、365、375和385(参见表D)组成的组的轻链(LC)CDR1氨基酸序列或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(e)选自由316、326、336、346、356、366、376和386(参见表D)组成的组的LC CDR2氨基酸序列或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(f)选自由317、327、337、347、357、367、377和387(参见表D)组成的组的LC CDR3氨基酸序列或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;或(g) (a) - (f)中的任两个、三个、四个、五个或六个的组合。在一些实施例中,抗PD-1抗体蛋白产物包含此类CDR。

[0195] 表D

	20A2	20C1	22D4	20C1.006	20C1.009	20A2.003	22D4.006	22D4.017
[0196] HC CDR1	312	322	332	342	352	362	372	382
HC CDR2	313	323	333	343	353	363	373	383
HC CDR3	314	324	334	344	354	364	374	384
LC CDR1	315	325	335	345	355	365	375	385
LC CDR2	316	326	336	346	356	366	376	386
LC CDR3	317	327	337	347	357	367	377	387

[0197] 数字表示相关SEQ ID NO。

[0198] 在示例性方面中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含表D中阐述的LC CDR1氨基酸序列、LC CDR2氨基酸序列和LC CDR3氨基酸序列以及表D中阐述的HC CDR氨基酸序列中的至少1个或2个。在示例性方面中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含表D中阐述的HC CDR1氨基酸序列、HC CDR2氨基酸序列和HC CDR3氨基酸序列以及表D中阐述的LC CDR氨基酸序列中的至少1个或2个。在一些实施例中,抗PD-1抗体蛋白产物包含此类CDR。

[0199] 在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含由表D的单行中的SEQ ID NO:表示的氨基酸序列中的3个、4个、5个或所有6个。在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含由表D的单行的SEQ ID NO:表示的LC CDR氨基酸序列中的每个,和由表D的同一单行或另一单行中的SEQ ID NO:表示的HC CDR氨基酸序列中的至少1个或2个。在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含由表D的单行的SEQ ID NO:表示的HC CDR氨基酸序列中的每个,和由表D的同一单行或另一单行中的SEQ ID NO:表示的LC CDR氨基酸序列中的至少1个或2个。在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含选自由以下组成的组的六个CDR氨基酸序列:(a) SEQ ID NO:312-317;(b) SEQ ID NO:322-327;(c) SEQ ID NO:332-337;(d) SEQ ID NO:342-347;(e) SEQ ID NO:352-357;(f) SEQ ID NO:362-367;(g) SEQ ID NO:372-377;以及(h) SEQ ID NO:382-387。在特定实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含表D中关于20A2、20C1、22D4、20C1.006、20C1.009、20A2.003、22D4.006或22D4.017抗体中的任一个的所有6个CDR氨基酸序列。在一些实施例中,抗PD-1抗体蛋白产物包含此类CDR。

[0200] 在示例性情况下,表D的氨基酸序列由至少一个或更多个(例如至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个)插入氨基酸分开。在示例性情况下,在LC CDR1与LC CDR2的序列之间存在约10个至约20个氨基酸,且在LC CDR2与LC CDR3的序列之间存在约25个至约40个氨基酸。在示例性情况下,在LC CDR1与LC CDR2的序列之间存在约14个至约16个氨基酸,且在LC CDR2与LC CDR3的序列之间存在约30个至约35个氨基酸。在示例性情况下,在HC CDR1与HC CDR2的序列之间存在约10个至约20个氨基酸,且在HC CDR2与HC CDR3的序列之间存在约25个至约40个氨基酸。在示例性情况下,在HC CDR1与HC CDR2的序列之间存在约14个至约16个氨基酸,且在HC CDR2与HC CDR3的序列之间存在约30个至约35个氨基酸。

[0201] 在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含(a)选自由318、

328、338、348、358、368、378和388 (参见表E) 组成的组的重链可变区氨基酸序列或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的变体序列;或 (b) 选自由319、329、339、349、359、369、379和389 (参见表E) 组成的组的轻链可变区氨基酸序列或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的变体序列;或 (c) (a) 与 (b)。在一些实施例中,抗PD-1抗体蛋白产物包含此类可变区。

[0202] 表E

[0203]

	20A2	20C1	22D4	20C1.006	20C1.009	20A2.003	22D4.006	22D4.017
HC可变	318	328	338	348	358	368	378	388
LC可变	319	329	339	349	359	369	379	389
HC(全长)	320	330	340	350	360	370	380	390
LC(全长)	321	331	341	351	361	371	381	391

[0204] 数字表示相关SEQ ID NO。

[0205] 在示例性实施例中,抗PD-1抗体 (或其抗原结合抗体片段) 包含一对选自由以下组成的组的氨基酸序列: (a) SEQ ID NO:318和319; (b) SEQ ID NO:328和329; (c) SEQ ID NO:338和339; (d) SEQ ID NO:348和349; (e) SEQ ID NO:358和359; (f) SEQ ID NO:368和369; (g) SEQ ID NO:378和379;以及 (h) SEQ ID NO:388和389。

[0206] 在示例性实施例中,抗PD-1抗体 (或其抗原结合抗体片段) 包含 (a) 选自由320、330、340、350、360、370、380和390 (参见表E) 组成的组的重链可变区氨基酸序列或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的变体序列;或 (b) 选自由321、331、341、351、361、371、381和391 (参见表E) 组成的组的轻链可变区氨基酸序列或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的变体序列;或 (c) (a) 与 (b)。在一些实施例中,抗PD-1抗体蛋白产物包含此类可变区。

[0207] 在示例性实施例中,抗PD-1抗体 (或其抗原结合抗体片段) 包含一对选自由以下组成的组的氨基酸序列: (a) SEQ ID NO:320和321; (b) SEQ ID NO:330和331; (c) SEQ ID NO:340和341; (d) SEQ ID NO:350和351; (e) SEQ ID NO:360和361; (f) SEQ ID NO:370和371; (g) SEQ ID NO:380和381;以及 (h) SEQ ID NO:390和391。在一些实施例中,抗PD-1抗体蛋白产物包含此类区域。

[0208] 在示例性方面中,抗PD-1抗体 (或其抗原结合抗体片段) 重链氨基酸序列包含一组如本文所述的电荷对突变。在特定方面中,抗PD-1抗体 (或其抗原结合抗体片段) 重链氨基酸序列包含选自V1、V103和V131电荷对突变的电荷对突变。

[0209] 在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含与以上提及的氨基酸序列类似的氨基酸序列,而抗原结合蛋白基本上保留其生物功能,例如其结合PD-1、例如人类PD-1、食蟹猕猴PD-1或减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与其一种或多种结合配偶体、诸如PD-L1或PD-L2的相互作用所引起的信号转导的能力。

[0210] 在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含相对于以上提及的氨基酸序列仅差异1个、2个、3个、4个、5个、6个或更多个氨基酸的氨基酸序列。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含所提及序列的变体序列,该变体序列相对于所提及序列仅差异一个或两个氨基酸。在示例性方面中,抗原结合蛋白包含一个或多个出现在CDR外的氨基酸取代,例如该一个或多个氨基酸

取代出现在重链或轻链的框架区内。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含一个或多个氨基酸取代,而该抗原结合蛋白保留六个CDR的氨基酸序列。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含相对于以上提及的氨基酸序列具有仅仅1个、2个、3个、4个、5个、6个或更多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0211] 在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含与以上提及的氨基酸序列具有超过或约30%、超过或约50%或超过或约70%序列一致性的氨基酸序列。在示例性方面中,抗原结合蛋白包含与以上提及的氨基酸序列具有至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%或具有超过90%序列一致性的氨基酸序列。在示例性方面中,抗原结合蛋白包含沿以上提及的氨基酸序列全长具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%或具有超过90%序列一致性的氨基酸序列。在示例性方面中,抗原结合蛋白包含沿以上提及的氨基酸序列全长具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的氨基酸序列。

[0212] 在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含所提及序列的变体序列,该变体序列相对于以上提及的序列具有至少或约70%序列一致性。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含所提及序列的变体序列,该变体序列相对于以上提及的序列具有至少或约80%序列一致性。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含所提及序列的变体序列,该变体序列相对于以上提及的序列具有至少或约90%序列一致性。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含所提及序列的变体序列,该变体序列相对于以上提及的序列具有至少或约95%序列一致性。

[0213] 在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含表D的单行中的SEQ ID NO.的一个、两个、三个、四个或五个序列和与SEQ ID NO:312-387中的任一个具有至少或约70%(例如至少约80%、至少约90%、至少约95%)序列一致性的至少一个变体序列。在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含选自以下的一组序列中的一个、两个、三个、四个或五个:(a) SEQ ID NO:312-317;(b) SEQ ID NO:322-327;(c) SEQ ID NO:332-337;(d) SEQ ID NO:342-347;(e) SEQ ID NO:352-357;(f) SEQ ID NO:362-367;(g) SEQ ID NO:372-377;以及(h) SEQ ID NO:382-387,其中该抗体或其片段进一步包含与该组的至少一个序列具有至少或约70%(例如至少约80%、至少约90%、至少约95%)序列一致性的至少一个变体序列。举例而言,在示例性方面中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含SEQ ID NO:312-317的四个序列,即SEQ ID NO:312-315,其中该抗体或其片段包含两个变体序列:一个变体序列与SEQ ID NO:316具有至少或约70%(例如至少约80%、至少约90%)序列一致性,且另一个变体序列与SEQ ID NO:317具有至少或约70%(例如至少约80%、至少约90%、至少约95%)序列一致性。在一些实施例中,抗PD-1抗体蛋白产物包含此类区域。

[0214] 在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)产物包含与SEQ ID NO:318、319、328、329、338、339、348、349、358、359、368、369、378、379、388和389中的任一个具有至少或约70%(例如至少约80%、至少约90%、至少约95%)序列一致性的一对变体序列。在示例性情况下,抗体或其片段包含与以下具有至少或约70%(例如至少约80%、至少约

90%、至少约95%)序列一致性的一对变体序列:(a) SEQ ID NO:318和319;(b) SEQ ID NO:328和329;(c) SEQ ID NO:338和339;(d) SEQ ID NO:348和349;(e) SEQ ID NO:358和359;(f) SEQ ID NO:368和369;(g) SEQ ID NO:378和379;以及(h) SEQ ID NO:388和389。在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含一对序列:一个序列为表E中的一个序列,且另一个序列为与SEQ ID NO:318、319、328、329、338、339、348、349、358、359、368、369、378、379、388和389中的任一个具有至少或约70%(例如至少约80%、至少约90%、至少约95%)序列一致性的变体序列。在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含一对序列:一个序列选自(a) SEQ ID NO:318和319;(b) SEQ ID NO:328和329;(c) SEQ ID NO:338和339;(d) SEQ ID NO:348和349;(e) SEQ ID NO:358和359;(f) SEQ ID NO:368和369;(g) SEQ ID NO:378和379;以及(h) SEQ ID NO:388和389,且另一个序列为与(a) - (u)的序列具有至少或约70%(例如至少约80%、至少约90%、至少约95%)序列一致性的变体序列。举例而言,在示例性方面中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含SEQ ID NO:318的序列且进一步包含与SEQ ID NO 319具有至少或约70%(例如至少约80%、至少约90%、至少约95%)序列一致性的变体序列。在一些实施例中,抗PD-1抗体蛋白产物包含此类区域。

[0215] 在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含与SEQ ID NO:320、321、330、331、340、341、350、351、360、361、370、371、380、381、390和391中的任一个具有至少或约70%(例如至少约80%、至少约90%、至少约95%)序列一致性的一对变体序列。在示例性情况下,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含与以下具有至少或约70%(例如至少约80%、至少约90%、至少约95%)序列一致性的一对变体序列:(a) SEQ ID NO:320和321;(b) SEQ ID NO:330和331;(c) SEQ ID NO:340和341;(d) SEQ ID NO:350和351;(e) SEQ ID NO:360和361;(f) SEQ ID NO:370和371;(g) SEQ ID NO:380和381;以及(h) SEQ ID NO:390和391。在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含一对序列:一个序列为表E中的一个序列,且另一个序列为与SEQ ID NO:320、321、330、331、340、341、350、351、360、361、370、371、380、381、390和391中的任一个具有至少或约70%(例如至少约80%、至少约90%、至少约95%)序列一致性的变体序列。在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含一对序列:一个序列选自(a) SEQ ID NO:320和321;(b) SEQ ID NO:330和331;(c) SEQ ID NO:340和341;(d) SEQ ID NO:350和351;(e) SEQ ID NO:360和361;(f) SEQ ID NO:370和371;(g) SEQ ID NO:380和381;以及(h) SEQ ID NO:390和391,且另一个序列为与(a) - (u)的序列具有至少或约70%(例如至少约80%、至少约90%、至少约95%)序列一致性的变体序列。举例而言,在示例性方面中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含SEQ ID NO:320的序列且进一步包含与SEQ ID NO 321具有至少或约70%(例如至少约80%、至少约90%、至少约95%)序列一致性的变体序列。在一些实施例中,抗PD-1抗体蛋白产物包含此类区域。

[0216] 在其他示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物相对于天然存在的对应物包含一个或多个氨基酸修饰,从而改善半衰期/稳定性或使抗体更适合于表达/制造(例如呈与IL-21突变蛋白的融合蛋白)。在示例性情况下,抗PD-1抗体经设计以预防或减少抗PD-1抗体与Fc受体之间的相互作用。在示例性情况下,抗PD-1抗体为包含缺乏与Fc γ 受体相互作用的能力的恒定区的稳定无效应功能(SEFL)抗体。SEFL抗体

为本领域中已知。参见例如Liu等人, J Biol Chem[生物化学杂志]292:1876-1883(2016); 和Jacobsen等人, J. Biol. Chem. [生物化学杂志]292:1865-1875(2017)。在示例性方面中, SEFL抗体包含以下突变中的一种或多种, 根据EU系统编号: L242C、A287C、R292C、N297G、V302C、L306C和/或K334C。在示例性方面中, SEFL抗体包含N297G。在示例性方面中, SEFL抗体包含A287C、N297G和L306C。在其他示例性方面中, SEFL抗体包含R292C、N297G和V302C(即SEFL2-2)。

[0217] 抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物可包含其他半衰期延长(HLE)修饰。在示例性情况下, HLE修饰存在于重链恒定区中且包含以下突变中的一种或多种, 根据EU系统编号: M252Y、S254T和T256E。在示例性情况下, 抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含M252Y、S254T和T256E中的一种或两种。在示例性情况下, 抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含M252Y、S254T和T256E中的所有三种。在示例性方面中, 重链恒定区包含SEQ ID NO:545或SEQ ID NO:547或SEQ ID NO:549的氨基酸序列或与SEQ ID NO:545或SEQ ID NO:547或SEQ ID NO:549具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。在示例性情况下, HLE修饰存在于重链恒定区中且包含以下突变中的一种或多种, 根据EU系统编号: L309D、Q311H和N434S。在示例性情况下, 抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含L309D、Q311H和N434S中的一种、两种或所有三种。在示例性情况下, 抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含L309D、Q311H和N434S中的所有三种。在示例性方面中, 重链恒定区包含SEQ ID NO:544或SEQ ID NO:546或SEQ ID NO:548的氨基酸序列或与SEQ ID NO:544或SEQ ID NO:546或SEQ ID NO:548具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。

[0218] 在示例性方面中, 抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含SEFL2-2修饰和HLE修饰。在一些情况下, HLE修饰包含M252Y、S254T和T256E中的一种或两种或所有三种。在示例性方面中, 重链恒定区包含SEQ ID NO:551或SEQ ID NO:553或SEQ ID NO:555的氨基酸序列或与SEQ ID NO:551或SEQ ID NO:553或SEQ ID NO:555具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。在一些情况下, HLE修饰包含L309D、Q311H和N434S中的一种或两种或所有三种。在示例性方面中, 重链恒定区包含SEQ ID NO:550或SEQ ID NO:552或SEQ ID NO:554的氨基酸序列或与SEQ ID NO:550或SEQ ID NO:552或SEQ ID NO:554具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。在示例性方面中, 重链另外包含如下所述的电荷对突变。

[0219] 在真核细胞中, 出现两类糖基化反应: (1) N连接的糖基化, 其中聚糖附接于识别序列Asn-X-Thr/Ser的天冬酰胺, 其中“X”为除脯氨酸外的任何氨基酸; 和(2) O连接的糖基化, 其中聚糖附接于丝氨酸或苏氨酸。N连接的糖基化开始于内质网(Endoplasmic Reticulum,

ER)中,其中一组复杂反应引起基本上由两个GlcNAc残基和三个Man残基形成的核心聚糖结构的附接。在ER中形成的聚糖复合物在高尔基体中在酶作用下修饰。若酶相对难以接近该糖,则其通常保持初始HM形式。若酶可接近该糖,则许多Man残基裂解且进一步修饰该糖,产生复合型N聚糖结构。举例而言,位于顺面高尔基体中的甘露糖苷酶-1可裂解或水解HM聚糖,而位于中间高尔基体中的岩藻糖基转移酶FUT-8将聚糖岩藻糖基化(Hanrue Imai-Nishiya (2007), BMC Biotechnology [BMC生物技术], 7:84)。在示例性方面中,抗PD-1抗体经N糖基化,例如包含一个或多个共价附接于重链的特定氨基酸的糖部分(例如聚糖、糖类)。在替代方面中,抗PD-1抗体未经糖基化,或不包含任何共价附接于重链的特定氨基酸的糖部分(例如聚糖、糖类)。

[0220] 在示例性方面中,抗PD-1抗体包含如下重链恒定区,该重链恒定区包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列或与SEQ ID NO:284具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。在示例性方面中,抗PD-1抗体包含如下重链恒定区,该重链恒定区包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列或与SEQ ID NO:284具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列,且进一步包含接头。在示例性情况下,接头包含SEQ ID NO:262的氨基酸序列。因此,在一些示例性方面中,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:287的重链恒定区氨基酸序列或与SEQ ID NO:287具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。在示例性方面中,抗PD-1抗体包含如下重链恒定区,该重链恒定区包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列或与SEQ ID NO:284具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列,其中截断或移除C端Lys。关于此,在一些方面中,抗PD-1抗体包含缺乏C端Lys的重链恒定区,且包含SEQ ID NO:285的氨基酸序列或与SEQ ID NO:285具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。一般而言,在表达期间抗体的C端赖氨酸通过羧肽酶进行裂解。缺乏C端Lys的重链恒定区有利地预防羧肽酶作用于抗PD-1抗体的重链。在示例性方面中,抗PD-1抗体包含缺乏C端Lys的重链恒定区且进一步包含接头。在示例性情况下,接头包含SEQ ID NO:262的氨基酸序列。因此,在一些示例性方面中,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:286的重链恒定区氨基酸序列或与SEQ ID NO:286具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。在示例性方面中,抗PD-1抗体包含如下重链恒定区,该重链恒定区包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列或与SEQ ID NO:284具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列,其中具有一个或多个预防或

减少抗PD-1抗体与Fc受体之间的相互作用的SEFL突变,包括(但不限于)L242C、A287C、R292C、N297G、V302C、L306C和/或K334C。在示例性方面中,SEFL突变为SEFL2-2突变:R292C、N297G和V302C,使得抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:265的重链恒定区氨基酸序列或与SEQ ID NO:265具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。在示例性方面中,抗PD-1抗体包含具有SEFL2-2突变且截断或移除C端Lys的重链恒定区。此类重链恒定区可包含SEQ ID NO:266的序列。在示例性方面中,抗PD-1抗体包含具有SEFL2-2突变且截断或移除C端Lys且具有接头的重链恒定区。此类重链恒定区可包含SEQ ID NO:267的序列。在示例性方面中,抗PD-1抗体包含具有SEFL2-2突变和接头且未截断C端Lys的重链恒定区。此类重链恒定区可包含SEQ ID NO:282的序列。

[0221] 在示例性方面中,IL-21突变蛋白附接于抗PD-1抗体的Fc。在示例性方面中,IL-21突变蛋白附接于抗体的两个重链中的一个。在示例性方面中,IL-21突变蛋白附接于抗体的两个重链中的一个的C端。

[0222] 在示例性方面中,融合蛋白包含仅仅一个IL-21突变蛋白(即融合蛋白包含IL-21突变蛋白单体)。在示例性方面中,IL-21突变蛋白附接于抗体的两个重链中的一个的C端。在示例性方面中,当融合蛋白包含仅仅一个IL-21突变蛋白时,抗体的Fc包含经设计以驱动两个重链(一个重链与IL-21突变蛋白融合且一个重链缺乏IL-21突变蛋白)的异源二聚化的修饰。此类修饰包括Fc突变,诸如杆-臼、DuoBodies、Azymetric、电荷对、HA-TF、SEEDbody和具有差别蛋白A亲和力的修饰。参见例如Spiess等人,Molecular Immunology[分子免疫学],67(2,部分A),2015,第95-106页。杆-臼突变包括第一重链中的T366W,和第二重链中的T366S、L368A和/或Y407V。参见例如Ridgway等人,Protein Eng.[蛋白质工程化],9(1996),第617-621页;和Atwell等人,J.Mol.Biol.[分子生物杂志],270(1997),第26-35页。DuoBody突变包括第一重链中的F405L和第二重链中的K409R。参见例如Labrijn等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊],110(2013),第5145-5150页。Azymetric突变包括第一重链中的T350V、L351Y、F405A和/或Y407V和第二重链中的T350V、T366L、K392L和/或T394W。参见例如Von Kreudenstein等人,mAbs,5(2013),第646-654页。HA-TF突变包括第一重链中的S364H和/或F405A,和第二重链中的Y349T和/或T394F。参见例如Moore等人,mAbs,3(2011),第546-557页。SEEDbody突变包括第一重链中的IgG/A嵌合体突变和第二重链中的IgG/A嵌合体突变。参见例如Davis等人,Protein Eng.Des.Sel.[蛋白质工程化设计与选择],23(2010),第195-202页。差别蛋白A亲和力突变在一个重链中包括H435R且另一重链中无突变。参见例如美国专利第8,586,713号。

[0223] 在一个特定实例中,突变为电荷对突变。以下为此类电荷对突变的实例,根据EU系统编号。电荷对突变包括第一重链中的K409D和第二重链中的D399K;第一重链中的K392D和第二重链中的E356K;或第一重链中的K409D与K392D和第二重链中的D399K与E356K(后者在本文中表示为“V1”)。参见例如Gunasekaran等人,J Biol Chem 285:19637-19646(2010)。在另一个特定实例中,电荷对突变包括第一重链中的K439D、K392D和K409D;和第二重链中的E356K和D399K(本文中表示为“V103”)。在又一个特定实例中,电荷对突变包括第一重链中的K360E、K370E、K392E和K409D;和第二重链中的E357K和D399K(本文中表示为“V131”)。

电荷对突变还可包括第一重链中的K370D和第二重链中的E357K;或第一重链中的K409D、K392D和K370D中所有三个和第二重链中的D399K、E357K和E356K中所有三个(后者在本文中 表示为“V4”)。另外的电荷对突变还包括第一重链中的D221E、P228E和/或L368E和第二重链 中的D221R、P228R和/或K409R。参见例如Strop等人, *J. Mol. Biol.* [分子生物杂志], 420 (2012), 第204-219页。

[0224] 在融合蛋白包含仅仅一个IL-21突变蛋白(即融合蛋白包含IL-21突变蛋白单体) 且重链含有V1电荷对突变的实施例, IL-21突变蛋白可附接于含有K409D和K392D突变的 重链(例如IL-21突变蛋白附接于包含SEQ ID NO:294、296或298的重链)或含有D399K和 E356K突变的重链(例如IL-21突变蛋白附接于包含SEQ ID NO:295、297或299的重链)。在一个 特定实施例中, IL-21突变蛋白附接于含有D399K和E356K突变的重链。

[0225] 在融合蛋白包含仅仅一个IL-21突变蛋白(即融合蛋白包含IL-21突变蛋白单体) 且重链含有V4电荷对突变的实施例, IL-21突变蛋白可附接于含有K409D、K392D和K370D 突变的重链(例如IL-21突变蛋白附接于包含SEQ ID NO:288、290或292的重链)或含有 D399K、E357K和E356K突变的重链(例如IL-21突变蛋白附接于包含SEQ ID NO:289、291、或 293的重链)。在一个特定实施例中, IL-21突变蛋白附接于含有D399K、E357K和E356K突变的 重链。

[0226] 在融合蛋白包含仅仅一个IL-21突变蛋白(即融合蛋白包含IL-21突变蛋白单体) 且重链含有V103电荷对突变的实施例, IL-21突变蛋白可附接于含有K439D、K392D和 K409D突变的重链(例如IL-21突变蛋白附接于包含SEQ ID NO:472、474或476的重链)或含 有E356K和D399K突变的重链(例如IL-21突变蛋白附接于包含SEQ ID NO:473、475或477的 重链)。在一个特定实施例中, IL-21突变蛋白附接于含有E356K和D399K突变的重链。

[0227] 在融合蛋白包含仅仅一个IL-21突变蛋白(即融合蛋白包含IL-21突变蛋白单体) 且重链含有V131电荷对突变的实施例, IL-21突变蛋白可附接于含有K360E、K370E、K392E 和K409D突变的重链(例如IL-21突变蛋白附接于包含SEQ ID NO:478、480或482的重链)或 含有E357K和D399K突变的重链(例如IL-21突变蛋白附接于包含SEQ ID NO:479、481或483 的重链)。在一个特定实施例中, IL-21突变蛋白附接于含有E357K和D399K突变的重链。

[0228] 因此,在示例性方面中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含一组如本文所 述的电荷对突变。在特定方面中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含选自V1、V103和 V131电荷对突变的电荷对突变。

[0229] 在示例性方面中,抗PD-1抗体包含如下重链恒定区,该重链恒定区包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列或与SEQ ID NO:284具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少 约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、 约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列,具有一个或多个电荷 对突变,例如V1、V4、V103或V131电荷对突变。在示例性方面中,抗PD-1抗体包含如下重链恒 定区,该重链恒定区包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列或与SEQ ID NO:284具有至少约 50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90% (例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致 性的氨基酸序列,具有V1电荷对突变,其中第一重链恒定区包含K409和K392D突变且第二重 链恒定区包含D399K和E356K突变。此类第一重链恒定区可包含SEQ ID NO:294的序列且此

类第二重链恒定区可包含SEQ ID NO:295的序列。此类第一和第二重链恒定区可截断或移除C端Lys,使得第一和第二重链恒定区可分别包含SEQ ID NO:296和297。此类第一和第二重链恒定区可截断或移除C端Lys且具有接头,使得第一和第二重链恒定区可分别包含SEQ ID NO:298和299。在示例性方面中,抗PD-1抗体包含含有V1电荷对突变和SEFL2-2突变的重链恒定区。此类包含V1电荷对突变和SEFL2-2突变的第一重链恒定区可包含SEQ ID NO:306的序列且此类包含V1电荷对突变和SEFL2-2突变的第二重链恒定区可包含SEQ ID NO:307的序列。涵盖此类第一和第二重链的另外的变化,包括例如截断或移除C端Lys的重链(SEQ ID NO:308和309)和截断或移除C端Lys且具有接头的重链(SEQ ID NO:310和311)。

[0230] 在示例性方面中,抗PD-1抗体包含如下重链恒定区,该重链恒定区包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列或与SEQ ID NO:284具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列,具有V4电荷对,其中第一重链恒定区包含K409、K392D和K370D突变,且第二重链恒定区包含D399K、E356K和E357K突变。此类第一重链恒定区可包含SEQ ID NO:288的序列且此类第二重链恒定区可包含SEQ ID NO:289的序列。此类第一和第二重链恒定区可截断或移除C端Lys,使得第一和第二重链恒定区可分别包含SEQ ID NO:290和291。此类第一和第二重链恒定区可截断或移除C端Lys且具有接头,使得第一和第二重链恒定区可分别包含SEQ ID NO:292和293。在示例性方面中,抗PD-1抗体包含如下重链恒定区,该重链恒定区包含V4电荷对突变和SEFL2-2突变。此类包含V4电荷对突变和SEFL2-2突变的第一重链恒定区可包含SEQ ID NO:300的序列且此类包含V4电荷对突变和SEFL2-2突变的第二重链恒定区可包含SEQ ID NO:301的序列。涵盖此类第一和第二重链的另外的变化,包括例如截断C端Lys的重链(SEQ ID NO:302和303)和截断或移除C端Lys且具有接头的重链(SEQ ID NO:304和305)。

[0231] 在示例性方面中,抗PD-1抗体包含如下重链恒定区,该重链恒定区包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列或与SEQ ID NO:284具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列,具有V103电荷对突变,其中第一重链恒定区包含SEQ ID NO:484的序列且第二重链恒定区包含SEQ ID NO:485的序列。此类第一和第二重链恒定区可截断或移除C端Lys,使得第一和第二重链恒定区可分别包含SEQ ID NO:486和487。此类第一和第二重链恒定区可截断或移除C端Lys且具有接头,使得第一和第二重链恒定区可分别包含SEQ ID NO:488和489。在示例性方面中,抗PD-1抗体包含含有V103电荷对突变和SEFL2-2突变的重链恒定区。此类包含V103电荷对突变和SEFL2-2突变的第一重链恒定区可包含SEQ ID NO:484的序列且此类包含V103电荷对突变和SEFL2-2突变的第二重链恒定区可包含SEQ ID NO:485的序列。涵盖此类第一和第二重链的另外的变化,包括例如截断C端Lys的重链(SEQ ID NO:486和487)和截断或移除C端Lys且具有接头的重链(SEQ ID NO:488和489)。

[0232] 在示例性方面中,抗PD-1抗体包含如下重链恒定区,该重链恒定区包含SEQ ID NO:284的氨基酸序列或与SEQ ID NO:284具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列,具有V131电荷对突

变,其中第一重链恒定区包含SEQ ID NO:478的序列且第二重链恒定区包含SEQ ID NO:479的序列。此类第一和第二重链恒定区可截断或移除C端Lys,使得第一和第二重链恒定区可分别包含SEQ ID NO:480和481。此类第一和第二重链恒定区可截断或移除C端Lys且具有接头,使得第一和第二重链恒定区可分别包含SEQ ID NO:482和483。在示例性方面中,抗PD-1抗体包含含有V131电荷对突变和SEFL2-2突变的重链恒定区。此类包含V131电荷对突变和SEFL2-2突变的第一重链恒定区可包含SEQ ID NO:490的序列且此类包含V131电荷对突变和SEFL2-2突变的第二重链恒定区可包含SEQ ID NO:491的序列。涵盖此类第一和第二重链的另外的变化,包括例如截断C端Lys的重链(SEQ ID NO:492和493)和截断或移除C端Lys且具有接头的重链(SEQ ID NO:494和495)。

[0233] 在替代方面中,融合蛋白包含超过一种IL-21突变蛋白(即融合蛋白包含IL-21突变蛋白二聚体或IL-21突变蛋白多聚体)。在示例性替代方面中,融合蛋白包含2种、3种或4种(或更多种)IL-21突变蛋白。在示例性方面中,当融合蛋白包含超过一种IL-21突变蛋白时,各IL-21突变蛋白包含相同结构,例如相同氨基酸序列。在示例性情况下,融合蛋白包含IL-21同源二聚体或IL-21同源多聚体。在替代方面中,融合蛋白的各IL-21突变蛋白包含不同结构,例如不同氨基酸序列。在示例性情况下,融合蛋白包含IL-21异源二聚体或IL-21异源多聚体。在示例性情况下,融合蛋白包含两种IL-21突变蛋白,其中第一IL-21突变蛋白连接于第一抗体重链的C端,且第二IL-21突变蛋白连接于第二抗体重链的C端。在示例性方面中,各IL-21突变蛋白具有相同氨基酸序列(例如为IL-21突变蛋白同源二聚体)。在示例性方面中,第一IL-21突变蛋白具有相对于第二IL-21突变蛋白不同的氨基酸序列(例如为IL-21突变蛋白异源二聚体)。

[0234] 关于包含一种或多种IL-21突变蛋白的融合蛋白,各IL-21突变蛋白可在有或无接头下附接于抗体的重链中的一个。在示例性方面中,IL-21突变蛋白经由接头附接于抗体的重链中的一个的C端且该接头为肽。在示例性情况下,肽包含GGGS的氨基酸序列(SEQ ID NO:262)。在替代方面中,IL-21突变蛋白在无接头下附接于抗体的重链中的一个的C端。

[0235] 在示例性方面中,融合蛋白包含仅仅一种IL-21突变蛋白,该IL-21突变蛋白直接附接于抗PD-1抗体的重链中的一个的C端。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含表4中列出的氨基酸取代或表4中列出的SEQ ID NO:的序列。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含表5中列出的氨基酸取代或表5中列出的SEQ ID NO:的序列。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含表7中列出的氨基酸取代或表7中列出的SEQ ID NO:的序列。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含表6和8-14中的任一个中列出的氨基酸取代或这些表中列出的SEQ ID NO:的序列。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含SEQ ID NO:159、161、238、241、242或244中的任一个的氨基酸序列。在示例性方面中,IL-21突变蛋白直接附接于抗PD-1抗体且不包含肽接头。

[0236] 在示例性方面中,融合蛋白包含两种IL-21突变蛋白、各突变蛋白直接附接于抗PD-1抗体的重链的C端且各突变蛋白具有相同氨基酸序列。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含表4中列出的氨基酸取代或表4中列出的SEQ ID NO:的序列。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含表5中列出的氨基酸取代或表5中列出的SEQ ID NO:的序列。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含表7中列出的氨基酸取代或表7中列出的SEQ ID NO:的序列。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含表6和8-14中的任一个中列出的氨基酸取代或这些表中列出

的SEQ ID NO:的序列。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含SEQ ID NO:159、161、237、238、241和244中的任一个的氨基酸序列。在示例性方面中,IL-21突变蛋白直接附接于抗PD-1抗体且不包含肽接头。

[0237] 在示例性方面中,融合蛋白包含与本文所述的任何IL-21突变蛋白的氨基酸序列融合的本文所述的抗体恒定区的氨基酸序列。在示例性方面中,融合蛋白包含与本文所述的任何IL-21突变蛋白的氨基酸序列融合的未糖基化的本文所述的抗体恒定区的氨基酸序列。在示例性情况下,融合蛋白包含与包含SEQ ID NO:3-21、23-56、58-112、114-208、210-222、224-255和283中的任一个或与SEQ ID NO:3-21、23-56、58-112、114-208、210-222、224-255和283具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的IL-21突变蛋白融合的恒定区,该恒定区包含SEQ ID NO:265-267、282、284-311、472-495和544-555中的任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:265-267、282、284-311、472-495和544-555中的任一个具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。在示例性方面中,融合蛋白包含SEQ ID NO:268-281中的任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:268-281具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。

[0238] 在示例性实施例中,融合蛋白包含如图4A、4B或4C中所述的构建体。在示例性实施例中,融合蛋白包含(i)本文所述的抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段);和(ii)本文所述的IL-21突变蛋白。在其他示例性实施例中,融合蛋白包含(i)本文所述的抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段);(ii)本文所述的电荷对突变;和(iii)本文所述的IL-21突变蛋白(参见例如图4C)。在其他示例性实施例中,融合蛋白包含(i)本文所述的抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段),其中所述抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)的重链序列不包含C端赖氨酸;(ii)本文所述的电荷对突变;和(iii)本文所述的IL-21突变蛋白。

[0239] 在示例性情况下,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含:(a)表D中阐述的重链(HC)互补决定区(CDR)1氨基酸序列,或选自由SEQ ID NO:312、322、332、342、352、362、372和382组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(b)表D中阐述的HC CDR2氨基酸序列,或选自由SEQ ID NO:313、323、333、343、353、363、373和383组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(c)表D中阐述的HC CDR3氨基酸序列,或选自由SEQ ID NO:314、324、334、344、354、364、374和384组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(d)表D中阐述的轻链(LC)CDR1氨基酸序列,或选自由315、325、335、345、355、365、375和385组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(e)表D中阐述的LC CDR2氨基酸序列,或选自由316、326、336、346、356、366、376和386组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(f)表D中阐述的LC CDR3氨基酸序列,或选自由317、327、337、347、357、367、377和387组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有

至少或约70%序列一致性的其变体序列;或(g) (a) - (f) 中的任两个或更多个的组合。在示例性方面中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含表D中阐述的LC CDR1氨基酸序列、LC CDR2氨基酸序列和LC CDR3氨基酸序列以及表D中阐述的HC CDR氨基酸序列中的至少1个或2个。在示例性实施例中,抗原结合蛋白包含由表D的单行中的SEQ ID NO:表示的氨基酸序列中的3个、4个、5个或6个。在示例性实施例中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含选自由以下组成的组的六个CDR氨基酸序列:(a) SEQ ID NO:312-317;(b) SEQ ID NO:322-327;(c) SEQ ID NO:332-337;(d) SEQ ID NO:342-347;(e) SEQ ID NO:352-357;(f) SEQ ID NO:362-367;(g) SEQ ID NO:372-377;以及(h) SEQ ID NO:382-387。在一些实施例中,抗PD-1抗体蛋白产物包含此类区域。

[0240] 在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含(a)表E中阐述的重链可变区氨基酸序列,或选自由318、328、338、348、358、368、378和388组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的变体序列;或(b)图E中阐述的轻链可变区氨基酸序列,或选自由319、329、339、349、359、369、379和389组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;或(c) (a) 与(b)。在示例性实施例中,抗PD-1抗体(或其抗原结合抗体片段)包含一对选自由以下组成的组的氨基酸序列:(a) SEQ ID NO:318和319;(b) SEQ ID NO:328和329;(c) SEQ ID NO:338和339;(d) SEQ ID NO:348和349;(e) SEQ ID NO:358和359;(f) SEQ ID NO:368和369;(g) SEQ ID NO:378和379;以及(h) SEQ ID NO:388和389。在示例性情况下,抗体恒定区包含SEQ ID NO:265-267、282和284-311中的任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:265-267、282和284-311中的任一个具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列,其与包含SEQ ID NO:3-21、23-56、58-112、114-208、210-222、224-255和283中的任一个或与SEQ ID NO:3-21、23-56、58-112、114-208、210-222、224-255和283具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列的IL-21突变蛋白融合。在示例性实施例中,抗原结合蛋白包含一对选自由以下组成的组的氨基酸序列:(a) SEQ ID NO:320和321;(b) SEQ ID NO:330和331;(c) SEQ ID NO:340和341;(d) SEQ ID NO:350和351;(e) SEQ ID NO:360和361;(f) SEQ ID NO:370和371;(g) SEQ ID NO:380和381;以及(h) SEQ ID NO:390和391。在示例性实施例中,融合蛋白包含(I)一对选自由以下组成的组的氨基酸序列:(a) SEQ ID NO:320和321;(b) SEQ ID NO:330和331;(c) SEQ ID NO:340和341;(d) SEQ ID NO:350和351;(e) SEQ ID NO:360和361;(f) SEQ ID NO:370和371;(g) SEQ ID NO:380和381;以及(h) SEQ ID NO:390和391,和(II)包含SEQ ID NO:3-21、23-56、58-112、114-208、210-222、224-255和283中的任一个或与SEQ ID NO:3-21、23-56、58-112、114-208、210-222、224-255和283具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列的IL-21突变蛋白。

[0241] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4A中所示的同源二聚体,其中抗PD-1抗体包含抗体20C1.009的三个轻链CDR(SEQ ID NO:355-357)、抗体20C1.009的三个重链CDR(SEQ

ID NO:352-354),且各重链包含含有SEFL2-2突变的恒定区序列(例如SEQ ID NO:265或266),其中两种IL-21突变蛋白中的每个包含氨基酸取代R9E和R76A(即,各包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:358的重链可变区和SEQ ID NO:359的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:360的重链或SEQ ID NO:361的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:361和562或SEQ ID NO:361和563的氨基酸序列的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:361的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:562的氨基酸序列)的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:361的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:563的氨基酸序列)的同源二聚体。

[0242] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4A中所示的同源二聚体,其中抗PD-1抗体包含抗体20C1.009的三个轻链CDR(SEQ ID NO:355-357)、抗体20C1.009的三个重链CDR(SEQ ID NO:352-354),且各重链包含含有SEFL2-2突变的恒定区序列(例如SEQ ID NO:265或266),其中两种IL-21突变蛋白中的每个包含氨基酸取代R9E和R76E(即,各包含SEQ ID NO:245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:358的重链可变区和SEQ ID NO:359的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:360的重链或SEQ ID NO:361的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:361和564或SEQ ID NO:361和565的氨基酸序列的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:361的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:564的氨基酸序列)的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:361的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:565的氨基酸序列)的同源二聚体。

[0243] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4B中所示的同源二聚体,其中抗PD-1抗体包含抗体20C1.009的三个轻链CDR(SEQ ID NO:355-357)、抗体20C1.009的三个重链CDR(SEQ ID NO:352-354),且各重链包含含有SEFL2-2突变和接头的恒定区序列(例如SEQ ID NO:267),其中两种IL-21突变蛋白中的每个包含氨基酸取代R9E和R76A(即,各包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:358的重链可变区和SEQ ID NO:359的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:360的重链或SEQ ID NO:361的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:361和566的氨基酸序列的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:361的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:566的氨基酸序列)的同源二聚体。

[0244] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4B中所示的同源二聚体,其中抗PD-1抗体包含抗体20C1.009的三个轻链CDR(SEQ ID NO:355-357)、抗体20C1.009的三个重链CDR(SEQ ID NO:352-354),且各重链包含含有SEFL2-2突变和接头的恒定区序列(例如SEQ ID NO:267),其中两种IL-21突变蛋白中的每个包含氨基酸取代R9E和R76E(即,各包含SEQ ID NO:245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:358的重链可变区和SEQ ID NO:

359的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:360的重链或SEQ ID NO:361的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:361和567的氨基酸序列的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:361的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:567的氨基酸序列)的同源二聚体。

[0245] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20C1.009的三个轻链CDR(SEQ ID NO:355-357)、抗体20C1.009的三个重链CDR(SEQ ID NO:352-354),和包含含有SEFL2-2突变和V1电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:306和307或SEQ ID NO:308和309),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E356K和D399KV1电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:309中的任一个的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76A(即包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:358的重链可变区和SEQ ID NO:359的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:360的重链或SEQ ID NO:361的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:361和568的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:361的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:568的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:574的氨基酸序列)的单体。

[0246] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20C1.009的三个轻链CDR(SEQ ID NO:355-357)、抗体20C1.009的三个重链CDR(SEQ ID NO:352-354),和包含含有SEFL2-2突变和V103电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:484和485或SEQ ID NO:486和487),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E356K和D399KV103电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:487的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76A(即包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:358的重链可变区和SEQ ID NO:359的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:360的重链或SEQ ID NO:361的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:361和569的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:361的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:569的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:575的氨基酸序列)的单体。

[0247] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20C1.009的三个轻链CDR(SEQ ID NO:355-357)、抗体20C1.009的三个重链CDR(SEQ ID NO:352-354),和包含含有SEFL2-2突变和V131电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:490和491或SEQ ID NO:492和493),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E357K和D399KV131电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:493的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76A(即包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:358的重链可变区和SEQ ID NO:359的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:360的重链或SEQ ID NO:361的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:361和570的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:361的氨基酸

序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:570的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:576的氨基酸序列)的单体。

[0248] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20C1.009的三个轻链CDR(SEQ ID NO:355-357)、抗体20C1.009的三个重链CDR(SEQ ID NO:352-354),和包含含有SEFL2-2突变和V1电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:306和307或SEQ ID NO:308和309),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E356K和D399KV1电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:309的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76E(即包含SEQ ID NO:245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:358的重链可变区和SEQ ID NO:359的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:360的重链或SEQ ID NO:361的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:361和571的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:361的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:571的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:574的氨基酸序列)的单体。

[0249] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20C1.009的三个轻链CDR(SEQ ID NO:355-357)、抗体20C1.009的三个重链CDR(SEQ ID NO:352-354),和包含含有SEFL2-2突变和V103电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:484和485或SEQ ID NO:486和487),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E356K和D399KV103电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:487的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76E(即包含SEQ ID NO:245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:358的重链可变区和SEQ ID NO:359的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:360的重链或SEQ ID NO:361的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:361和572的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:361的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:572的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:575的氨基酸序列)的单体。

[0250] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20C1.009的三个轻链CDR(SEQ ID NO:355-357)、抗体20C1.009的三个重链CDR(SEQ ID NO:352-354),和包含含有SEFL2-2突变和V131电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:490和491或SEQ ID NO:492和493),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E357K和D399K V1电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:493的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76E(即包含SEQ ID NO:245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:358的重链可变区和SEQ ID NO:359的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:360的重链或SEQ ID NO:361的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:361和573的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:573的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:576的氨基酸序列)的单体。

[0251] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4A中所示的同源二聚体,其中抗PD-1抗体包

含抗体22D4.017的三个轻链CDR (SEQ ID NO:385-387)、抗体22D4.017的三个重链CDR (SEQ ID NO:382-384),且各重链包含含有SEFL2-2突变的恒定区序列(例如SEQ ID NO:265或266),其中两种IL-21突变蛋白中的每个包含氨基酸取代R9E和R76A(即,各包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:388的重链可变区和SEQ ID NO:389的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:390的重链或SEQ ID NO:391的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:389和496或SEQ ID NO:389和519的氨基酸序列的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:496的氨基酸序列)的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:519的氨基酸序列)的同源二聚体。

[0252] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4A中所示的同源二聚体,其中抗PD-1抗体包含抗体22D4.017的三个轻链CDR (SEQ ID NO:385-387)、抗体22D4.017的三个重链CDR (SEQ ID NO:382-384),且各重链包含含有SEFL2-2突变的恒定区序列(例如SEQ ID NO:265或266),其中两种IL-21突变蛋白中的每个包含氨基酸取代R9E和R76E(即,各包含SEQ ID NO:245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:388的重链可变区和SEQ ID NO:389的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:390的重链或SEQ ID NO:391的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:389和497或SEQ ID NO:389和498的氨基酸序列的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且融合重链-IL-21突变蛋白包含SEQ ID NO:497的氨基酸序列)的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:498的氨基酸序列)的同源二聚体。

[0253] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4B中所示的同源二聚体,其中抗PD-1抗体包含抗体22D4.017的三个轻链CDR (SEQ ID NO:385-387)、抗体22D4.017的三个重链CDR (SEQ ID NO:382-384),且各重链包含含有SEFL2-2突变和接头的恒定区序列(例如SEQ ID NO:267),其中两种IL-21突变蛋白中的每个包含氨基酸取代R9E和R76A(即,各包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:388的重链可变区和SEQ ID NO:389的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:390的重链或SEQ ID NO:391的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:389和499的氨基酸序列的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:499的氨基酸序列)的同源二聚体。

[0254] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4B中所示的同源二聚体,其中抗PD-1抗体包含抗体22D4.017的三个轻链CDR (SEQ ID NO:385-387)、抗体22D4.017的三个重链CDR (SEQ ID NO:382-384),且各重链包含含有SEFL2-2突变和接头的恒定区序列(例如SEQ ID NO:267),其中两种IL-21突变蛋白中的每个包含氨基酸取代R9E和R76E(即,各包含SEQ ID NO:

245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:388的重链可变区和SEQ ID NO:389的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:390的重链或SEQ ID NO:391的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:389和500的氨基酸序列的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:500的氨基酸序列)的同源二聚体。

[0255] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体22D4.017的三个轻链CDR(SEQ ID NO:385-387)、抗体22D4.017的三个重链CDR(SEQ ID NO:382-384),和包含含有SEFL2-2突变和V1电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:306和307或SEQ ID NO:308和309),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E356K和D399KV1电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:309的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76A(即包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:388的重链可变区和SEQ ID NO:389的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:390的重链或SEQ ID NO:391的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:389和501的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:501的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:556的氨基酸序列)的单体。

[0256] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体22D4.017的三个轻链CDR(SEQ ID NO:385-387)、抗体22D4.017的三个重链CDR(SEQ ID NO:382-384),和包含含有SEFL2-2突变和V103电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:484和485或SEQ ID NO:486和487),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E356K和D399KV103电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:487的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76A(即包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:388的重链可变区和SEQ ID NO:389的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:390的重链或SEQ ID NO:391的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:389和502的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:502的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:557的氨基酸序列)的单体。

[0257] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体22D4.017的三个轻链CDR(SEQ ID NO:385-387)、抗体22D4.017的三个重链CDR(SEQ ID NO:382-384),和包含含有SEFL2-2突变和V131电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:490和491或SEQ ID NO:492和493),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E357K和D399KV131电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:493的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76A(即包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:388的重链可变区和SEQ ID NO:389的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:390的重链或SEQ ID NO:391的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:389和503的氨基酸序列的

单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:503的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:558的氨基酸序列)的单体。

[0258] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体22D4.017的三个轻链CDR(SEQ ID NO:385-387)、抗体22D4.017的三个重链CDR(SEQ ID NO:382-384),和包含含有SEFL2-2突变和V1电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:306和307或SEQ ID NO:308和309),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E356K和D399KV1电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:309的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76E(即包含SEQ ID NO:245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:388的重链可变区和SEQ ID NO:389的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:390的重链或SEQ ID NO:391的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:389和504的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:504的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:556的氨基酸序列)的单体。

[0259] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体22D4.017的三个轻链CDR(SEQ ID NO:385-387)、抗体22D4.017的三个重链CDR(SEQ ID NO:382-384),和包含含有SEFL2-2突变和V103电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:484和485或SEQ ID NO:486和487),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E356K和D399KV103电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:487的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76E(即包含SEQ ID NO:245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:388的重链可变区和SEQ ID NO:389的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:390的重链或SEQ ID NO:391的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:389和505的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:505的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:557的氨基酸序列)的单体。

[0260] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体22D4.017的三个轻链CDR(SEQ ID NO:385-387)、抗体22D4.017的三个重链CDR(SEQ ID NO:382-384),和包含含有SEFL2-2突变和V131电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:490和491或SEQ ID NO:492和493),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E357K和D399KV131电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:493中的任一个的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76E(即包含SEQ ID NO:245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:388的重链可变区和SEQ ID NO:389的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:390的重链或SEQ ID NO:391的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:389和506的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:506的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:558的氨基酸序列)的单体。

[0261] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4A中所示的同源二聚体,其中抗PD-1抗体包含抗体20A2.003的三个轻链CDR (SEQ ID NO:365-367)、抗体20A2.003的三个重链CDR (SEQ ID NO:362-364),且各重链包含含有SEFL2-2突变的恒定区序列(例如SEQ ID NO:265或266),其中两种IL-21突变蛋白中的每个包含氨基酸取代R9E和R76A(即,各包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:368的重链可变区和SEQ ID NO:369的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:370的重链或SEQ ID NO:371的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:369和507或SEQ ID NO:369和508的氨基酸序列的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:507的氨基酸序列)的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:508的氨基酸序列)的同源二聚体。

[0262] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4A中所示的同源二聚体,其中抗PD-1抗体包含抗体20A2.003的三个轻链CDR (SEQ ID NO:365-367)、抗体20A2.003的三个重链CDR (SEQ ID NO:362-364),且各重链包含含有SEFL2-2突变的恒定区序列(例如SEQ ID NO:265或266),其中两种IL-21突变蛋白中的每个包含氨基酸取代R9E和R76E(即,各包含SEQ ID NO:245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:368的重链可变区和SEQ ID NO:369的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:370的重链或SEQ ID NO:371的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:369和509或SEQ ID NO:369和510的氨基酸序列的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:509的氨基酸序列)的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:510的氨基酸序列)的同源二聚体。

[0263] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4B中所示的同源二聚体,其中抗PD-1抗体包含抗体20A2.003的三个轻链CDR (SEQ ID NO:365-367)、抗体20A2.003的三个重链CDR (SEQ ID NO:362-364),且各重链包含含有SEFL2-2突变和接头的恒定区序列(例如SEQ ID NO:267),其中两种IL-21突变蛋白中的每个包含氨基酸取代R9E和R76A(即,各包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:368的重链可变区和SEQ ID NO:369的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:370的重链或SEQ ID NO:371的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:369和511的氨基酸序列的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:511的氨基酸序列)的同源二聚体。

[0264] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4B中所示的同源二聚体,其中抗PD-1抗体包含抗体20A2.003的三个轻链CDR (SEQ ID NO:365-367)、抗体20A2.003的三个重链CDR (SEQ ID NO:362-364),且各重链包含含有SEFL2-2突变和接头的恒定区序列(例如SEQ ID NO:

267),其中两种IL-21突变蛋白中的每个包含氨基酸取代R9E和R76E(即,各包含SEQ ID NO:245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:368的重链可变区和SEQ ID NO:369的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:370的重链或SEQ ID NO:371的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:369和512的氨基酸序列的同源二聚体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:512的氨基酸序列)的同源二聚体。

[0265] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20A2.003的三个轻链CDR(SEQ ID NO:365-367)、抗体20A2.003的三个重链CDR(SEQ ID NO:362-364),和包含含有SEFL2-2突变和V1电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:306和307或SEQ ID NO:308和309),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E356K和D399KV1电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:309中的任一个的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76A(即包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:368的重链可变区和SEQ ID NO:369的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:370的重链或SEQ ID NO:371的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:369和513的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:513的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:559的氨基酸序列)的单体。

[0266] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20A2.003的三个轻链CDR(SEQ ID NO:365-367)、抗体20A2.003的三个重链CDR(SEQ ID NO:362-364),和包含含有SEFL2-2突变和V103电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:484和485或SEQ ID NO:486和487),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E356K和D399KV103电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:487的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76A(即包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:368的重链可变区和SEQ ID NO:369的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:370的重链或SEQ ID NO:371的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:369和514的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:514的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:560的氨基酸序列)的单体。

[0267] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20A2.003的三个轻链CDR(SEQ ID NO:365-367)、抗体20A2.003的三个重链CDR(SEQ ID NO:362-364),和包含含有SEFL2-2突变和V131电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:490和491或SEQ ID NO:492和493),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E357K和D399KV131电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:493的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76A(即包含SEQ ID NO:244的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:368的重链可变区和SEQ ID NO:369的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:370的重链或SEQ ID

NO:371的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:369和515的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:515的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:561的氨基酸序列)的单体。

[0268] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20A2.003的三个轻链CDR(SEQ ID NO:365-367)、抗体20A2.003的三个重链CDR(SEQ ID NO:362-364),和包含含有SEFL2-2突变和V1电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:306和307或SEQ ID NO:308和309),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E356K和D399KV1电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:309的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76E(即包含SEQ ID NO:245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:368的重链可变区和SEQ ID NO:369的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:370的重链或SEQ ID NO:371的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:369和516的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:516的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:559的氨基酸序列)的单体。

[0269] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20A2.003的三个轻链CDR(SEQ ID NO:365-367)、抗体20A2.003的三个重链CDR(SEQ ID NO:362-364),和包含含有SEFL2-2突变和V103电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:484和485或SEQ ID NO:486和487),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E356K和D399KV103电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:487的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76E(即包含SEQ ID NO:245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:368的重链可变区和SEQ ID NO:369的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:370的重链或SEQ ID NO:371的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:369和517的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:517的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:560的氨基酸序列)的单体。

[0270] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20A2.003的三个轻链CDR(SEQ ID NO:365-367)、抗体20A2.003的三个重链CDR(SEQ ID NO:362-364),和包含含有SEFL2-2突变和V131电荷对突变的恒定区序列的一对重链(例如SEQ ID NO:490和491或SEQ ID NO:492和493),其中该IL-21突变蛋白单体附接于含有E357K和D399K V1电荷对突变的重链(例如IL-21突变蛋白单体附接于包含SEQ ID NO:493的重链),且其中该IL-21突变蛋白包含氨基酸取代R9E和R76E(即包含SEQ ID NO:245的序列)。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:368的重链可变区和SEQ ID NO:369的轻链可变区。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:370的重链或SEQ ID NO:371的轻链。在示例性情况下,融合蛋白包含含有SEQ ID NO:369和518的氨基酸序列的单体。在示例性方面中,融合蛋白包含含有两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:518的氨基酸序列,

且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:561的氨基酸序列)的单体。

[0271] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4A或4B中所示的IL-21突变蛋白同源二聚体或如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,和抗PD-1抗体,该抗PD-1抗体包含抗体20A2.003的三个轻链CDR (SEQ ID NO:365-367)、抗体20A2.003的三个重链CDR (SEQ ID NO:362-364),和包含SEQ ID NO 544-555中的任一个的重链恒定区序列。在示例性情况下,融合蛋白包含如图4A或4B中所示的IL-21突变蛋白同源二聚体或如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20A2.003的三个轻链CDR (SEQ ID NO:365-367)、抗体20A2.003的三个重链CDR (SEQ ID NO:362-364),和包含SEQ ID NO:525或527的重链恒定区序列。

[0272] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4A或4B中所示的IL-21突变蛋白同源二聚体或如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体22D4.017的三个轻链CDR (SEQ ID NO:385-387)、抗体22D4.017的三个重链CDR (SEQ ID NO:382-384),和包含SEQ ID NO:544-555中的任一个的重链恒定区序列。在示例性情况下,融合蛋白包含如图4A或4B中所示的IL-21突变蛋白同源二聚体或如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体22D4.017的三个轻链CDR (SEQ ID NO:385-387)、抗体22D4.017的三个重链CDR (SEQ ID NO:382-384),和包含SEQ ID NO 529或531的重链恒定区序列。

[0273] 在示例性情况下,融合蛋白包含如图4A或4B中所示的IL-21突变蛋白同源二聚体或如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20C1.009的三个轻链CDR (SEQ ID NO:355-357)、抗体20C1.009的三个重链CDR (SEQ ID NO:352-354),和包含SEQ ID NO:544-555中的任一个的重链恒定区序列。在示例性情况下,融合蛋白包含如图4A或4B中所示的IL-21突变蛋白同源二聚体或如图4C中所示的IL-21突变蛋白单体,其中抗PD-1抗体包含抗体20C1.009的三个轻链CDR (SEQ ID NO:355-357)、抗体20C1.009的三个重链CDR (SEQ ID NO:352-354),和包含SEQ ID NO:521或523的重链恒定区序列。

[0274] 抗原结合蛋白

[0275] 本披露内容提供PD-1抗原结合蛋白。在示例性方面中,PD-1抗原结合蛋白为本文所述的抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物。在示例性情况下,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含:(a)表D中阐述的重链(HC)互补决定区(CDR)1氨基酸序列,或选自由SEQ ID NO:312、322、332、342、352、362、372和382组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(b)表D中阐述的HC CDR2氨基酸序列,或选自由SEQ ID NO:313、323、333、343、353、363、373和383组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(c)表D中阐述的HC CDR3氨基酸序列,或选自由SEQ ID NO:314、324、334、344、354、364、374和384组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(d)表D中阐述的轻链(LC)CDR1氨基酸序列,或选自由315、325、335、345、355、365、375和385组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(e)表D中阐述的LC CDR2氨基酸序列,或选自由316、326、336、346、356、366、376和386组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(f)表D中阐述的LC CDR3氨基酸序列,或选自由317、327、337、347、357、367、377和387组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;或(g) (a) - (f)中的任两个或更多个的组合。在示例性方面

中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含表D中阐述的LC CDR1氨基酸序列、LC CDR2氨基酸序列和LC CDR3氨基酸序列,和表D中阐述的HC CDR氨基酸序列中的至少1个或2个。在示例性实施例中,抗原结合蛋白包含由表D的单行中的SEQ ID NO:表示的氨基酸序列中的至少3个、4个或5个。

[0276] 在示例性实施例中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含选自以下组成的组的六个CDR氨基酸序列:(a) SEQ ID NO:312-317;(b) SEQ ID NO:322-327;(c) SEQ ID NO:332-337;(d) SEQ ID NO:342-347;(e) SEQ ID NO:352-357;(f) SEQ ID NO:362-367;(g) SEQ ID NO:372-377;以及(h) SEQ ID NO:382-387。在示例性情况下,表D的氨基酸序列由至少一个或更多个(例如至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个)插入氨基酸分开。在示例性实施例中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含(a)表E中阐述的重链可变区氨基酸序列,或选自由318、328、338、348、358、368、378和388组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;或(b)图E中阐述的轻链可变区氨基酸序列,或选自由319、329、339、349、359、369、379和389组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;或(c) (a)与(b)。在示例性实施例中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含一对选自以下组成的组的氨基酸序列:(a) SEQ ID NO:318和319;(b) SEQ ID NO:328和329;(c) SEQ ID NO:338和339;(d) SEQ ID NO:348和349;(e) SEQ ID NO:358和359;(f) SEQ ID NO:368和369;(g) SEQ ID NO:378和379;以及(h) SEQ ID NO:388和389。在示例性方面中,抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物包含:(I)一对选自以下组成的组的氨基酸序列:(a) SEQ ID NO:318和319;(b) SEQ ID NO:328和329;(c) SEQ ID NO:338和339;(d) SEQ ID NO:348和349;(e) SEQ ID NO:358和359;(f) SEQ ID NO:368和369;(g) SEQ ID NO:378和379;以及(h) SEQ ID NO:388和389;和(II)包含SEQ ID NO:265-267、282、284-311、472-495和544-555中的任一个的恒定区。在示例性实施例中,抗原结合蛋白包含一对选自以下组成的组的氨基酸序列:(a) SEQ ID NO:320和321;(b) SEQ ID NO:330和331;(c) SEQ ID NO:340和341;(d) SEQ ID NO:350和351;(e) SEQ ID NO:360和361;(f) SEQ ID NO:370和371;(g) SEQ ID NO:380和381;以及(h) SEQ ID NO:390和391。在示例性实施例中,抗原结合蛋白包含与以上SEQ ID NO:中的一个或多个具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。

[0277] 在一些实施例中,上述抗原结合蛋白为抗PD-1抗体或其抗原结合抗体片段。

[0278] 本披露内容另外提供包含本文所述的PD-1抗原结合蛋白和异源部分的结合物。异源部分可为与本文所述的PD-1抗原结合蛋白不同的任何分子。在示例性方面中,异源部分为异源肽或多肽、靶向剂、诊断标记、聚合物、核酸、量子点、小分子、毒素、碳水化合物、氨基酸或其他治疗剂或诊断剂。在示例性方面中,异源部分为如本文所述的IL-21突变蛋白。

[0279] 本披露内容另外提供包含本文所述的PD-1抗原结合蛋白和异源多肽或异源肽的融合蛋白。在示例性方面中,异源多肽为如本文所述的IL-21突变蛋白。

[0280] 抗体制备方法

[0281] 制备抗体、抗原结合抗体片段和抗体蛋白质产物的合适方法为本领域中已知。举

例而言,用于产生抗体的标准杂交瘤方法描述于例如Harlow和Lane(编辑),Antibodies:A Laboratory Manual,CSH Press[抗体:实验室手册,CSH出版社](1988),以及CA.Janeway等人(编辑),Immunobiology[免疫生物学],第5版,Garland Publishing[加兰出版社],New York,NY[纽约,纽约州](2001)中。一种制备本披露内容的抗PD-1单克隆抗体的示例性方法提供于本文实例中。

[0282] 视宿主物种而定,多种佐剂可用于增加免疫反应,使宿主产生更大量抗体。此类佐剂包括(但不限于)弗氏佐剂(Freund's)、矿物凝胶(诸如氢氧化铝)和表面活性物质(诸如溶血卵磷脂)、普朗尼克多元醇(pluronic polyol)、聚阴离子、肽、油乳液、匙孔血蓝蛋白和二硝基酚。BCG(卡介苗)和短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)为可能适用的人类佐剂。

[0283] 其他产生抗体的方法概述于表F中。

[0284] 表F

技术	示例性参考文献
EBV-杂交瘤方法和噬菌体载体表达系统	Haskard 和 Archer, J. Immunol. Methods [免疫学方法杂志], 74(2), 361-67 (1984), Roder 等人, Methods Enzymol.[酶学方法], 121, 140-67 (1986), 和 Huse 等人, Science [科学], 246, 1275-81 (1989)。
非人类动物中产生抗体的方法	美国专利 5,545,806、5,569,825 和 5,714,352, 以及美国专利申请公开案第 2002/0197266 号
[0285] 诱导淋巴细胞群体中体内产生, 或通过筛选重组免疫球蛋白文库或高度特异性结合试剂的小组	Orlandi 等人 (Proc Natl Acad Sci [国家科学院院刊] 86: 3833-3837; 1989), 以及 Winter G 和 Milstein C (Nature [自然] 349: 293-299, 1991)。
产生重组蛋白的方法	Protein production and purification [蛋白质生产和纯化]" Nat Methods [自然方法] 5(2): 135-146 (2008)。
噬菌体展示	Janeway 等人, 同上, Huse 等人, 同上, 和美国专利 6,265,150)。相关方法还描述于美国专利第 5,403,484 号; 美国专利第 5,571,698 号; 美国专利第 5,837,500 号; 美国专利第 5,702,892 号。以下中描述的技术: 美国专利第 5,780,279 号; 美国专利第 5,821,047 号; 美国专利第 5,824,520 号;
[0286]	美国专利第 5,855,885 号; 美国专利第 5,858,657 号; 美国专利第 5,871,907 号; 美国专利第 5,969,108 号; 美国专利第 6,057,098 号; 以及美国专利第 6,225,447 号
抗体可通过转基因小鼠产生	美国专利第 5,545,806 号和第 5,569,825 号, 以及 Janeway 等人, 同上。

[0287] 测试抗体结合PD-1的能力而不管抗体如何产生的方法为本领域中已知且包括任何抗体-抗原结合测定,诸如放射免疫测定(RIA)、ELISA、蛋白质印迹法、免疫沉淀法、SPR和竞争性抑制测定(参见例如Janeway等人,下文,和美国专利申请公开案第2002/0197266号,以及以上关于竞争测定的章节)。测试抗体与第二抗体竞争结合抗原或其抗原决定基的能力的其他结合测定,例如竞争性结合测定或竞争测定,其为本领域中已知且可用于测试抗体结合PD-1的能力。参见例如美国专利申请公开案第US20140178905号;Chand等人,

Biologicals[生物制剂]46:168-171(2017);Liu等人,Anal Biochem[分析生物化学]525:89-91(2017);和Goolia等人,J Vet Diagn Invest[兽医诊断调查杂志]29(2):250-253(2017)。比较两种抗体的其他方法还为本领域中已知,且包括例如表面等离子共振(SPR)。SPR可用于确定抗体和第二抗体的结合常数且可比较两个结合常数。

[0288] 异源部分:聚合物、碳水化合物、脂质和治疗剂

[0289] 在示例性实施例中,本披露内容的结合物包含连接于聚合物的IL-21突变蛋白。在一些实施例中,聚合物选自由以下组成的组:聚酰胺、聚碳酸酯、聚亚烷基及其衍生物,包括聚烷二醇、聚氧化烯、聚对苯二甲酸伸烷酯、丙烯酸酯与甲基丙烯酸酯的聚合物,包括聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)和聚(丙烯酸十八烷酯);聚乙烯聚合物,包括聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚卤乙烯、聚(乙酸乙烯酯)和聚乙烯吡咯啉酮;聚乙交酯、聚硅氧烷、聚胺酯及其共聚物;纤维素,包括烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、乙酸纤维素、丙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、邻苯二甲酸乙酸纤维素、羧乙基纤维素、三乙酸纤维素和纤维素硫酸钠盐;聚丙烯、聚乙烯,包括聚(乙二醇)、聚(环氧乙烷)和聚(对苯二甲酸乙二酯)和聚苯乙烯。在特定实施例中,聚合物为聚烷二醇,包括例如聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)。

[0290] 在示例性实施例中,本披露内容的结合物包含连接于碳水化合物的IL-21突变蛋白。在一些实施例中,碳水化合物为单糖(例如葡萄糖、半乳糖、果糖)、二糖(例如蔗糖、乳糖、麦芽糖)、寡糖(例如棉子糖、水苏糖)或多糖(例如淀粉、淀粉酶、支链淀粉、纤维素、几丁质、胍胍质、昆布多糖、木聚糖、甘露聚糖、岩藻多糖或半乳甘露聚糖)。

[0291] 在一些实施例中,异源部分为脂质。在一些实施例中,脂质为脂肪酸、类二十烷酸、前列腺素、白细胞三烯、血栓素、N-酰基乙醇胺)、甘油酯(例如单取代、二取代、三取代甘油)、甘油磷脂(例如磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸)、神经鞘脂(例如神经鞘氨醇、神经酰胺)、固醇脂质(例如类固醇、胆固醇)、异戊烯醇脂质、糖脂质或聚酮化合物、油、蜡、胆固醇、固醇、脂溶性维生素、单酸甘油酯、二酸甘油酯、三酸甘油酯、磷脂。

[0292] 在示例性实施例中,本披露内容的结合物包含连接于治疗剂的IL-21突变蛋白。治疗剂可为本领域中已知的那些治疗剂中的任一个。在示例性方面中,治疗剂为免疫治疗剂,只要该治疗剂刺激免疫反应即可。在示例性方面中,免疫治疗剂为癌症疫苗。在示例性方面中,免疫治疗剂为单克隆抗体。在示例性方面中,免疫治疗剂为免疫检查点抑制剂,例如CTLA4、PD-1、PD-L1的抑制剂。在示例性情况下,单克隆抗体对免疫检查点路径中的蛋白质具有特异性。免疫检查点路径的蛋白质可为例如CTLA4、PD-1、PD-L1、B7-H3、B7H4或TIM3。举例而言,本披露内容的抗原结合蛋白可结合阿特珠单抗(atezolizumab)、阿利库单抗(avelumab)、伊匹单抗、曲美利单抗(tremelimumab)、BMS-936558、MK3475、CT-011、AM-224、MDX-1105、IMP321、MGA271。

[0293] 在示例性方面中,治疗剂为有效抑制肿瘤转移和/或对至少一种细胞群体具有抗增生作用的细胞因子、淋巴因子、生长因子或造血因子。此类细胞因子、淋巴因子、生长因子或其他造血因子包括(但不限于):M-CSF、GM-CSF、TNF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、

IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IFN、TNF α 、TNF1、TNF2、G-CSF、Meg-CSF、GM-CSF、血小板生成素、干细胞因子和促红细胞生成素。其他用于本文中的生长因子包括血管生成素、骨形态形成性蛋白质-1、骨形态形成性蛋白质-2、骨形态形成性蛋白质-3、骨形态形成性蛋白质-4、骨形态形成性蛋白质-5、骨形态形成性蛋白质-6、骨形态形成性蛋白质-7、骨形态形成性蛋白质-8、骨形态形成性蛋白质-9、骨形态形成性蛋白质-10、骨形态形成性蛋白质-11、骨形态形成性蛋白质-12、骨形态形成性蛋白质-13、骨形态形成性蛋白质-14、骨形态形成性蛋白质-15、骨形态形成性蛋白质受体IA、骨形态形成性蛋白质受体IB、脑源性神经营养因子、睫状神经生长因子、睫状神经生长因子受体 α 、细胞因子诱导的嗜中性白血球趋化因子1、细胞因子诱导的嗜中性白血球趋化因子2 α 、细胞因子诱导的嗜中性白血球趋化因子2 β 、 β 内皮细胞生长因子、内皮素1、上皮源性嗜中性白血球引诱剂、胶质细胞系衍生的神经营养因子受体 α 1、胶质细胞系衍生的神经营养因子受体 α 2、生长相关蛋白质、生长相关蛋白质 α 、生长相关蛋白质 β 、生长相关蛋白质 γ 、肝素结合表皮生长因子、肝细胞生长因子、肝细胞生长因子受体、胰岛素样生长因子I、胰岛素样生长因子受体、胰岛素样生长因子II、胰岛素样生长因子结合蛋白、角化细胞生长因子、白血病抑制因子、白血病抑制因子受体 α 、神经生长因子神经生长因子受体、神经营养素-3、神经营养素-4、前B细胞生长刺激因子、干细胞因子、干细胞因子受体、转化生长因子 α 、转化生长因子 β 、转化生长因子 β 1、转化生长因子 β 1.2、转化生长因子 β 2、转化生长因子 β 3、转化生长因子 β 5、潜在转化生长因子 β 1、转化生长因子 β 结合蛋白I、转化生长因子 β 结合蛋白II、转化生长因子 β 结合蛋白III、I型肿瘤坏死因子受体、II型肿瘤坏死因子受体、尿激酶型纤维蛋白溶酶原活化物受体和嵌合蛋白质及其生物或免疫活性片段。在示例性实施例中，治疗剂包含对上述细胞因子、淋巴因子、生长因子或其他造血因子中的任一个具有特异性的抗体。

[0294] 核酸

[0295] 本披露内容进一步提供包含编码本披露内容的IL-21突变蛋白、包含IL-21突变蛋白的结合物或包含IL-21突变蛋白的融合蛋白的核苷酸序列的核酸。举例而言，核酸可包含编码抗PD-1抗体的重链的核苷酸序列，后面为编码本披露内容的IL-21突变蛋白的核苷酸序列。编码重链的核苷酸序列和编码IL-21突变蛋白的核苷酸序列可侧接编码包含GGGS的氨基酸序列(SEQ ID NO:262)的肽接头的核苷酸序列。在替代方面中，核酸不包含编码肽接头的核苷酸序列，且编码抗PD-1抗体的重链的核苷酸序列与编码本披露内容的IL-21突变蛋白的核苷酸序列串联。

[0296] 在示例性方面中，核酸包含编码IL-21突变蛋白的核苷酸序列，该IL-21突变蛋白包含SEQ ID NO:3-21、23-56、58-112、114-208、210-222、224-255和283的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3-21、23-56、58-112、114-208、210-222、224-255和283的氨基酸序列具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90% (例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。

[0297] 在示例性方面中，核酸包含编码SEQ ID NO:262或与SEQ ID NO:262具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90% (例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致

性的氨基酸序列的肽接头的核苷酸序列。

[0298] 在示例性方面中,核酸包含编码融合蛋白的核苷酸序列,该融合蛋白包含与本文所述的任何IL-21突变蛋白的氨基酸序列融合的本文所述的抗体恒定区的氨基酸序列。在示例性情况下,核酸包含编码融合蛋白的核苷酸序列,该融合蛋白包含与SEQ ID NO:3-21、23-56、58-112、114-208、210-222、224-255和283中的任一个或与SEQ ID NO:3-21、23-56、58-112、114-208、210-222、224-255和283具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列融合的SEQ ID NO:265-267和282中的任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:265-267和282中的任一个具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。在示例性方面中,核酸包含编码融合蛋白的核苷酸序列,该融合蛋白包含SEQ ID NO:268-281中的任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:268-281具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。

[0299] 在示例性方面中,核酸包含编码抗PD-1抗体的核苷酸序列,该抗PD-1抗体包含SEQ ID NO:265-267、282、284-311、472-495和544-555中的任一个的重链恒定区氨基酸序列或与SEQ ID NO:265-267、282、284-311、472-495和544-555中的任一个具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或具有超过约90%(例如约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)序列一致性的氨基酸序列。

[0300] 本披露内容进一步提供包含编码本披露内容的PD-1抗原结合蛋白的核苷酸序列的核酸。在示例性方面中,核苷酸序列包含编码重链CDR或轻链CDR、重链可变区或轻链可变区或者重链序列或轻链序列的序列。参见下表G。在示例性情况下,核苷酸序列包含SEQ ID NO:392-471中的任一个。本披露内容进一步提供包含以下的成对核苷酸序列:(a) SEQ ID NO:398和399;(b) SEQ ID NO:408和409;(c) SEQ ID NO:418和419;(d) SEQ ID NO:428和429;(e) SEQ ID NO:438和439;(f) SEQ ID NO:448和449;(g) SEQ ID NO:458和459,或(h) SEQ ID NO:468和469。本披露内容另外提供包含以下的成对核苷酸序列:(a) SEQ ID NO:400和401;(b) SEQ ID NO:410和411;(c) SEQ ID NO:420和421;(d) SEQ ID NO:430和431;(e) SEQ ID NO:440和441;(f) SEQ ID NO:450和451;(g) SEQ ID NO:460和461;或(h) SEQ ID NO:470和471。

[0301] 表G

	20A2	20C1	22D4	20C1.006	20C1.009	20A2.003	22D4.006	22D4.017
HC CDR1	392	402	412	422	432	442	452	462
HC CDR2	393	403	413	423	433	443	453	463
HC CDR3	394	404	414	424	434	444	454	464
LC CDR1	395	405	415	425	435	445	455	465
[0302] LC CDR2	396	406	416	426	436	446	456	466
LC CDR3	397	407	417	427	437	447	457	467
HC 可变	398	408	418	428	438	448	458	468
LC 可变	399	409	419	429	439	449	459	469
HC 全长	400	410	420	430	440	450	460	470
LC 全长	401	411	421	431	441	451	461	471

[0303] 在示例性方面中,核酸分子包含编码本披露内容的结合物或融合蛋白的核苷酸序列。如本文所用的“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”,且一般意指DNA或RNA的聚合物或其修饰形式,其可为单链或双链、合成或自天然来源获得(例如分离和/或纯化),其可含有天然、非天然或改变的核苷酸,且其可含有天然、非天然或改变的核苷酸间键,诸如氨基磷酸酯键或硫代磷酸酯键,代替在未修饰的寡核苷酸的核苷酸之间发现的磷酸二酯。核酸可包含编码本披露内容抗原结合蛋白或多肽中的任一个的任何核苷酸序列。在一些实施例中,核酸不包含任何插入、缺失、倒位和/或取代。在其他实施例中,核酸包含一个或多个插入、缺失、倒位和/或取代。

[0304] 在一些方面中,本披露内容的核酸为重组的。如本文所用,术语“重组”是指(i)在活细胞外,通过将天然或合成核酸区段与可在活细胞中复制的核酸分子接合而构建的分子;或(ii)由以上(i)中所述的分子复制产生的分子。出于本文中的目的,复制可为体外复制或体内复制。

[0305] 在一些方面中,核酸基于化学合成和/或酶连接反应使用本领域中已知的程序构建。参见例如Sambrook等人,同上;和Ausubel等人,同上。举例而言,核酸可使用天然存在的核苷酸或经不同修饰的核苷酸化学合成,经不同修饰的核苷酸经设计以增加分子的生物稳定性或增加在杂交后形成的双链体的物理稳定性(例如硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代的核苷酸)。可用于产生核酸的经修饰的核苷酸的实例包括(但不限于)5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫基尿苷、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖基腺苷、肌苷、 N^6 -异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N取代的腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖基腺苷、5'-甲氧基羧基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基硫基- N^6 -异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、Y苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、腺苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧基丙基)尿嘧啶和2,6-二

氨基嘌呤。可替代地,一种或多种本披露内容的核酸可自诸如高分子资源公司(Macromolecular Resources)(科罗拉多州柯林斯堡(Fort Collins,CO))和Synthegen公司(德克萨斯州休斯顿(Houston,TX))的公司购买。

[0306] 载体

[0307] 在一些方面中,本披露内容的核酸并入载体中。关于此,本披露内容提供包含任一本披露内容的核酸的载体。在示例性方面中,载体为重组表达载体。出于本文中的目的,术语“重组表达载体”意指如下经基因修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,当该构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列且载体与宿主细胞在足够使该mRNA、蛋白质、多肽或肽在细胞内表达的条件下接触时允许细胞表达mRNA、蛋白质、多肽或肽。本披露内容的载体总体上是非天然存在的。但是,载体的一部分可为天然存在的。本发明的载体可以包含任一类核苷酸,包括(但不限于)DNA和RNA,其可为单链或双链、合成或部分自天然来源获得,且其可含有天然、非天然或改变的核苷酸。载体可包含天然存在或非天然存在的核苷酸间键或两类键。在一些方面中,改变的核苷酸或非天然存在的核苷酸间键不阻碍载体的转录或复制。

[0308] 本披露内容的载体可为任何合适载体,且可用于转化或转染任何合适宿主。合适的载体包括经设计用于繁殖和扩增或用于表达或两者的那些载体,诸如质粒和病毒。载体可选自由以下组成的组:pUC系列(富酶泰斯生命科学(Fermentas Life Sciences))、pBluescript系列(加利福尼亚州拉霍亚的斯曲杰公司(Stratagene,LaJolla,CA)、pET系列(威斯康星州麦迪逊市的诺瓦基公司(Novagen,Madison,WI)、pGEX系列(瑞典乌普萨拉的法玛西亚生物技术公司(Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden))和pEX系列(加利福尼亚州帕罗奥多的克罗泰克公司(Clontech,Palo Alto,CA))。还可使用噬菌体载体,诸如 λ GT10、 λ GT11、 λ ZapII(斯曲杰公司(Stratagene))、 λ EMBL4和 λ NM1149。植物表达载体的实例包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(克罗泰克公司(Clontech))。动物表达载体的实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(克罗泰克公司(Clontech))。在一些方面中,载体为病毒载体,例如逆转录病毒载体。

[0309] 本披露内容的载体可使用例如Sambrook等人,同上和Ausubel等人,同上中所述的标准重组DNA技术制备。呈圆形或线性的表达载体的构建体可经制备以含有在原核或真核宿主细胞中发挥功能的复制系统。复制系统可源自例如CoIE1、2 μ 质粒、 λ 、SV40、牛乳头状瘤病毒等。

[0310] 在一些方面中,载体包含调节序列,诸如转录和翻译起始和终止密码子,其对于载体将引入的宿主类型(例如细菌、真菌、植物或动物)为特定的,任选地而定,且考虑载体基于DNA还是基于RNA。

[0311] 载体可包括一种或多种标记物基因,其允许选择转化或转染的宿主。标记物基因包括杀生物剂抗性(例如针对抗生素、重金属等的抗性)、营养缺陷型宿主中提供原营养的补充等。适用于本发明的表达载体的标记物基因包括例如新霉素/G418抗性基因、潮霉素抗性基因(hygromycin resistance gene)、组氨酸抗性基因、四环素抗性基因和氨苄西林抗性基因(ampicillin resistance gene)。

[0312] 载体可包含可操作地连接至编码多肽(包括其功能部分和功能变体)的核苷酸序列或与编码IL-21、结合物或融合蛋白的核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列的天然或标

准启动子。例如强、弱、诱导型、组织特异性和发育特异性的启动子的选择在普通技术人员的常规技术范围内。类似地,核苷酸序列与启动子组合还在技术人员的技术范围内。启动子可为非病毒启动子或病毒启动子,例如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子和在鼠科干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。

[0313] 宿主细胞

[0314] 本文提供包含本披露内容的核酸或载体的宿主细胞。如本文所用,术语“宿主细胞”是指可含有本发明的载体且能够产生由核酸编码的表达产物(例如mRNA、蛋白质)的任一类细胞。在一些方面中宿主细胞为黏附细胞或悬浮细胞,即悬浮生长的细胞。在示例性方面中,宿主细胞为培养细胞,或原代细胞,即直接自生物体,例如人类分离。宿主细胞可属于任何细胞类型,可来源于任一类组织,且可处于任何发育阶段。

[0315] 在示例性方面中,细胞为真核细胞,包括(但不限于)酵母细胞、丝状真菌细胞、原生动细胞、藻类细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。本领域中描述此类宿主细胞。参见例如Frenzel等人,Front Immunol[免疫学前沿]4:217(2013)。在示例性方面中,真核细胞为哺乳动物细胞。在示例性方面中,真核细胞为非人类哺乳动物细胞。在一些方面中,细胞为中国卵巢(CHO)细胞及其衍生物(例如CHO-K1、CHO pro-3、CS9)、小鼠骨髓瘤细胞(例如NS0、GS-NS0、Sp2/0)、经工程化而缺乏二氢叶酸还原酶(DHFR)活性的细胞(例如DUKX-X11、DG44)、人类胚肾293(HEK293)细胞或其衍生物(例如HEK293T、HEK293-EBNA)、非洲绿猴肾细胞(例如COS细胞、VERO细胞)、人类宫颈癌细胞(例如HeLa)、人类骨骼骨肉瘤上皮细胞U2-OS、腺癌人类肺泡基底上皮细胞A549、人类纤维肉瘤细胞HT1080、小鼠脑肿瘤细胞CAD、胚胎癌瘤细胞P19、小鼠胚胎纤维母细胞NIH 3T3、小鼠纤维母细胞L929、小鼠神经母细胞瘤细胞N2a、人类乳腺癌细胞MCF-7、视网膜母细胞瘤细胞Y79、人类视网膜母细胞瘤细胞S0-Rb50、人类肝癌细胞Hep G2、小鼠B骨髓瘤细胞J558L或幼仓鼠肾(BHK)细胞(Gaillet等人2007;Khan,Adv Pharm Bull[高级药物通报]3(2):257-263(2013))。在一个特定实施例中,宿主细胞为CS9(CHO细胞系)。

[0316] 出于扩增或复制载体的目的,在一些方面中宿主细胞为原核细胞,例如细菌细胞。

[0317] 本披露内容还提供包含至少一种本文所述的宿主细胞的细胞群体。在一些方面中,细胞群体为除至少一种不包含任一载体的其他细胞外还包含含有所述载体的宿主细胞的异质性群体。可替代地,在一些方面中,细胞群体为基本上同质群体,其中该群体主要包含含有载体的宿主细胞(例如基本上由其组成)。在一些方面中,群体为纯系细胞群体,其中该群体的所有细胞均为包含载体的单一宿主细胞的纯系,使得该群体的所有细胞均包含载体。在本披露内容的示例性实施例中,细胞群体为包含含有如本文所述的载体的宿主细胞的纯系群体。

[0318] 药物组合物

[0319] 本文提供本披露内容的包含IL-21突变蛋白的组合物、包含IL-21突变蛋白的结合物、包含IL-21突变蛋白和多肽的融合蛋白、PD-1抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体)、包含PD-1抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体)的结合物、包含PD-1抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体)的融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞或其组合。在一些方面中,组合物包含呈分离和/或纯化形式的本披露内容的IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体)、结合物、融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞或其组合。在一些方面中,组合物包含单一类型(例如结构)的本

披露内容的IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体)、结合物、融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞,或包含两种或更多种不同类型的本披露内容的IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白、结合物、融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞的组合。

[0320] 在示例性方面中,组合物包含例如经由使用例如IL-21突变蛋白或融合蛋白在某些温度(例如室温)下稳定,增加例如IL-21突变蛋白或融合蛋白的存放期,减少降解、例如氧化蛋白酶介导的降解,增加半衰期等而增强IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体)、结合物、融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞的化学物理特征的剂。在一些方面中,组合物包含本文披露的任一试剂作为异源部分或结合物部分,任选地与本披露内容的IL-21突变蛋白、结合物、融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞混合。

[0321] 在本披露内容的示例性方面中,组合物另外包含药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。在一些实施例中,如本发明披露的IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体)、结合物、融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞(以下称为“活性剂”)配制成包含该活性剂以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂的药物组合物。关于此,本披露内容进一步提供包含活性剂(即本披露内容的IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体)、结合物、融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞中的任一个)的药物组合物,该药物组合物旨在施用至受试者,例如哺乳动物。

[0322] 在一些实施例中,活性剂以适合于施用至患者的纯度水平存在于药物组合物中。在一些实施例中,活性剂具有至少约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的纯度水平,和药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂。在一些实施例中,组合物含有约0.001至约30.0mg/ml的浓度的活性剂。

[0323] 在示例性方面中,药物组合物包含药学上可接受的载剂。如本文所用,术语“药学上可接受的载剂”包括任一标准药物载剂,诸如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(诸如油/水或水/油乳液)和各种类型润湿剂。该术语还涵盖经美国联邦政府的管理机构批准或在美国药典中列出的用于包括人类的动物的任一试剂。

[0324] 药物组合物可包含任何药学上可接受的成分,包括例如酸化剂、添加剂、吸附剂、气溶胶喷射剂、排气剂、碱化剂、防结块剂、抗凝剂、抗微生物防腐剂、抗氧化剂、杀菌剂、碱、黏合剂、缓冲剂、螯合剂、包衣剂、着色剂、干燥剂、洗涤剂、稀释剂、消毒剂、崩解剂、分散剂、溶解增强剂、染料、润肤剂、乳化剂、乳化稳定剂、填充剂、成膜剂、风味增强剂、调味剂、流动增强剂、胶凝剂、造粒剂、保湿剂、润滑剂、黏膜黏附剂、软膏基质、软膏、油质运载体、有机碱、锭剂基质、颜料、增塑剂、抛光剂、防腐剂、多价螯合剂、皮肤渗透剂、增溶剂、溶剂、稳定剂、栓剂基质、表面活性剂(surface active agent)、表面活性剂(surfactant)、悬浮剂、甜味剂、治疗剂、增稠剂、张力剂、毒性剂、增黏剂、吸水剂、水可混溶性共溶剂、水软水剂或润湿剂。参见例如Handbook of Pharmaceutical Excipients[药物赋形剂手册],第三版,A.H.Kibbe(Pharmaceutical Press[医药出版社],London,UK[英国伦敦],2000),将其通过引用以其全文并入。Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学],第十六版,E.W.Martin(Mack Publishing Co. [[麦克出版公司]],Easton,Pa.[宾夕法尼亚州伊斯顿],1980),将其通过引用以其全文并入。

[0325] 在示例性方面中,药物组合物包含在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒的配制品材料。在特定实施例中,药物组合物包含活性剂和一种或多种药学上可接受的盐;多元

醇;表面活性剂;渗透平衡剂;张力剂;抗氧化剂;抗生素;抗霉菌剂;膨胀剂;冻干保护剂;消泡剂;螯合剂;防腐剂;着色剂;止痛剂;或另外的药物试剂。在示例性方面中,任选地除包括但不限于药学上可接受的盐、渗透平衡剂(张力剂)、抗氧化剂、抗生素、抗霉菌剂、膨胀剂、冻干保护剂、消泡剂、螯合剂、防腐剂、着色剂和止痛剂的一种或多种赋形剂外,药物组合物还包含一种或多种多元醇和/或一种或多种表面活性剂。

[0326] 在某些实施例中,药物组合物可含有用于改变、维持或保持例如组合物的pH值、渗透性、黏性、透明度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、分解或释放速率、表面吸收或渗透的配制品材料。在此类实施例中,合适的配制品材料包括(但不限于)氨基酸(诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗微生物剂;抗氧化剂(诸如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(诸如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);膨胀剂(诸如甘露糖醇或甘氨酸);螯合剂(诸如乙二胺四乙酸(EDTA));复合剂(诸如咖啡因、聚乙烯吡咯啉酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精);填充剂;单糖;二糖;以及其他碳水化合物(诸如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、调味剂和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(诸如聚乙烯吡咯啉酮);低分子量多肽;成盐平衡离子(诸如钠);防腐剂(诸如杀藻胺、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定(chlorhexidine)、山梨酸或过氧化氢);溶剂(诸如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(诸如甘露糖醇或山梨糖醇);悬浮剂;表面活性剂或润湿剂(诸如普朗尼克、PEG、脱水山梨糖醇酯、聚山梨酸酯(诸如聚山梨酸酯20)、聚山梨酯、曲通(triton)、缓血酸胺、胆固醇、泰洛沙泊(tyloxapal));稳定性增强剂(诸如蔗糖或山梨糖醇);张力增强剂(诸如碱金属卤化物,优选氯化钠或氯化钾、甘露糖醇、山梨糖醇);递送运载体;稀释剂;赋形剂和/或药物佐剂。参见REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES[雷明顿药物科学],第18版,(A.R.Genrmo编),1990,Mack Publishing Company[麦克出版公司]。

[0327] 药物组合物可经配制以实现生理学上相容的pH值。在一些实施例中,药物组合物的pH值可例如在约4或约5与约8.0之间或约4.5与约7.5之间或约5.0至约7.5。在示例性实施例中,药物组合物的pH值在5.5与7.5之间。

[0328] 施用途径

[0329] 对于本披露内容,活性剂或包含活性剂的药物组合物可经由任何合适施用途径施用至受试者。举例而言,活性剂可经由肠胃外、经鼻、经口、经肺、局部、经阴道或经直肠施用来施用至受试者。以下关于施用途径的论述仅是为描述示例性实施例而提供且不应视为以任何方式限制范围。

[0330] 适合于肠胃外施用的配制品包括水性和非水性的等渗无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使配制品与预期接受者的血液等渗的溶质;以及水性和非水性的无菌悬浮液,其可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。术语“肠胃外”意指不經由消化道,而通过一些其他途径,诸如皮下、肌肉、脊柱内或静脉内。本披露内容的活性剂可与生理学上可接受的稀释剂在药物载剂(诸如无菌液体或液体混合物,包括水、生理盐水、右旋糖水溶液和相关糖溶液、醇(诸如乙醇或十六醇)、二醇(诸如丙二醇或聚乙二醇)、二甲亚砜、甘油、缩酮(诸如2,2-二甲基-153-二氧戊环-4-甲醇)、醚、聚(乙二醇)400、油类、脂肪酸、脂肪酸酯或甘油酯或乙酰化脂肪酸甘油酯)中施用,添加或未添加药学上可接受的表面活性剂,诸如脂肪酸盐或洗涤剂、悬浮剂(诸如果胶、卡波姆(carbomer)、甲基纤维素、羟丙

基甲基纤维素或羧甲基纤维素)或乳化剂和其他药物佐剂。

[0331] 可用于肠胃外配制品中的油类包括石油、动物油、植物油或合成油。油类的特定实例包括花生油、大豆油、芝麻油、棉籽油、玉米油、橄榄油、石蜡油和矿物油。合适用于在肠胃外配制品中使用的脂肪酸包括油酸、硬脂酸和异硬脂酸。油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯为合适脂肪酸酯的实例。

[0332] 用于肠胃外配制品中的合适脂肪酸盐包括脂肪族碱金属盐、铵盐和三乙醇胺盐,且合适的洗涤剂包括(a)阳离子型洗涤剂,诸如卤化二甲基二烷基铵和卤化烷基吡啶;(b)阴离子型洗涤剂,诸如烷基、芳基和烯烴磺酸酯、烷基、烯烴、醚和单酸甘油酯硫酸酯和磺基丁二酸酯;(c)非离子型洗涤剂,诸如脂肪胺氧化物、脂肪酸烷醇酰胺和聚氧乙烯聚丙烯共聚物;(d)两性洗涤剂,诸如烷基- β -氨基丙酸酯和2-烷基-咪唑啉季铵盐;和(e)其混合物。

[0333] 在一些实施例中,肠胃外配制品在溶液中含有约0.5重量%至约25重量%的本披露内容的活性剂。可使用防腐剂和缓冲剂。为最小化或消除对注射部位的刺激,此类组合物可含有一种或多种亲水亲油平衡(HLB)为约12至约17的非离子型表面活性剂。此类配制品中表面活性剂的量通常在约5重量%至约15重量%范围内。合适的表面活性剂包括聚乙二醇脱水山梨糖醇脂肪酸酯,诸如脱水山梨糖醇单油酸酯和环氧乙烷与由环氧丙烷与丙二醇缩合形成的疏水性基质的高分子量加合物。在一些方面中肠胃外配制品呈单位剂量或多剂量密封容器,诸如安瓿和小瓶呈现,且可储存在冷冻干燥(冻干)条件下,仅仅需要在临用前添加无菌液体赋形剂,例如注射用水。在一些方面中,自先前描述的种类的无菌粉末、颗粒和片剂制备临时配制的注射溶液和悬浮液。

[0334] 可注射配制品是根据本披露内容。对于可注射组合物的有效药物载剂的要求为本领域普通技术人员熟知(参见例如Pharmaceutics and Pharmacy Practice[药学和药学实践],J.B.Lippincott Company[J.B.利平科特公司],Philadelphia,PA[宾夕法尼亚州费城],Banker和Chalmers编辑,第238-250页(1982),和,以及ASHP Handbook on Injectable Drugs[可注射药物手册],Toissel,第4版,第622-630页(1986))。

[0335] 剂量

[0336] 据信本披露内容的活性剂可用于如本文所述的抑制PD-1信号传导,同时提供IL-21信号传导的方法中,且因此据信其可用于治疗或预防一种或多种疾病,例如癌症的方法中。出于本披露内容的目的,施用的活性剂的量或剂量应足够在合理时间范围内在受试者或动物中实现例如治疗或预防作用。举例而言,本披露内容的活性剂的剂量应足够自施用时间起,在约1至4分钟、1至4小时或1至4周或更长时间,例如5至20周或更多周的时间内治疗如本文所述的癌症。在某些实施例中,时间段可甚至更长。剂量将由特定活性剂的功效和待治疗的动物(例如人类)的情况以及待治疗的动物(例如人类)的体重决定。

[0337] 用于确定施用剂量的许多测定为本领域中已知。出于本文中的目的,包含比较在向一组哺乳动物中的一种哺乳动物施用既定剂量的本披露内容的活性剂后癌症治疗程度的测定可用于确定施用至哺乳动物的起始剂量,各组哺乳动物给予不同剂量的活性剂。在施用一定剂量后的癌症治疗程度可由小鼠异种移植模型中例如活性剂的细胞毒性或用活性剂下实现的肿瘤消退程度表示。测量融合蛋白的细胞毒性的方法和测定肿瘤消退的方法为本领域中已知。

[0338] 本披露内容的活性剂的剂量还由可能伴随本披露内容的特定活性剂施用的任何

不良副作用的存在、性质和程度决定。通常,主治医师将考虑多种因素,诸如年龄、体重、整体健康、饮食、性别、待施用的本披露内容的活性剂、施用途径和所治疗的病状的严重程度来决定本披露内容的活性剂的剂量以治疗每个单独的患者。借助于实例且不旨在限制本披露内容,本披露内容的活性剂的剂量可为每天每千克所治疗的受试者体重约0.0001至约1g、约0.0001至约0.001g或约0.01mg至约1g。

[0339] 控制释放配制品

[0340] 在一些实施例中,本文所述的活性剂可经修饰成积存形式,使得本披露内容的活性剂释放至其施用的身体的方式在体内时间和位置方面获得控制(参见例如美国专利第4,450,150号)。本披露内容的活性剂的积存形式可为例如包含活性剂和多孔或无孔材料,诸如聚合物的可植入组合物,其中活性剂由该材料囊封或扩散在该材料中和/或无孔材料降解。接着积存物植入受试者体内的所需位置,且活性剂以预定速率自植入物释放。

[0341] 在某些方面中,包含活性剂的药物组合物经修饰以具有任何类型的体内释放概况。在一些方面中,药物组合物为立即释放、控制释放、持续释放、延长释放、延迟释放或两相释放配制品。配制用于控制释放的肽的方法为本领域中已知。参见例如Qian等人,JPharm [药学杂志]374:46-52(2009)和国际专利申请公开案第W0 2008/130158号、第W02004/033036号、第W02000/032218号和第W0 1999/040942号。

[0342] 本发明的组合物可进一步包含例如胶束或脂质体或一些其他囊封形式,或可呈延长释放形式施用以提供长期储存和/或递送作用。

[0343] 组合

[0344] 在一些实施例中,本文所述的融合蛋白或抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物)单独施用,且在替代实施例中,与另一治疗剂(例如不同类型(例如结构)的本发明的另一活性剂)组合施用。在一些方面中,另一治疗剂旨在治疗或预防癌症。在一些实施例中,另一治疗剂为化学治疗剂。在一些实施例中,另一治疗剂为用于治疗癌症的放射疗法中的药剂。因此,在一些方面中,本文所述的融合蛋白或抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物)与铂配位化合物、拓扑异构酶抑制剂、抗生素、抗有丝分裂生物碱和二氟核苷中的一种或多种组合施用。在示范性方面中,本文所述的IL-21融合蛋白(例如与IL-21突变蛋白融合的抗PD-1抗体)与抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体、其抗原结合抗体片段或抗PD-1抗体蛋白产物)组合。

[0345] 在特定实例中,抗体20A2、20C1、22D4、20C1.006、20C1.009、20A2.003、22D4.006、22D4.017中的任一个与本文所述的IL-21融合蛋白组合施用,包括例如:包含选自以下的同源二聚体或单体的融合蛋白:

[0346] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:496的氨基酸序列)的同源二聚体;

[0347] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且融合的重链-IL-21突变蛋白包含SEQ ID NO:497的氨基酸序列)的同源二聚体;

[0348] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:498的氨基酸序列)的

同源二聚体；

[0349] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:499的氨基酸序列)的同源二聚体；

[0350] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:500的氨基酸序列)的同源二聚体；

[0351] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:501的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:555的氨基酸序列)的单体；

[0352] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:502的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:556的氨基酸序列)的单体；

[0353] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:503的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:557的氨基酸序列)的单体；

[0354] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:504的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:555的氨基酸序列)的单体；

[0355] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:505的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:556的氨基酸序列)的单体；

[0356] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:391的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:506的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:557的氨基酸序列)的单体；

[0357] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:507的氨基酸序列)的同源二聚体；

[0358] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:508的氨基酸序列)的同源二聚体；

[0359] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:509的氨基酸序列)的同源二聚体；

[0360] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:510的氨基酸序列)的同源二聚体；

[0361] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:511的氨基酸序列)的

同源二聚体；

[0362] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条抗体重链(各与IL-21突变蛋白融合且各重链-IL-21突变蛋白融合物包含SEQ ID NO:512的氨基酸序列)的同源二聚体；

[0363] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:513的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:558的氨基酸序列)的单体；

[0364] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:514的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:559的氨基酸序列)的单体；

[0365] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:515的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:560的氨基酸序列)的单体；

[0366] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:516的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:558的氨基酸序列)的单体；

[0367] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:517的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:559的氨基酸序列)的单体；或

[0368] 包含两条抗体轻链(各包含SEQ ID NO:371的氨基酸序列)和两条不同抗体重链(一条与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:518的氨基酸序列,且一条不与IL-21突变蛋白融合且包含SEQ ID NO:560的氨基酸序列)的单体。

[0369] 试剂盒

[0370] 本披露内容另外提供包含本披露内容的IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体)、结合物、融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞或其组合的试剂盒。在示例性方面中,试剂盒在容器中包含至少一种本披露内容的IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体)、结合物、融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞或其组合。在示例性方面中,至少一种本披露内容的IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体)、结合物、融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞呈单位剂量提供于试剂盒中。出于本文中的目的,“单位剂量”是指分散在合适载剂中的离散量。在示例性方面中,单位剂量为足够向受试者提供所需作用,例如治疗癌症的量。在示例性方面中,试剂盒包含若干个单位剂量,例如一周或一个月的单位剂量供应,任选地,每个单位剂量单独地包装或以其他方式与其他单位剂量分离。在一些实施例中,试剂盒/单位剂量的组分与关于施用至患者的说明书一起包装。在一些实施例中,试剂盒包含一种或多种用于施用至患者的装置,例如针和注射器等。在一些方面中,至少一种本披露内容的IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体)、结合物、融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞或其组合呈备用形式,例如注射器、静脉内袋等预先包装。在示例性方面中,备用形式是一次性使用。在示例性方面中,试剂盒包含至少一种本披露内容的IL-21突变蛋白、PD-1抗原结合蛋白(例如抗PD-1抗体)、结合物、融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞的多个一次性使用的备用形式。在一些方面中,试剂盒进一步包含其他治疗剂或诊断剂或

药上可接受的载体(例如溶剂、缓冲剂、稀释剂等),包括本文所述的那些剂中的任一个。

[0371] 制造方法

[0372] 本披露内容的IL-21突变蛋白可通过本领域中已知的方法获得。重新合成多肽的合适方法描述于例如以下中:Chan等人,Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis[Fmoc固相肽合成],Oxford University Press,Oxford,United Kingdom[牛津大学出版社,英国牛津],2005;Peptide and Protein Drug Analysis[肽和蛋白药物分析],编辑Reid,R., Marcel Dekker, Inc.[马塞尔德克尔公司],2000;Epitope Mapping[表位作图],编辑Westwood等人,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom[牛津大学出版社,英国牛津],2000;和美国专利第5,449,752号。制造本发明的肽的其他示例性方法阐述于本文中。

[0373] 在一些实施例中,本文所述的IL-21突变蛋白由诸如Synpep公司(加利福尼亚州都柏林(Dublin,CA))、肽技术公司(Peptide Technologies Corp.)(马里兰州盖瑟斯堡(Gaithersburg,MD))、多肽系统公司(Multiple Peptide Systems)(加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego,CA))、肽2.0公司(Peptide 2.0 Inc.)(弗吉尼亚州尚蒂伊(Chantilly,VA))和美国多肽公司(American Peptide Co.)(加利福尼亚州森尼韦尔(Sunnyvale,CA))的公司商业上合成。在此方面,IL-21突变蛋白可为合成、重组、分离和/或纯化的。

[0374] 此外,在一些方面中,IL-21突变蛋白使用编码肽的氨基酸序列的核酸,使用标准重组方法重组产生。参见例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual.[分子克隆:实验室手册]第3版,Cold Spring Harbor Press[冷泉港出版社],Cold Spring Harbor,NY[纽约州冷泉港]2001;和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学现代方法],Greene Publishing Associates[格林出版公司]和John Wiley&Sons[约翰·威利父子公司],NY[纽约州],1994。

[0375] 本文提供制造IL-21突变蛋白的方法。在示例性实施例中,该方法包括培养本披露内容的宿主细胞以表达IL-21突变蛋白且收获所表达的IL-21突变蛋白。

[0376] 本文还提供制造包含IL-21突变蛋白的融合蛋白的方法。在示例性实施例中,该方法包括培养本披露内容的宿主细胞以表达融合蛋白且收获所表达的融合蛋白。

[0377] 在示例性实施例中,该方法包括培养包含编码如本文所述的IL-21突变蛋白或融合蛋白的核酸的宿主细胞以表达该IL-21突变蛋白或融合蛋白。宿主细胞可为本文所述的宿主细胞中的任一个。在示例性方面中,宿主细胞选自由以下组成的组:CHO细胞、NS0细胞、COS细胞、VERO细胞和BHK细胞。在示例性方面中,培养宿主细胞的步骤包括在生长培养基中培养宿主细胞以支持宿主细胞的生长和扩增。在示例性方面中,生长培养基以及时方式增加细胞密度、培养活力和生产能力。在示例性方面中,生长培养基包含氨基酸、维生素、无机盐、葡萄糖和血清作为生长因子、激素和附着因子的来源。在示例性方面中,生长培养基为由氨基酸、维生素、微量元素、无机盐、脂质和胰岛素或胰岛素样生长因子组成的化学成分完全确定的培养基。除营养素外,生长培养基还帮助维持pH值和渗透压。若干生长培养基可商购且描述于本领域中。参见例如Arora,“Cell Culture Media:A Review[细胞培养基:评论]”MATERMETHODS[材料方法]3:175(2013)。

[0378] 在示例性方面中,制造本披露内容的IL-21突变蛋白或融合蛋白的方法包括在进料培养基中培养宿主细胞。在示例性方面中,该方法包括在进料培养基中以分批进料模式

培养。重组蛋白质产生的方法为本领域中已知。参见例如Li等人,“Cell culture processes for monoclonal antibody production[用于单克隆抗体生产的细胞培养过程]”MAbs 2(5):466-477(2010)。

[0379] 制造IL-21突变蛋白或融合蛋白的方法可包括用于自细胞培养物或其上清液纯化突变蛋白或蛋白质且优选回收所纯化的蛋白质的一个或多个步骤。在示例性方面中,该方法包括一个或多个层析步骤,例如亲和层析(例如蛋白A亲和层析)、离子交换层析、疏水性相互作用层析。在示例性方面中,该方法包括使用蛋白A亲和层析树脂纯化蛋白质。

[0380] 在示例性实施例中,该方法进一步包括用于配制所纯化的蛋白质等,从而获得包含所纯化的蛋白质的配制品的步骤。此类步骤描述于Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing[制造用配制和工艺开发策略],编辑Jameel和Hershenson,John Wiley&Sons,Inc.[约翰·威利父子公司](Hoboken,NJ[新泽西州霍博肯市]),2010中。

[0381] 使用方法

[0382] 本披露内容另外提供治疗方法。在示例性实施例中,该方法为一种治疗有需要的受试者的方法,其包括向有需要的受试者施用有效治疗受试者的量的本披露内容的药物组合物。

[0383] 本披露内容的药物组合物可用于抑制PD-1信号传导和/或活化IL-21信号传导。不限于特定理论,[1]本文提供的组合物的PD-1抑制活性允许此类实体用于增强T细胞活性和增强免疫反应,和尤其针对肿瘤或癌症的免疫反应的方法中;和/或[2]本文提供的组合物的IL-21活化活性允许此类实体增强T细胞存活和效应功能,限制终末分化和复制潜能丧失,通过将活化的效应细胞改变成更天然的T细胞表型(例如通过增强CCR7表达)促进T细胞寿命,且增强针对靶标(例如癌症)细胞的细胞毒性(例如通过增加IFN γ 和颗粒酶B产生)。

[0384] 因此,本文提供增强受试者中的T细胞活性、增强T细胞存活和效应功能、限制终末分化和复制潜能丧失、促进T细胞寿命和增强针对靶标(例如癌症)细胞的细胞毒性的方法。在示例性实施例中,这些方法包括向受试者施用有效量的本披露内容的药物组合物。在示例性方面中,T细胞活性或免疫反应是针对癌细胞或癌症组织或肿瘤细胞或肿瘤。在示例性方面中,免疫反应为体液免疫反应。在示例性方面中,免疫反应为先天性免疫反应。在示例性方面中,增强的免疫反应为T细胞介导的免疫反应。

[0385] 如本文所用,术语“增强”和源自其的词可能不为100%或完全增强或增加。更确切些,存在本领域中普通技术人员认为具有潜在益处或治疗作用的不同程度的增强。在此方面,本披露内容的药物组合物可增强例如T细胞活性或增强免疫反应至任何量或水平。在示例性实施例中,由本披露内容的方法提供的增强为至少或约10%增强(例如至少或约20%增强、至少或约30%增强、至少或约40%增强、至少或约50%增强、至少或约60%增强、至少或约70%增强、至少或约80%增强、至少或约90%增强、至少或约95%增强、至少或约98%增强)。

[0386] 测量T细胞活性和免疫反应的方法为本领域中已知。T细胞活性可通过例如细胞毒性测定,诸如Fu等人,PLoS ONE[公共科学图书馆·综合]5(7):e11867(2010)中描述的那些测量。其他T细胞活性测定描述于Bercovici等人,Clin Diagn Lab Immunol.[临床诊断实验室免疫]7(6):859-864(2000)中。测量免疫反应的方法描述于例如Macatangay等人,Clin

Vaccine Immunol [临床与疫苗免疫学] 17 (9) :1452-1459 (2010) 和Clay等人, Clin Cancer Res. [临床癌症研究] 7 (5) :1127-35 (2001) 中。

[0387] 本文另外提供治疗患有癌症的受试者的方法和治疗具有实体瘤的受试者的方法。在示例性实施例中,该方法包括向受试者施用有效治疗受试者的癌症或实体瘤的量的本披露内容的药物组合物。可由本文披露的方法治疗的癌症可为任何癌症,例如由异常和不受控制的细胞分裂引起的可经由淋巴系统或血流扩散至身体其他部分的任何恶性生长或肿瘤。在一些方面中,癌症为选自以下组成的组的癌症:急性淋巴细胞癌,急性骨髓性白血病,腺泡状横纹肌肉瘤,骨癌,脑癌,乳癌,肛门、肛管或肛门直肠的癌症,眼癌、肝内胆管癌,关节癌,颈、胆囊或胸膜的癌症,鼻、鼻腔或中耳的癌症,口腔癌,外阴癌,慢性淋巴细胞性白血病,慢性髓细胞样癌,结肠癌,食道癌,子宫颈癌,胃肠道类癌肿瘤,霍奇金氏淋巴瘤,舌癌,肾癌,喉癌,肝癌,肺癌,恶性间皮瘤,黑色素瘤,多发性骨髓瘤,鼻咽癌,非霍奇金淋巴瘤,卵巢癌,胰脏癌,腹膜、网膜和肠系膜癌,咽癌,前列腺癌,直肠癌,肾癌(例如肾细胞癌(RCC)),小肠癌,软组织癌,胃癌、睾丸癌,甲状腺癌,输尿管癌和膀胱癌。在特定方面中,癌症选自以下组成的组:头颈部癌、卵巢癌、子宫颈癌、膀胱和食管癌、胰脏癌、胃肠癌、胃癌、乳癌、子宫内膜癌和结肠直肠癌、肝细胞癌、胶质母细胞瘤、膀胱癌、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC))、细支气管肺泡癌。在特定实施例中,肿瘤为非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈部癌、肾癌、三阴性乳癌和胃癌。在示例性方面中,受试者具有肿瘤(例如实体瘤、血液系统恶性肿瘤或淋巴类恶性肿瘤)且向该受试者施用有效治疗受试者的肿瘤的量的药物组合物。在其他示例性方面中,肿瘤为非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、头颈部癌、肾癌、乳癌、黑色素瘤、卵巢癌、肝癌、胰脏癌、结肠癌、前列腺癌、胃癌、淋巴瘤或白血病,且向受试者施用有效治疗受试者的肿瘤的量的药物组合物。

[0388] 如本文所用,术语“治疗”以及与其相关的词不一定暗示100%或完全治疗。更确切些,存在本领域中普通技术人员认为具有潜在益处或治疗作用的不同程度的治疗。在此方面,本披露内容的癌症治疗方法可提供任何量或任何水平的治疗。此外,由本披露内容的方法提供的治疗可包括治疗所治疗癌症的一种或多种病状或症状或体征。由本披露内容的方法提供的治疗还可涵盖减缓癌症的进展。举例而言,这些方法可通过增强T细胞活性或针对癌症的免疫反应,减少肿瘤或癌症生长,减少肿瘤细胞转移,增加肿瘤或癌细胞的细胞死亡等而治疗癌症。在示例性方面中,方法借助于延迟癌症发作或复发1天、2天、4天、6天、8天、10天、15天、30天、两个月、4个月、6个月、1年、2年、4年或更长时间而进行治疗。在示例性方面中,这些方法借助于增加受试者的存活而治疗。

[0389] 受试者

[0390] 在本披露内容的一些实施例中,受试者为哺乳动物,包括(但不限于)啮齿目哺乳动物,诸如小鼠和仓鼠;和兔目哺乳动物,诸如兔;来自食肉目的哺乳动物,包括猫科动物(猫)和犬科动物(犬);来自偶蹄目的哺乳动物,包括牛科动物(奶牛)和猪科动物(猪);或奇蹄目,包括马科动物(马)。在一些方面中,哺乳动物属于灵长目、阔鼻小目(Ceboid)或猴目(Simoid)(猴)或类人猿目(人类和猿类)。在一些方面中,哺乳动物为人类。

[0391] 示例性实施例

[0392] 在示例性实施例中,本披露内容提供包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的IL-21突变蛋白,

[0393] QGQDX HMXXM XXXXX XVDXL KNXVN DLVPE FLPAPEDVET NCEWS AFSCF QKAQL KSANT GNEX XIXXX XXXLXXXXXX TNAGR RQKHR LTCPS CDSYE KKPPK EFLXX FXXLLXXMX QHXSS RTHGS EDS (SEQ ID NO:2), 其中“X”表示任何氨基酸,且其中该IL-21突变蛋白氨基酸序列与人类IL-21的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 差异至少1个氨基酸。

[0394] 在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含与人类IL-21的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 差异不超过7个氨基酸的氨基酸序列。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含与人类IL-21的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 差异3个、4个、5个或6个氨基酸的氨基酸序列。在示例性情况下,IL-21突变蛋白包含与人类IL-21的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 差异1或2个氨基酸的氨基酸序列。在示例性方面中,IL-21突变蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列之间的差异在SEQ ID NO:2的氨基酸10-15 (包括氨基酸10和15) 或氨基酸105-123 (包括氨基酸105和123) 内,任选地,其中差异出现在SEQ ID NO:2的氨基酸11、14、15、109、110、112、113、116、119、120和/或123处。在示例性方面中,IL-21突变蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸序列之间的差异在SEQ ID NO:2的氨基酸5-25 (包括氨基酸5和25) 或氨基酸65-80 (包括氨基酸65和80) 内,任选地,其中差异出现在SEQ ID NO:2的氨基酸5、8、9、12、13、16、19、23、65、66、69、70、72、73、75、76、77、78、79和/或80处。

[0395] 在一些方面中,IL-21突变蛋白包含相对于人类IL-21的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 具有一个氨基酸取代的氨基酸序列。在一些情况下,氨基酸取代出现在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、11、12、13、14、15、16、19、23、65、66、68、69、70、71、72、73、75、76、77、78、79、80、109、110、112、113、116、117、119、120或123处。在示例性方面中,氨基酸取代出现在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、11、12、13、14、15、16、19、23、65、66、68、69、70、72、73、75、76、77、78、79、80、109、110、112、113、116、117、119、120或123处。在示例性情况下,IL-21突变蛋白包含以下位置处的氨基酸取代:

[0396] a. 在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、12、14、15、65、66、69、70、72、73、75、76、77、80、116或119处,其中取代氨基酸为脂肪族氨基酸;

[0397] b. 在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、11、12、13、14、15、16、19、23、65、66、69、70、72、73、75、76、77、78、79、110、112、116、117、119、120或123处,其中取代氨基酸为酸性氨基酸;

[0398] c. 在SEQ ID NO:1的位置5、9、73、76、109、113或116处,其中取代氨基酸为碱性氨基酸;

[0399] d. 在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、70或76处,其中取代氨基酸为芳族氨基酸;

[0400] e. 在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、12、15、73、76、116或119处,其中取代氨基酸为包含侧链酰胺的氨基酸;

[0401] f. 在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、11、12、14、15、73、76、116或119处,其中取代氨基酸为包含侧链羟基的非芳族氨基酸;

[0402] g. 在SEQ ID NO:1的位置65、66、69、70、72、73、75、76、77或80处,其中取代氨基酸为亚氨基酸;

[0403] h. 在SEQ ID NO:1的位置5、9、15、76、116或119处,其中取代氨基酸为包含含硫侧链的氨基酸;或

[0404] i. 或其组合。

[0405] 在示例性方面中,取代氨基酸为天然存在的氨基酸。在一些情况下,IL-21突变蛋

白包含氨基酸位于根据表A的位置处的氨基酸取代。表A显示如下。

[0406] 表A

SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置	氨基酸 (按单字母代码)	SEQ ID NO: 1 的氨基酸位置	氨基酸 (按单字母代码)
5	A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、V 或 Y	72	D、G 或 P
8	A、D、E、N、S、T、V 或 Y	73	A、D、E、G、H、I、N、P、Q、S 或 V
9	A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、V 或 Y	75	D、G 或 P
11	D 或 S	76	A、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V 或 Y
[0407] 12	A、D、E、N、S、T 或 V	77	D、G 或 P
13	D	78	D
14	A、D 或 S	79	D
15	A、E、I、M、N、Q、S、T 或 V	80	G 或 P
16	D 或 E	109	K
19	D	110	D
23	D	112	D
65	D、G 或 P	113	K
66	D、G 或 P	116	A、D、E、I、K、L、M、N、S、T 或 V
68	Q	117	D
69	D、G 或 P	119	A、D、E、M、N、Q、S 或 T
70	E、G、P 或 Y	120	D
71	L	123	D

[0408] 在示例性实施例中,本披露内容提供包含SEQ ID NO:3-21、23-56、58-112、114-208、210-222、224-255和283中的任一个的氨基酸序列的IL-21突变蛋白。

[0409] 在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含相对于人类IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)具有两个氨基酸取代的氨基酸序列。在示例性方面中,氨基酸取代出现在SEQ ID NO:1的位置5、8、9、11、12、13、14、15、16、19、23、65、66、68、69、70、71、72、73、75、76、77、78、79、80、109、110、112、113、116、117、119、120或123中的两个处。在示例性情况下,氨基酸取代出现在SEQ ID NO:1的位置5、9、15、70、71、72、73和76中的两个处。任选地,氨基酸取代出现在SEQ ID NO:1的位置5、9、73和76中的两个处。在一些方面中,这些取代中的一种出现在SEQ ID NO:1的位置76处。在示例性情况下,在SEQ ID NO:1的位置76处的取代氨基酸为脂肪族氨基酸或酸性氨基酸。在示例性方面中,IL-21突变蛋白包含在SEQ ID NO:1的位置5、9或73

处的氨基酸取代,且取代氨基酸为脂肪族氨基酸或酸性氨基酸。在一些方面中,IL-21突变蛋白包含在SEQ ID NO:1的位置5处的氨基酸取代,且取代氨基酸为具有侧链酰胺的氨基酸。在一些情况下,脂肪族氨基酸为丙氨酸,酸性氨基酸为谷氨酸,或具有侧链酰胺的氨基酸为谷氨酰胺。在示例性实施例中,本披露内容提供包含选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-21突变蛋白:SEQ ID NO:208、210至222、224至248和255。

[0410] 关于以上方面中的任一个,IL-21突变蛋白可以相对于野生型IL-21对IL-21受体的亲和力有所降低的亲和力结合IL-21受体。在一些方面中,IL-21受体具有SEQ ID NO:256或261的氨基酸序列。在一些情况下,IL-21突变蛋白结合具有SEQ ID NO:257的氨基酸序列的IL-21受体 γ 链。在示例性情况下,本披露内容的IL-21突变蛋白以大于或等于约0.04nM的Kd结合人类IL-21受体。

[0411] 进一步提供结合物。在示例性方面中,结合物包含任一前述段落所述的IL-21突变蛋白和异源部分。在示例性情况下,IL-21直接附接于异源部分。在替代情况下,IL-21经由接头附接于异源部分。在一些方面中,接头包含例如包含Gly-Gly-Gly-Gly-Ser的氨基酸序列(SEQ ID NO:262)的肽。在示例性方面中,异源部分为多肽,任选地其中多肽为抗原结合蛋白。在一些情况下,异源多肽为抗体或其抗原结合抗体片段。在示例性实施例中,抗体为抗PD-1抗体。在一些方面中,IL-21突变蛋白直接附接于抗体的Fc。在示例性方面中,IL-21突变蛋白经由接头附接于抗体的Fc。在一些方面中,结合物包含单一IL-21突变蛋白,其中所述单一IL-21突变蛋白连接于两个抗体重链中的一个的C端。在示例性情况下,结合物包含两种IL-21突变蛋白,其中第一IL-21突变蛋白连接于第一抗体重链的C端,且第二IL-21突变蛋白连接于第二抗体重链的C端。任选地,第一IL-21具有与第二IL-21突变蛋白相同的氨基酸序列。可替代地,第一IL-21具有与第二IL-21突变蛋白不同的氨基酸序列。在示例性方面中,抗体重链包含电荷对突变(例如V1、V4、V103或V131突变)。在任一前述段落所述的结合物的示例性方面中,IL-21突变蛋白包含在SEQ ID NO:1的位置5、9、73和76中的两个处的氨基酸取代。在示例性方面中,结合物包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的IL-21突变蛋白,不同之处在于所述IL-21突变蛋白在SEQ ID NO:1的位置5、9、73和76中的任两个处包含氨基酸取代;和抗PD-1抗体,其中该IL-21突变蛋白连接于抗PD-1抗体的C端。在示例性方面中,结合物包含抗PD-1抗体,该抗PD-1抗体包含:(a)表D中阐述的重链(HC)互补决定区(CDR)1氨基酸序列,或选自由SEQ ID NO:312、322、332、342、352、362、372和382组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(b)表D中阐述的HC CDR2氨基酸序列,或选自由SEQ ID NO:313、323、333、343、353、363、373和383组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(c)表D中阐述的HC CDR3氨基酸序列,或选自由SEQ ID NO:314、324、334、344、354、364、374和384组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(d)表D中阐述的轻链(LC)CDR1氨基酸序列,或选自由315、325、335、345、355、365、375和385组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(e)表D中阐述的LC CDR2氨基酸序列,或选自由316、326、336、346、356、366、376和386组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(f)表D中阐述的LC CDR3氨基酸序列,或选自由317、327、337、347、357、367、377和387组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列

一致性的其变体序列;或(g)(a)-(f)中的任两个或更多的组合。在示例性情况下,抗PD-1抗体包含选自自由以下组成的组的六个CDR氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:312-317;(b)SEQ ID NO:322-327;(c)SEQ ID NO:332-337;(d)SEQ ID NO:342-347;(e)SEQ ID NO:352-357;(f)SEQ ID NO:362-367;(g)SEQ ID NO:372-377;以及(h)SEQ ID NO:382-387。在一些方面中,抗PD-1抗体包含选自自由以下组成的组的一对氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:318和319;(b)SEQ ID NO:328和329;(c)SEQ ID NO:338和339;(d)SEQ ID NO:348和349;(e)SEQ ID NO:358和359;(f)SEQ ID NO:368和369;(g)SEQ ID NO:378和379;以及(h)SEQ ID NO:388和389。在示例性方面中,抗PD-1抗体包含含有SEQ ID NO:265-267、282、284-311中的任一个的氨基酸序列的恒定区。在某些情况下,抗PD-1抗体包含选自自由以下组成的组的一对氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:320和321;(b)SEQ ID NO:330和331;(c)SEQ ID NO:340和341;(d)SEQ ID NO:350和351;(e)SEQ ID NO:360和361;(f)SEQ ID NO:370和371;(g)SEQ ID NO:380和381;以及(h)SEQ ID NO:390和391。

[0412] 在示例性实施例中,本披露内容提供包含本文所述的IL-21突变蛋白和异源多肽或异源肽的融合多肽或融合蛋白。在一些方面中,融合多肽或融合蛋白包含免疫球蛋白或其抗原结合抗体片段。在示例性实施例中,本披露内容提供包含编码本文所述的IL-21突变蛋白的核苷酸序列的核酸。在示例性实施例中,本披露内容提供包含本文所述的核酸的载体。在示例性实施例中,本披露内容提供包含本文所述的核酸或载体的宿主细胞。在示例性实施例中,本披露内容提供一种试剂盒,其包含如本文所述的IL-21突变蛋白、核酸、载体、宿主细胞、结合物、融合蛋白或其组合和容器。

[0413] 进一步提供药物组合物,其包含本披露内容的IL-21突变蛋白、核酸、载体、宿主细胞、结合物、融合蛋白或其组合以及药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂。

[0414] 还提供制造IL-21突变蛋白的方法,其包括培养本披露内容的宿主细胞以表达IL-21突变蛋白且收获所表达的IL-21突变蛋白。进一步提供一种治疗有需要的受试者的方法。该方法包括向有需要的受试者施用有效治疗受试者的量的本披露内容的药物组合物。在示例性方面中,该受试者具有实体瘤且该药物组合物是以有效治疗该受试者的实体瘤的量施用至该受试者。任选地,实体瘤选自自由以下组成的组:头颈部癌、卵巢癌、子宫颈癌、膀胱和食管癌、胰腺癌、胃肠癌、胃癌、乳癌、子宫内膜癌和结肠直肠癌、肝细胞癌、胶质母细胞瘤、膀胱癌、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC))、细支气管肺泡癌。

[0415] 在示例性实施例中,本披露内容提供一种PD-1抗原结合蛋白,该PD-1抗原结合蛋白包含:(a)表D中阐述的重链(HC)互补决定区(CDR)1氨基酸序列,或选自自由SEQ ID NO:312、322、332、342、352、362、372和382组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(b)表D中阐述的HC CDR2氨基酸序列,或选自自由SEQ ID NO:313、323、333、343、353、363、373和383组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(c)表D中阐述的HC CDR3氨基酸序列,或选自自由SEQ ID NO:314、324、334、344、354、364、374和384组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(d)表D中阐述的轻链(LC)CDR1氨基酸序列,或选自自由315、325、335、345、355、365、375和385组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列;(e)表D中阐述的LC CDR2氨基酸序列,或选自自由316、326、336、346、356、366、376和386组成的组的序列,或仅差

异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列；(f)表D中阐述的LC CDR3氨基酸序列,或选自由317、327、337、347、357、367、377和387组成的组的序列,或仅差异一个或两个氨基酸或具有至少或约70%序列一致性的其变体序列；或(g)(a)-(f)中的任两个或更多的组合。在示例性情况下,PD-1抗原结合蛋白包含选自由以下组成的组的六个CDR氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:312-317;(b)SEQ ID NO:322-327;(c)SEQ ID NO:332-337;(d)SEQ ID NO:342-347;(e)SEQ ID NO:352-357;(f)SEQ ID NO:362-367;(g)SEQ ID NO:372-377;以及(h)SEQ ID NO:382-387。在某些方面中,PD-1抗原结合蛋白包含选自由以下组成的组的一对氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:318和319;(b)SEQ ID NO:328和329;(c)SEQ ID NO:338和339;(d)SEQ ID NO:348和349;(e)SEQ ID NO:358和359;(f)SEQ ID NO:368和369;(g)SEQ ID NO:378和379;以及(h)SEQ ID NO:388和389。在示例性情况下,PD-1抗原结合蛋白包含含有SEQ ID NO:265-267、282、284-311中的任一个的氨基酸序列的恒定区。在一些方面中,PD-1抗原结合蛋白包含选自由以下组成的组的一对氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:320和321;(b)SEQ ID NO:330和331;(c)SEQ ID NO:340和341;(d)SEQ ID NO:350和351;(e)SEQ ID NO:360和361;(f)SEQ ID NO:370和371;(g)SEQ ID NO:380和381;以及(h)SEQ ID NO:390和391。

[0416] 在示例性实施例中,本披露内容提供包含如上述段落中所述的PD-1抗原结合蛋白和异源部分的结合物。在示例性实施例中,本披露内容提供包含如上述段落中所述的PD-1抗原结合蛋白和异源多肽或异源肽的融合多肽或融合蛋白。在示例性实施例中,本披露内容提供包含编码如上述段落中所述的PD-1抗原结合蛋白、结合物或融合多肽或融合蛋白的核苷酸序列的核酸。在示例性情况下,核酸包含SEQ ID NO:392-471中的任一个的序列。在示例性实施例中,本披露内容提供包含如上所述的核酸的载体以及包含如上所述的核酸或载体的宿主细胞。还提供一种试剂盒,该试剂盒包含如上述段落中所述的PD-1抗原结合蛋白或结合物、融合多肽、融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞或其组合和容器。本披露内容提供一种药物组合物,在示例性实施例中,该药物组合物包含如上述段落中所述的PD-1抗原结合蛋白或结合物、融合多肽、融合蛋白、核酸、载体或宿主细胞或其组合,以及药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂。本披露内容进一步提供一种制造PD-1抗原结合蛋白的方法,其中在示例性实施例中,该方法包括培养如此段落中所述的宿主细胞,以表达PD-1抗原结合蛋白,且收获所表达的PD-1抗原结合蛋白。本披露内容另外提供一种治疗有需要的受试者的方法,其中在示例性实施例中,该方法包括向有需要的受试者施用有效治疗受试者的量的如此段落中所述的药物组合物。在示例性方面中,该受试者具有实体瘤且该药物组合物是以有效治疗该受试者的实体瘤的量施用至该受试者。任选地,实体瘤选自由以下组成的组:头颈部癌、卵巢癌、子宫颈癌、膀胱和食管癌、胰脏癌、胃肠癌、胃癌、乳癌、子宫内膜癌和结肠直肠癌、肝细胞癌、胶质母细胞瘤、膀胱癌、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC))、细支气管肺泡癌。

[0417] 以下实例仅是为描述本披露内容而给出,且不得以任何方式限制其范围。

[0418] 实例

[0419] 实例1

[0420] 本实例证明包含PD-1阻断抗体和重组IL-21的组合疗法优于相对应的单一疗法。

[0421] 在临床前研究中,将单克隆PD-1阻断抗体与重组鼠科IL-21(rmIL-21)的组合作用

的作用与PD-1阻断抗体或rmIL-21的单一治疗的作用相比较。

[0422] 在第1天,将CT26/3E5结肠癌细胞植入BALB/c小鼠中以起始肿瘤生长。在第12天,测量肿瘤,且将小鼠随机化至4组(每组10只小鼠):第1组接受300 μ g同种型对照抗体(mIgG1)的腹膜内(IP)注射,第2组接受300 μ g阻断PD-1抗体的IP注射,第3组接受50 μ grmIL-21,且第4组接受阻断PD-1抗体(300 μ g)与rmIL-21(50 μ g)。第1组、第2组和第4组每3天接受抗体一次,且第3组和第4组每周接受rmIL-213次,历时3周。在第33天结束给药。

[0423] 在整个研究中监测肿瘤体积。如图1A-1D所示,第1组的肿瘤尺寸最大程度增加,且第4组的肿瘤尺寸最小程度增加。

[0424] 如通过卡普兰梅耶对数秩曼特尔-考克斯分析(Kaplan Meier log rank mantel cox analysis)所测量的存活率为此研究的主要终点。如图2和表1所示,第4组的存活率百分比和中值存活期最大。值得注意地,第4组中两名受试者无肿瘤(表1)。

[0425] 表1

组	中值存活期(天)	无肿瘤的受试者
1	25	0
2	29	0
3	27	0
4	37.5	2

[0427] 这些结果证明单克隆PD-1阻断抗体与重组mIL-21的组合提供优于作为单一疗法单独施用的任一组分的存活率优点。

[0428] 实例2

[0429] 本实例描述多平台的设计和构造旨在提供PD-1抑制与IL-21信号传导的组合。

[0430] 实例1中所得的结果证明IL-21信号传导和PD-1抑制的组合方法治疗具有肿瘤的受试者的优点。但是,因为IL-21能够加强CD8 T细胞反应且抑制抗原呈递和T细胞激活,所以谨慎考虑IL-21的递送方式。另外,IL-21R在人类组织中广泛表达(例如通过抗原呈递细胞(APC)、NK细胞、B细胞和T细胞),因此需要谨慎考虑以避免在不同组织中IL-21结合其受体时的脱靶作用(例如在肿瘤环境外的IL-21活性)和IL-21清除。

[0431] 想出一种双管齐下的方法以阐明以上考虑。首先,产生经由IL-21突变蛋白与IL-21R的结合减少而具有减弱活性的IL-21突变蛋白。可想象当全身扩散时,此类IL-21突变蛋白将具有减少活性,但若IL-21突变蛋白可集中在靶标(例如癌症)T细胞中,则将“拯救”此类活性。即,IL-21突变蛋白一旦存在和集中在靶标细胞中,则将整体上展现治疗IL-21活性。其次,IL-21突变蛋白与诸如单克隆抗体的靶标臂融合,以使IL-21突变蛋白靶向相关细胞(例如癌细胞)。为将IL-21突变蛋白递送至靶标癌细胞,将其与抗PD-1 mAb融合。抗PD-1 mAb的使用具有预防经由PD-1/PD-L1信号传导(因此充当检查点抑制剂)的另外的益处。

[0432] 不受任何具体理论束缚,假定包含抗PD-1抗体与IL-21突变蛋白融合的融合蛋白将提供针对旨在破坏的细胞更持久的反应。举例而言,[1]表达PD-1的CD8+T细胞将由融合蛋白的抗PD-1 mAb结合,且[2]同时融合蛋白的IL-21突变蛋白与由CD8+T细胞表达的IL-21受体的结合将增加T细胞增殖以及T细胞的IFN γ 产生和分泌更大,此将提高针对靶标细胞的总体细胞毒性。进一步假设由IL-21活化的细胞内信号传导路径将预防终末分化和相关的效应功能丧失和细胞凋亡。参见图3。

[0433] 其他设计考虑包括mAb的化合价(例如单价或二价mAb)、对Fc效应功能的需求、细胞因子融合位点(mAb的C端或N端)、包括接头和预测的次要修饰或截断位点的补救。

[0434] 考虑若干融合蛋白形式,且克隆四种融合构建体且表达以用于概念验证实验。野生型(WT) IL-21与二价PD-1 mAb的IgG的C端融合成:(1)无任何接头的IL-21同源二聚体;(2)具有GGGS(SEQ ID NO:262)接头的IL-21同源二聚体;(3)无任何接头,但在IgGFc中具有电荷对突变以驱动异源二聚的IL-21单体;和(4)具有GGGS(SEQ ID NO:262)接头和电荷对突变的IL-21单体。所有四种融合蛋白构建体在mAb Fc区中包括以下修饰,根据EU系统编号:N297G、R292C、V302C(SEFL2-2突变)。所用的电荷对突变为V1突变(即一条重链中的K409D和K392D以及另一条重链中的D399K和E356K)。所有四种融合蛋白构建体经设计以移除C端赖氨酸从而防止截断。

[0435] 在细胞测定中,使用IL-21R阳性(IL-21R+) Hut78 T细胞系的两种变体(PD-1^{+ve}和PD-1^{-ve}),针对IL-21活性筛选融合构建体。在各细胞系中,STAT3磷酸化作为IL-21活性的替代量度测量。两种Hut78细胞变体暴露于(i)单独重组人类IL-21(rhIL-21);(ii)单独抗PD-1 mAb;(iii)抗PD-1 mAb与IL-21同源二聚体融合,具有接头;(iv)抗PD-1 mAb与IL-21同源二聚体融合,无接头;(v)抗PD-1 mAb与IL-21单体融合,具有接头;或(vi)抗PD-1 mAb与IL-21单体融合,无接头。STAT3磷酸化测定的结果和各分子针对STAT信号传导的EC50分别展示于图5A和5B以及表2中。

[0436] 表2

分子	<u>PD-1^{-ve}</u>	<u>PD-1^{+ve}</u>
	<u>EC50 (pM)</u>	<u>EC50 (pM)</u>
rhIL-21	153	204
抗 PD-1 mAb	-	-
抗 PD-1 mAb + IL-21 同源二聚体的融合物, 无接头	1184	97
抗 PD-1 mAb + IL-21 同源二聚体的融合物, + 接头	1822	60
抗 PD-1 mAb + IL-21 单体的融合物, 无接头	523	70
抗 PD-1 mAb + IL-21 单体的融合物, + 接头	392	58

[0437] 如图5A和表2所示(中间行),包含抗PD-1 mAb与IL-21同源二聚体的融合蛋白在PD-1^{-ve}细胞中展现相对于rhIL-21低10倍的效力。与包含IL-21单体的融合蛋白相比,rhIL-21还更有效。尽管仅仅具有一个IL-21部分,但单体融合蛋白显示相对于具有两个IL-21部分的同源二聚体更大的效力。这些结果表明单体在PD-1^{-ve}细胞中展现较高IL-21活性,和/或表明同源二聚体融合蛋白形式可使IL-21活性部分减弱(例如可能经由IL-21部分之间的空间相互作用)。

[0438] 此研究还允许评估IL-21部分与IgG C端之间的接头。如表2(中间行)和图5A和5B(实线=无接头;点线=接头)所示,接头的存在似乎不影响IL-21活性。因此,制造无接头的

所有未来构建体,以减少融合蛋白中非天然序列的量。

[0441] 通过于PD-1^{-ve}细胞与PD-1^{+ve}细胞之间比较STAT3磷酸化测定的结果,评估PD-1表达对IL-21活性的作用。如图5B所示,在PD-1^{+ve}细胞中IL-21同源二聚体和单体融合蛋白中每个的IL-21活性基本上相同。

[0442] 总之,这些结果证明在靶标细胞中缺乏PD-1表达时,IL-21信号传导可通过IL-21与抗PD-1 mAb融合而减弱。另外,在表达PD-1的细胞中拯救与抗PD-1 mAb融合的IL-21的IL-21信号传导。

[0443] 实例3

[0444] 本实例描述多种IL-21突变蛋白的设计、构造和表征。

[0445] 为获得对融合蛋白的药代动力学/药效学(PK/PD)概况的了解,在食蟹猕猴中体内测试包含与WT IL-21的同源二聚体融合的IgG的融合蛋白。

[0446] 以低剂量(250 μ g/kg)或高剂量(1000 μ g/kg)向6种动物静脉内施用包含与抗PD-1 mAb融合的WT IL-21的同源二聚体融合蛋白。IgG抗体结构域(150 μ g/kg)充当对照。随时间推移测量血清浓度,且测量C_{max}、AUC_{last}、半衰期(t_{1/2})、Vss和Cl。结果显示于图6和表3中。

[0447] 表3

动物编号	剂量 (μ g/kg)	C _{max} (μ g/mL)	AUC _{last} (hr* μ g/mL)	半衰期 (t _{1/2}) (hr)	Vss (mL/kg)	CL (mL/hr/kg)
979	250	78.5	331	9.99	7400	635
980	250	72.4	463	10.6	7136	521
981	250	101	429	19.6	8904	366
[0448] 平均低剂量	250	84.0 \pm 15.1	408 \pm 69	13.4 \pm 5.4	7813 \pm 954	507 \pm 135
982	1000	401	3500	43	6943	281
983	1000	414	2746	21.2	6953	361
984	1000	486	4345	25.0	4996	226
平均高剂量	1000	434 \pm 45.8	3530 \pm 800	29.7 \pm 11.6	6297 \pm 1127	289 \pm 67.9

[0449] 相对于IgG对照(数据未显示),包含抗PD-1 mAb和WT IL-21的同源二聚体融合蛋白展现增加的清除率和较低暴露。因此确定,为增强融合蛋白的暴露和最小化脱靶IL-21作用(即最小化在未表达PD-1受体的免疫细胞的IL-21信号传导),将需要诱变IL-21以减弱经由IL-21R的信号传导。因此,包含突变IL-21的融合蛋白经设计以不太强烈地结合未表达PD-1的细胞上的IL-21R。假定融合蛋白将首先以高亲和力结合PD-1靶标(通过结合抗PD-1抗体),接着其将驱动IL-21突变蛋白与IL-21R(α 链)之间的第二较低亲和力相互作用。在缺乏PD-1受体的情况下,假定融合蛋白不会结合未表达PD-1受体的细胞,无论IL-21R表达如何。

[0450] 结构指导的工程化用于产生一组141种IL-21突变蛋白,与WT IL-21氨基酸序列相比各具有单一氨基酸取代。各突变蛋白经设计以具有降低的对IL-21R的 α 亚单元(101种突变蛋白)或IL-21R的 γ 亚单元(40种突变蛋白)的亲和力。该组中的各突变蛋白可表达为具有PD-1 mAb的融合蛋白(PD-1 \times IL-21突变蛋白),且随后使用FortéBio Octet[®]系统(佛特比奥公司(Pa11 FortéBio);加利福尼亚州佛利蒙市(Fremont, CA))评定其结合IL-21R的能力,且使用IL-21R+T细胞系(Hut78),使用STAT3磷酸化作为IL-21活性的替代,筛选活性。为

选择具有最低脱靶活性潜能的突变蛋白,设定选择标准为在PD-1^{ve}细胞上对比3.7nM下rhIL-21,IL-21信号传导减弱超过20倍。

[0451] 141种突变蛋白的完整列表显示于表4中。

[0452] 表4

[0453]

突变体	IL-21 AA 取代	SEQ ID NO:	IL-21 α 链或 γ 链突变蛋白	IL-21R-Fc Kd (nM)	亲和力降 低倍数
1	R5D	74	α	NB	
2	R5E	75	α	NB	
3	R5G	76	α	NB	
4	R5H	77	α	WB	
5	R5I	78	α	WB	
6	R5K	79	α	WB	
7	R5L	80	α	WB	
8	R5M	81	α	WB	
9	R5N	82	α	NB	
11	R5S	84	α	WB	
12	R5T	85	α	WB	
13	R5V	86	α	WB	
14	R5Y	87	α	WB	
15	I8A	88	α	WB	
16	I8D	89	α	WB	
17	I8E	90	α	NB	
18	I8G	91	α	WB	
19	I8N	92	α	WB	
22	R9D	95	α	>100	
23	R9E	96	α	NB	
29	R9M	102	α	WB	
30	R9N	103	α	WB	
31	R9Q	104	α	WB	
32	R9S	105	α	WB	
33	R9T	106	α	WB	
34	R9V	107	α	WB	
24	R9G	97	α	~40	
74	K75D	156	α	19.86	
79	R76E	161	α	18.47	738.8
86	R76N	168	α	15.31	612.4
78	R76D	160	α	~12	

[0454]

突变体	IL-21 AA 取代	SEQ ID NO:	IL-21 α 链或 γ 链突变蛋白	IL-21R-Fc Kd (nM)	亲和力降 低倍数
77	R76A	159	α	~11	440
43	L13D	112	α	11	440
59	S70P	138	α	~10	
62	K72P	143	α	8.958	
53	I66P	132	α	7.11	
21	R9A	94	α	6.836	
20	I8S	93	α	~4	160
52	I66G	131	α	4.552	
95	K77P	177	α	2.056	
26	R9I	99	α	2.2	
42	Q12V	249	α	<2.2	88
70	K73P	152	α	~2	80
80	R76G	162	α	~2	80
81	R76H	163	α	~2	80
56	V69P	135	α	1.989	
10	R5Q	83	α	2.1	
27	R9K	100	α	2	
91	R76V	173	α	1.765	
47	Y23D	48	α	1.7	68
28	R9L	101	α	1.6	
96	P78D	61	α	1.228	
73	K73V	155	α	1.071	
89	R76S	171	α	1.05	42
76	K75P	158	α	~1	40
57	S70E	136	α	0.9481	
50	R65P	129	α	0.9	
88	R76Q	170	α	0.7702	
51	I66D	130	α	0.6773	
94	K77G	176	α	0.658	
85	R76M	167	α	~0.6	24
35	R9Y	108	α	0.63	
58	S70G	137	α	0.5181	
c6	D15A	117	γ	0.4389	
64	K73D	146	α	0.4354	
c1	R11D	109	γ	0.4113	
87	R76P	169	α	~0.4	16
37	Q12D	249	α	0.42	
39	Q12N	251	α	0.38	
82	R76I	164	α	0.3159	12.636
97	P79D	62	α	0.3152	
99	S80P	179	α	0.3089	
40	Q12S	252	α	0.32	
92	R76Y	174	α	0.2651	
98	S80G	178	α	0.265	

突变体	IL-21 AA 取代	SEQ ID NO:	IL-21 α 链或 γ 链突变蛋白	IL-21R-Fc Kd (nM)	亲和力降 低倍数
66	K73G	148	α	0.2528	
61	K72G	142	α	0.2502	
c7	D15E	118		0.2492	
41	Q12T	253	α	<0.26	
100	R5A	73	α	0.2375	
101	S70Y	139	α	0.2366	
60	K72D	141	α	0.235	
c3	I14A	114	γ	0.2153	
c8	D15I	119	γ	0.2151	
55	V69G	134	α	0.2148	
36	Q12A	111	α	0.23	
c4	I14D	115	γ	0.2022	
83	R76K	165	α	~0.2	8
84	R76L	166	α	~0.2	8
67	K73H	149	α	0.1901	
72	K73S	154	α	0.1667	
c5	I14S	116	γ	0.1658	
c9	D15M	120	γ	0.1633	
[0455] 75	K75G	157	α	0.1627	
46	Q19D	47	α	0.17	
c2	R11S	110	γ	0.1346	
49	R65G	128	α	0.13	
90	R76T	172	α	0.105	
44	I16D	125	α	0.094	
抗 PD-1 Ab*	--			~0.07-0.092	
48	R65D	127	α	0.088	
25	R9H	98	α	0.084	
69	K73N	151	α	0.07368	
65	K73E	147	α	0.07262	
45	I16E	126	α	0.076	
71	K73Q	153	α	0.06919	
63	K73A	145	α	0.0525	
68	K73I	150	α	0.1724	
54	V69D	133	α	0.03952	
38	Q12E	250	α	0.031	
huIL-21**	--			0.025-0.027	
PD-1 Ab***	--			NB	

[0456] NB=无可检测的结合

[0457] WB=弱结合(低于可靠定量极限)

[0458] IL-21AA取代是根据SEQ ID NO:1的氨基酸位置编号。

[0459] *抗PD-1 mAb与人类IL-21(无突变)融合

[0460] **不呈融合物;仅仅呈人类IL-21存在

[0461] ***不呈融合物;仅仅呈PD-1Ab存在

[0462] 使用IL-21突变蛋白的STAT3磷酸化测定的示例性结果显示于图7(对IL-21 α 的亲

和力降低的突变蛋白)和图8(对IL-21R γ 的亲合力降低的突变蛋白)中。如这些图中所示,若干突变蛋白显示在PD-1^{-ve}细胞中IL-21活性减弱超过20倍,但在PD-1^{+ve}细胞中保留活性。如图9A-9B中所示,突变体51(R65P)(蓝色圆圈)为显示在PD^{-ve}细胞中IL-21活性降低超过20倍,但展现与rhIL-21在表达PD-1的细胞中所实现的活性类似的IL-21活性水平的一种突变体。表5中提供针对在PD-1低/阴性细胞上STAT3信号减弱超过20倍进行选择的选择性突变蛋白的清单。

[0463] 表5

突变体 编号	AA 取 代	SEQ ID NO:	对 IL-21R 的亲合力 (K_D (nM))	亲和 力降 低倍 数 ¹	N1		N2		
					PD-1 ^{-ve} 降低倍数 (rhIL-21)	PD-1 ^{+ve} 降低 倍数 (rhIL-21)	PD-1 ^{-ve} 降低倍数 (rhIL-21)	PD-1 ^{+ve} 降低 倍数 (rhIL-21)	
20	I8S	93	~4	160	38.1	4.4	58.8	5.7	
42	Q12V	249	<2.2	88	80	2.4	44	6.9	
43	L13D	112	11	440	83.8	2.3	25.7	2.6	
47	Y23D	48	1.7	68	35.6	1.4	13.7	1.4	
70	K73P	152	~2	80	46.4	1.8	21	1.7	
76	K75P	158	~1	40	25.1	1.7	36	1.6	
77	R76A	159	~11	440	29.9	2.6	20	3	
79	R76E	161	18.47	738.8	40.2	2.6	23.2	2.5	
[0464]	80	R76G	162	~2	80	31.4	1.5	17	1.6
	81	R76H	163	~2	80	23.4	1.5	38.6	1.8
	82	R76I	164	0.3159	12.636	25.1	1.5	28.2	1.6
	83	R76K	165	~0.2	8	19.3	1.7	27.4	1.4
	84	R76L	166	~0.2	8	24.4	1.6	29.1	1.5
	85	R76M	167	~0.6	24	21.8	1.4	28.2	1.4
	86	R76N	168	15.31	612.4	30.1	3	21.1	4.2
	87	R76P	169	~0.4	16	26.5	1.7	34.4	1.6
	89	R76S	171	1.05	42	32.7	1.3	28.9	1.1
	C10	D15N	121	11	87.3	16.9	4.1	39.7	4.7
	C12	D15S	123	6.6	52.4	16.4	3.2	36.4	3.5
	C14	D15V	124	5.471	43.4	20.1	4.7	35	5.7
	C18	S113K	67	8.098	64.3	20.8	3.2	42	3.9
	C21	Q116E	182	7.949	63.1	26.9	5.4	52.1	6.5

[0465] ¹对比rhIL-21

[0466] 实例4

[0467] 本实例描述用于融合蛋白构建及其体内测试的候选IL-21突变蛋白的选择。

[0468] 将最高22种效能的IL-21突变蛋白按比例增大以用于进一步测试。基于此进一步测试(在如本文中论述的Hut78 pSTAT3测定中),选择四种候选融合蛋白以便该系列四种融合蛋白将显示一系列减弱(在Hut78 pSTAT3测定中相对于rhIL-21,效力改变)。突变体C10(D15N)代表低减弱突变蛋白,突变体77(R76A)代表中等减弱突变蛋白,且突变体79和78(分别R76E和R76D)代表高减弱突变蛋白。在四种中,三种按比例扩大以用于食蟹猕猴中的体内研究,以评估突变蛋白融合蛋白构建体的药代动力学性质。将单剂量(10mg/kg)突变体79(R76E)、突变体77(R76A)或突变体C10(D15N)静脉内施用(推注)未处理食蟹猕猴,且在十天时期内,收集血清浓度。为进行比较,通过静脉内推注,将抗PD-1 mAb和包含抗PD-1 mAb和WT IL-21的融合蛋白(个别)给予食蟹猕猴。研究用两种对照物进行:单独抗PD-1 mAb以及包含抗PD-1 mAb和WT IL-21的融合蛋白构建体。如图10所示,与亲本抗PD-1 mAb(黑色三角形)相比,各抗PD-1 mAb-IL-21突变蛋白融合蛋白展现改变的药代动力学概况。表6提供通过非房室分析拟合的药代动力学性质。

[0469] 表6

构建体	剂量 (mg/kg)	C _{15min} (μg/mL)	AUC _{last} (hr*μg/mL)	V _{ss} (mL/kg)	CL (mL/hr/kg)	半衰期 (hr)
[0470] 抗PD-1 mAb: IL-21 (R76E) ^{a,b}	10	53 ± 7	309 ± 50	210 ± 30	33 ± 5	26 ± 13
抗PD-1 mAb: IL-21 (R76A) ^{a,b}	10	4.7 ± 1.4	28.2 ± 9.3	2900 ± 700	380 ± 110	21 ± 14
抗PD-1 mAb: IL-21 (D15N) ^{a,b}	10	2.4 ± 1	8.0 ± 2.8	10000 ± 4000	1400 ± 600	15 ± 9
[0471] 抗PD-1 mAb ^{a,c}	8.25	200 ± 9	23600 ± 1500	56 ± 5	0.20 ± 0.01	200 ± 18
抗PD-1 mAb: IL-21 ^{c,d}	1.0	0.27 ± 0.02	0.32 ± .02	5600 ± 800	2900 ± 200	2.8 ± 0.2

[0472] ^a非人类灵长类动物研究

[0473] ^b利用人类Fc检测的人类IL21捕捉

[0474] ^c利用人类Fc检测的人类Fc捕捉

[0475] ^d非人类灵长类动物研究

[0476] 实例5

[0477] 本实例描述IL-21双重突变体小组的产生,和包含IL-21双重突变体同源二聚体(除非另作描述)的融合蛋白的表达和表征。

[0478] 基于细胞活性数据(例如在PD-1^{-ve} Hut78 T细胞上活性的减弱程度最高)和可制造性,选择具有单一氨基酸取代的三种突变蛋白,包括(突变体第77号(R76A)和突变体第79号(R76E)),用于另外的工程化。结构引导的工程化用于在IL-21单一突变体序列内产生另外的突变(即产生双重突变体),以进一步减弱细胞因子与IL-21R的α链(IL-21Rα)的结合。使双重突变体序列与抗PD-1 mAb的序列融合,且表达融合蛋白且在细胞测定中进行测试。所制造和测试的双重突变体融合蛋白的清单提供于表7中。

[0479] 表7

双重突变体编号	氨基酸取代	SEQ ID NO:
1	D15N、I71L	214
2	D15N、K72A	215
3	D15N、K73A	216
4	D15N、S70T	213
5	I71L、K73Q	217
[0480] 6	I71L、R76A	227
7	I71L、R76D	228
8	I71L、R76E	229
9	K72A、K73Q	218
10	K72A、R76A	230
11	K72A、R76D	231
12	K72A、R76E	232

[0481]	13	K73A、R76A	233
	14	K73A、R76D	234
	15	K73A、R76E	235
	17	S70T、K73Q	255
	18	S70T、R76A	246
	19	S70T、R76D	247
	20	S70T、R76E	248
	21	R9E、R76E	245
	22	R9A、R76E	243
	23	R5E、R76E	239
	24	R5A、R76E	237
	25	R5Q、R76E	241
	26	R9E、R76A	244
	27	R9A、R76A	242
	28	R5E、R76A	238
	29	R5A、R76A	236
	30	R5Q、R76A	240

[0482] 因为需要具有高减弱特性的双重突变体融合蛋白,所以选择标准设置为相对于rhIL-21的效力,在IL-21R阳性、PD-1阴性(PD-1^{-ve})Hut78 T细胞上效力(EC₅₀)超过1000nM。另外,如同含有单一氨基酸取代的突变蛋白一样,针对IL-21R结合,对双重突变体融合蛋白进行表征(ForteBio Octet)。最终,使用Jurkat PD-1报道基因测定,针对PD-1活性,对双重突变体融合蛋白进行表征。这些测定的结果展示于表8中。

[0483] 表8

所测试的融合蛋白	Hut78 PD-1 ⁺ T 细胞中 pSTAT3 EC50 (nM) (n1)	Hut78 PD-1 ⁺ T 细胞中 pSTAT3 EC50 (nM) (n2)	Hut78 PD-1 ⁻ T 细胞中 pSTAT3 EC50 (nM) (n1)	Hut78 PD-1 ⁻ T 细胞中 pSTAT3 EC50 (nM) (n2)	K _D (nM) Hu IL-21R	K _D (nM) Cyno IL-21R	K _D (nM) Hu PD-1	K _D (nM) Cyno PD-1
rhIL-21	0.085	0.053	0.056	0.050	0.028-0.037	0.019-0.051	-	-
R76A	0.341	0.147	100.277	35.477	>10 (两相)	>10 (两相)	7.5	6.4
R76E	0.744	0.376	194.523	122.87	>10 (两相)	>10 (两相)	7.2	6.0
R76E 单体	0.197	0.136	23.516	26.965	>10 (两相)	>10 (两相)	5.8	7.3
R5E: R76A	1.979	1.487	>1000	>1000	> 300	>300	7.0	5.9
R5Q: R76E	2.211	1.663	>1000	>1000	> 300	>300	6.3	6.3
R9E: R76A	16.6	-	>1000	>1000	> 300	>300	8.9	5.9
抗 PD-1 mAb	-	-	-	-	-	-	13.4	6.3

所测试的融合蛋白	hPD1 报道子 N1 (nM)	hPD1 报道子 N2 (nM)
R76A	1.44	2.17
R76E	0.85	1.68
R76E 单体	0.685	0.637
R5Q: R76E	0.954	0.942
抗 PD-1 mAb	1.39	1.77

[0487] Hu=人类;Cyno=食蟹猕猴

[0488] pSTAT3 EC50(2.5倍变化)

[0489] Octet:结合固定的单价人类和食蟹猕猴IL-21R-his

[0490] 如表8所示,双重突变体融合蛋白在表达低水平PD-1(例如低于PD-1的可检测水平)的T细胞上展现极低IL-21活性,但在表达PD-1的细胞上保留显著IL-21活性。双重突变体融合蛋白展现与IL-21R的弱结合($K_d > 300\text{nM}$),但保留与PD-1结合和阻断PD-1信号传导的能力。

[0491] 实例6

[0492] 本实例描述比较包含抗PD-1 mAb和IL-21双重突变体同源二聚体或IL-21单一突变体同源二聚体的融合蛋白的体外原代细胞测定。

[0493] 在体外原代细胞测定(混合淋巴细胞反应(MLR))中测试包含抗PD-1 mAb以及具有R5Q和R76E氨基酸取代的IL-21的融合蛋白。MLR包含包括表达IL-21R但不表达PD-1的树突状细胞(DC)的IL-21R⁺细胞、表达PD-1的T细胞和不表达PD-1的T细胞的混合群体。MLR暴露于(i)包含R5Q和R76E氨基酸取代的融合蛋白;(ii)仅仅包含R76E氨基酸取代的融合蛋白;(iii)重组人类IL-21(rHu IL-21);(iv)抗PD-1 mAb;(v) rHu IL-21与抗PD-1 mAb的组合;或(vi)对照IgG。

[0494] 如图11所示,rhIL-21抑制DC功能且当共同给予时主要控制PD-1反应。具有减弱活性的包含IL-21双重突变蛋白的融合蛋白展现降低的脱靶活性。此外,rhIL-21和仅仅包含R76E氨基酸取代的融合蛋白在DC上各展现显著脱靶活性且抑制细胞因子产生。相比之下,PD-1 mAb以及包含R5Q和R76E氨基酸取代的融合蛋白仅仅递送IL-21信号至靶标PD-1^{+ve} T细胞(而非PD-1^{-ve}树突状细胞),且保留加强细胞因子产生的能力(经由PD-1臂)。因此,这些结果表明包含IL-21双重突变体的融合蛋白具有降低的免疫抑制,且对DC激活具有不利影响,且可允许新的T细胞纯系募集和更持久的抗癌免疫反应。

[0495] 实例7

[0496] 本实例描述包含IL-21双重突变蛋白(同源二聚体)和抗PD-1mAb的不同融合蛋白在原代细胞毒性T淋巴细胞(CTL)上的活性。通过FACs测量原代CTL(来自人类供体的CMV反应性CTL细胞株)中的内源性STAT3磷酸化,且用作IL-21信号传导的量度。在CTL静息48小时(以减少PD-1表达)之后,将细胞暴露(10分钟)在(i)包含IL-21 R5E/R76A双重突变蛋白的融合蛋白(左图中的红线);(ii)包含IL-21 R5Q/R76E双重突变蛋白的融合蛋白(中间图中的红线);(iii)包含IL-21R9E/R76A双重突变蛋白的融合蛋白(右图中的红线);(iv) IgG1对照物(各图中的灰线);(v) rhIL-21(各图中的蓝线);(vi) 抗PD-1 mAb(各图中的绿色实线);

(vii)rhIL-21与抗PD-1 mAb的组合(各图中的绿色点线);或(viii)包含IL-21 R76E单一突变蛋白的融合蛋白(各图中的紫线)。FACs结果显示于图12A-12C中。包含IL-21双重突变蛋白的各融合蛋白的IL-21活性相对于用(iv) IgG1对照物、(v) rhIL-21、(vi) 抗PD-1 mAb、(vii)rhIL-21与抗PD-1 mAb的组合以及(viii)包含IL-21 R76E单一突变蛋白的融合蛋白实现的活性绘图。此原代细胞测定证明双重突变体融合物微弱地刺激静息CTL(其表达低水平的PD-1)中IL-21诱导的STAT3信号传导。双重突变蛋白融合物的IL-21活性减弱最多(且类似于在抗PD-1 mAb和IgG1对照物下所见),其中单一突变体融合物展现中度IL-21活性减弱,且rhIL-21与抗PD-1 mAb的组合具有类似于rhIL-21的活性。

[0497] 还探索在长期刺激后包含抗PD-1 mAb和IL-21双重突变蛋白同源二聚体的融合蛋白对CTL介导的细胞毒性功能上的作用。将CTL用CD3/CD28活化且暴露于(i)包含IL-21 R5E/R76A双重突变蛋白的融合蛋白;(ii)包含IL-21 R5Q/R76E双重突变蛋白的融合蛋白;(iii)包含IL-21R9E/R76A双重突变蛋白的融合蛋白;(iv) IgG4对照物;(v)rhIL-21、(vi)抗PD-1 mAb;或(vii)rhIL-21与抗PD-1 mAb的组合。在刺激七天之后,将细胞与经CMV肽脉冲的黑色素瘤细胞系共培养且测量细胞毒性。此测定的结果展示于图13A-13C中。

[0498] 如图13A-13C所示,融合蛋白能够以优于抗PD-1 mAb单一疗法的方式维持CTL功能。在长期刺激后IL-21突变蛋白融合蛋白可维持CTL介导的细胞毒性功能。这些结果支持如下观念:在如在癌症中观察到的长期活化的条件下IL-21可维持CTL功能。IL-21递送至PD-1+抗原特异性T细胞可选择性地维持T细胞群体的功能,此驱动治疗功效。

[0499] 实例8

[0500] 本实例描述双重突变蛋白构建体的体内药代动力学。

[0501] 通过静脉内推注,向未处理食蟹猕猴施用包含抗PD-1 mAb和IL-21双重突变蛋白或IL-21单一突变蛋白的融合蛋白,以表征药物暴露。表9显示向动物施用的各构建体的剂量。单一突变蛋白变体(IL-21R76E)呈同源二聚体和单体在体内进行测试,以更好地了解可如何进一步提高暴露。

[0502] 在向未处理食蟹猕猴静脉内推注后PD-1 mAb和PD-1:IL-21融合物的血清浓度-时间概况展示于图14中,其中在表9中列出的施用之后第一周观察到药物暴露。

[0503] 表9

动物编号:	构建体:	剂量 (mg/kg)	AUC ₀₋₁₆₈ /剂量 (hr*kg*μg/mL/mg)
	PD-1 mAb ^{a,b}	8.25	2260 ± 150
	PD-1:IL-21 (R76A) 同源二聚体 ^{a,c}	10	2.82 ± 0.93
[0504] 803 & 804	PD-1:IL-21 (R5E/R76A) 同源二聚体 ^{d,e}	5	39.1 ± 14.0
801 & 802	PD-1:IL-21 (R76E) 同源二聚体 ^{d,e}	5	38.0 ± 19.6
807 & 808	PD-1:IL-21 (R76E) 单价 ^{d,e}	5	195 ± 4.8
805 & 806	PD-1:IL-21 (R5Q/R76E) 单价 ^{c,d}	5	114 ± 14

[0505] ^a非人类灵长类动物研究

[0506] ^b利用人类Fc检测的人类Fc捕捉

[0507] ^c利用人类Fc检测的人类IL-21捕捉

[0508] ^d非人类灵长类动物研究

[0509] ^e利用人类IL21检测的PD-1捕捉

[0510] 如表9所示,与同源二聚体R76E融合蛋白相比,单体R76E融合蛋白在静脉内给药后展现优良暴露。观察到包含IL-21双重突变蛋白(R5Q/R76E和R5E/R76A)的融合蛋白的暴露比亲本单一突变蛋白同源二聚体融合蛋白构建体(分别R76E和R76A)大(图14;表9)。

[0511] 还在食蟹猕猴中体内测试药效学(PD)参数。使用不竞争PD-1的抗体测量PD-1表达,且此PD-1取样在第-5天、第7天和第21天发生。在第1天给予动物第一剂(i)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R76E单一突变蛋白的同源二聚体的融合蛋白;(ii)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R76E单一突变蛋白的单体的融合蛋白;或(iii)包含抗PD-1 mAb和IL-21 R5Q/R76E双重突变蛋白的融合蛋白,且在第8天给予第二剂。参见图15A。

[0512] 图15B-15D显示如在第7天测量的PD-1阳性/CD4阳性细胞的变化倍数(相对于第-5天)(图15B),如在第7天测量的PD-1阳性/CD8阳性细胞的变化倍数(相对于第-5天)(图15C),和如在第21天测量的PD-1阳性/CD8阳性细胞的变化倍数(相对于第-5天)(图15D)。

[0513] 如图15B-15D所示,即使单剂包含抗PD-1 mAb和IL-21双重突变体的融合蛋白还扩增周围PD-1+/CD8+T细胞。此研究证明双重突变体融合蛋白能够以优于单一突变蛋白亲本变体的方式显著扩增PD-1+CD8 T细胞。

[0514] 还检查PD生物标记物的差异,且数据表明在施用单剂后单体构建体具有较低靶标覆盖和PD反应,但在施用多剂后PD和靶标覆盖的变化相等。这些数据表明融合蛋白的PK特性可用单体形式进一步提高。

[0515] 如图16所示,双重突变体(动物803、805、806)在CD8+细胞上的受体占用率(RO)一般与PD-1+CD8 T细胞扩增相关。单一突变体同源二聚体构建体(动物801、802)无法扩增PD-1+CD8 T细胞,可能是由于其相对不良的药代动力学特性。值得注意地,具有更需要的药代

动力学特性的双重突变蛋白构建体扩增PD-1+CD8 T细胞且PD反应与靶标覆盖相关。数据表明双重突变体融合蛋白可扩增已知与保护性抗肿瘤免疫有关的相关T细胞群体。

[0516] 图17展示在重复给药后CD8+T细胞中的PD-1靶标覆盖类似于针对抗PD-1 mAb所观察到的(抗PD-1 mAb资料未显示)。总而言之,关于双重突变体,图16和17支持如下观念:靶标群体(PD-1+CD8T细胞)的调节需要足够靶标覆盖且提高的靶标覆盖与提高的药效学反应有关。

[0517] 实例9

[0518] 本实例描述一组包含不同抗PD-1 mAb与变化同二聚体IL-21双重突变蛋白融合的融合蛋白的产生。

[0519] 如实例12中所述,产生一组抗PD-1 mAb且进行测试,且使主要mAb与某些IL-21双重突变蛋白融合。在PD-1^{-ve}与PD-1^{+ve} Hut78 T细胞中,使用STAT3磷酸化测定测试十二种包含同二聚体IL-21双重突变蛋白和抗PD-1 mAb的融合蛋白的IL-21活性,使用ForteBio Octet测定测试IL-21R结合和PD-1结合,使用PD-1Jurkat报道子测定测试PD-1活性,且使用MLR(混合淋巴细胞反应)测定测试体外活性。这些实验基本上如先前实例中所述进行。

[0520] 十二种包含抗PD-1 mAb和IL-21双重突变蛋白的融合蛋白和如这些测定中测量的其活性的清单提供于表10-12中。

[0521] 表10如通过STAT3磷酸化测定测量的IL-21活性

[0522]

PD-1 mAb	IL-21 双重突变蛋白的氨基酸取代	Hut78 (n1) PD-1 ^{+ve} EC50 (nM)	Hut78 (n2) PD-1 ^{+ve} EC50 (nM)	Hut78 (n1) PD-1 ^{-ve} EC50 (nM)	Hut78 (n2) PD-1 ^{-ve} EC50 (nM)
A-1-003 (20A2.003)	(R5A、R76E)	7.55	14.74	>1000	>1000
A-1-003 (20A2.003)	(R5Q、R76E)	3.37	16.9	>1000	>1000
A-1-003 (20A2.003)	(R5E、R76A)	5.70	25.07	618.28	>1000
A-1-003 (20A2.003)	(R9E、R76A)	25.26	59.10	>1000	>1000

[0523]

PD-1 mAb	IL-21 双重突变蛋白的氨基酸取代	Hut78 (n1) PD-1 ^{+ve} EC50 (nM)	Hut78 (n2) PD-1 ^{+ve} EC50 (nM)	Hut78 (n1) PD-1 ^{-ve} EC50 (nM)	Hut78 (n2) PD-1 ^{-ve} EC50 (nM)
A-4-006 (20C1.006)	(R5A、R76E)	7.40	15.33	>1000	>1000
A-3-009 (20C1.009)	(R5Q、R76E)	3.75	16.39	>1000	>1000
A-3-009 (20C1.009)	(R5E、R76A)	5.27	10.71	471.56	>1000
A-3-009 (20C1.009)	(R9E、R76A)	19.44	56.43	>1000	>1000
A-2-006 (22D4.006)	(R5A、R76E)	6.90	8.04	>1000	>1000
A-2-006 (22D4.006)	(R5Q、R76E)	4.45	10.32	>1000	>1000
A-2-006 (22D4.006)	(R5E、R76A)	5.34	13.11	652.02	826.11
A-2-006 (22D4.006)	(R9E、R76A)	17.41	45.63	>1000	>1000
rhIL-21 (av)	-	0.15	0.625	0.22	0.715
抗 PD-1 mAb (IgG4 同种型)		-	-	-	-
抗 PD-1 mAb (IgG1 同种型)		-	-	-	-
第 2 抗 PD-1 mAb (IgG4 同种型)		-	-	-	-

[0524] 表11IL-21R结合和PD-1结合

[0525]

PD-1 mAb	IL-21 双重突变蛋白的氨基酸取代	IL-21R Hu Kd (nM)	IL-21R Cy Kd (nM)	hPD-1 Kd (nM)	CyPD-1 Kd (nM)
A-1-003 (20A2.003)	(R5A、R76E)	>300	>300	1.9	3.1
A-1-003 (20A2.003)	(R5Q、R76E)	>300	>300	2.4	2.6
A-1-003 (20A2.003)	(R5E、R76A)	>300	>300	4.4	4.7
A-1-003 (20A2.003)	(R9E、R76A)	>300	>300	1.5	3.3
A-4-006 (20C1.006)	(R5A、R76E)	>300	>300	0.8	1.6
A-3-009 (20C1.009)	(R5Q、R76E)	>300	>300	0.7	1.4
A-3-009	(R5E、R76A)	>300	>300	0.9	2.3

[0526]

PD-1 mAb	IL-21 双重突变蛋白的氨基酸取代	IL-21R Hu Kd (nM)	IL-21R Cy Kd (nM)	hPD-1 Kd (nM)	CyPD-1 Kd (nM)
(20C1.009)					
A-3-009 (20C1.009)	(R9E、R76A)	>300	>300	0.7	1.7
A-2-006 (22D4.006)	(R5A、R76E)	>300	>300	1.0	1.5
A-2-006 (22D4.006)	(R5Q、R76E)	>300	>300	1.2	1.4
A-2-006 (22D4.006)	(R5E、R76A)	>300	>300	1.2	1.0
A-2-006 (22D4.006)	(R9E、R76A)	>300	>300	1.3	1.3
rhIL-21 (av)	-	0.038	<0.010	-	-
抗 PD-1 mAb (IgG4 同种型)		-	-	~9	~9
抗 PD-1 mAb (IgG1 同种型)		-	-	~6	~4
第 2 抗 PD-1 mAb (IgG4 同种型)		-	-	2.4	1.0

[0527]

表12PD-1活性和MLR

[0528]

PD-1 mAb	IL-21 双重突变蛋白的氨基酸取代	hPD-1 报道子 N1 (nM)	hPD-1 报道子 N1 (nM)	MLR N1 IL-2 (nM)	MLR N2 IL-2 (nM)
A-1-003 (20A2.003)	(R5A、R76E)	0.748	0.622	3.438	2.198
A-1-003 (20A2.003)	(R5Q、R76E)	0.997	0.805	4.021	1.821
A-1-003 (20A2.003)	(R5E、R76A)	0.344	0.47	2.472	1.397
A-1-003 (20A2.003)	(R9E、R76A)	0.788	0.712	2.872	1.252
A-4-006 (20C1.006)	(R5A、R76E)	-	-	-	-
A-3-009 (20C1.009)	(R5Q、R76E)	0.472	0.738	1.04	1.186
A-3-009 (20C1.009)	(R5E、R76A)	0.445	0.46	0.345	0.77
A-3-009 (20C1.009)	(R9E、R76A)	0.669	0.409	1.191	0.68
A-2-006 (22D4.006)	(R5A、R76E)	0.331	0.269	0.469	0.88

PD-1 mAb	IL-21 双重突变蛋白的氨基酸取代	hPD-1 报道子 N1 (nM)	hPD-1 报道子 N1 (nM)	MLR N1 IL-2 (nM)	MLR N2 IL-2 (nM)
A-2-006 (22D4.006)	(R5Q、R76E)	0.369	0.255	0.769	0.458
A-2-006 (22D4.006)	(R5E、R76A)	0.281	0.177	0.59	0.31
A-2-006 (22D4.006)	(R9E、R76A)	0.429	0.112	1.042	0.446
[0529] rhIL-21 (av)	-	-	-	-	-
抗 PD-1 mAb (IgG4 同种型)		1.915	2.905	1.354	3.216
抗 PD-1 mAb (IgG1 同种型)		-	-	-	-
第 2 抗 PD-1 mAb (IgG4 同种型)		0.555	0.695	0.627	0.708

[0530] 若非全部,则大多数候选融合蛋白与两种抗PD-1 mAb效能一样佳(若非更佳)。若干在MLR测定中显示针对PD-1活性的效力大于或等于抗PD-1 mAb的效力。

[0531] 在12种候选融合蛋白中,选择两种进行进一步研究。两种中的一种具有包含R5Q/R76E突变的IL-21双重突变蛋白,且第二种具有包含R9E/R76A突变的IL-21双重突变蛋白。与PD-1 mAb小组不同的抗PD-1 mAb用于与两种IL-21突变蛋白中的一种一起制造融合蛋白。十种抗PD-1 mAb用于R5Q/R76E融合蛋白,包括20A2.003(橙色菱形)、20C1.006(红色正方形)、20C1.009(绿色三角形)和22D4.006(暗紫色圆形)抗PD-1 mAb。七种抗PD-1 mAb用于R9E/R76A融合蛋白,包括20A2.003(紫色三角形)、20C1.006(红色正方形)、20C1.009(绿色三角形)和22D4.006(黑色圆形)抗PD-1 mAb。使用STAT3磷酸化测定测试融合蛋白的IL-21活性,基本上如本文所述。图18A-18B和19A-19B显示相对于rhIL-21信号(热粉色线),在PD-1^{-ve}和PD-1^{+ve} HUT78 T细胞中的活性。如这些图所示,融合蛋白在PD-1^{-ve} HUT78 T细胞中展现>1000倍减弱,但在PD-1^{+ve} HUT78 T细胞中保留效力。

[0532] 实例10

[0533] 本实例描述一组包含不同抗PD-1 mAb与变化单体和同二聚体IL-21双重突变蛋白融合的融合蛋白的产生。

[0534] 产生一组包含抗PD-1 mAb和单体或同二聚体IL-21双重突变蛋白的融合蛋白。包含抗PD-1 mAb和IL-21双重突变蛋白的一系列融合蛋白提供于表13中。

[0535] 表13

PD-1 mAb	IL-21 双重突变蛋白的氨基酸取代	IL-21 突变蛋白: 同源二聚体或单体	融合蛋白的 IL-21 突变蛋白部分的 SEQ ID NO:
A-2-006 V4 (22D4.006 V4)	R5E/R76A	单体	238
A-2-006 V4 (22D4.006 V4)	R9E/R76A	单体	244
A-2-006 V4 (22D4.006 V4)	R5A/R76E	单体	237
A-2-006 V4 (22D4.006 V4)	R5Q/R76E	单体	241
A-2-006 (22D4.006)	R5E/R76A	同源二聚体	238
A-2-006 (22D4.006)	R9E/R76A	同源二聚体	244
A-2-006 (22D4.006)	R5A/R76E	同源二聚体	237
A-2-006 (22D4.006)	R5Q/R76E	同源二聚体	241
A-2-006 V106 (22D4.006 V106)	R5Q/R76E	单体	241
A-2-006 V112	R5Q/R76E	单体	241
A-2-006 V106 (22D4.006 V106)	R9E/R76A	单体	244
A-2-006 V112 (22D4.006 V112)	R9E/R76A	单体	244
A-1-003 V4 (20A2.003 V4)	R5E/R76A	单体	238
A-1-003 V4 (20A2.003 V4)	R9E/R76A	单体	244
A-1-003 V4 (20A2.003 V4)	R5A/R76E	单体	237
A-1-003 V4 (20A2.003 V4)	R5Q/R76E	单体	241
A-1-003 (20A2.003)	R5E/R76A	同源二聚体	238
A-1-003 (20A2.003)	R9E/R76A	同源二聚体	244
A-1-003 (20A2.003)	R5A/R76E	同源二聚体	237
A-1-003 (20A2.003)	R5Q/R76E	同源二聚体	241
A-1-003 V106 (20A2.003 V106)	R5Q/R76E	单体	241
A-1-003 V112 (20A2.003 V112)	R5Q/R76E	单体	241
A-1-003 V106 (20A2.003 V106)	R9E/R76A	单体	244
A-1-003 V112 (20A2.003 V112)	R9E/R76A	单体	244
rhIL-21 (av)	-		
抗 PD-1 mAb (IgG4 同种型)			

PD-1 mAb	IL-21 双重突变蛋白的氨基酸取代	IL-21 突变蛋白: 同源二聚体或单体	融合蛋白的 IL-21 突变蛋白部分的 SEQ ID NO:
抗 PD-1 mAb (IgG1 同种型)			
第 2 抗 PD-1 mAb (IgG4 同种型)			

[0538] 在PD-1^{-ve}与PD-1^{+ve} Hut78 T细胞中,使用STAT3磷酸化测定测试融合蛋白的IL-21活性,使用ForteBio Octet测定测试IL-21R结合和PD-1结合,使用PD-1Jurkat报道子测定测试PD-1活性,且使用MLR测定测试体外活性。这些实验基本上如先前实例中所述进行。如这些体外测定中测量的活性展示于图20-23中。

[0539] 图20A-20D表示在若干抗PD-1 mAb-IL-21单体或同二聚体双重突变蛋白融合物下观察到的pSTAT3信号传导的量。用rhIL-21刺激的pSTAT3信号传导以红色展示于图顶部,而用IgG1对照物刺激的pSTAT3信号传导以灰色展示(图底部),且用IgG2对照物刺激的pSTAT3信号传导以橙色显示(图底部)。经抗PD-1 mAb(呈mAb存在;即,并非呈融合物)刺激的pSTAT3信号传导以绿色显示(图底部)。用对照抗PD-1 mAb刺激的pSTAT3信号传导以橙色和黄色显示(图底部),而其余线代表在用抗PD-1 mAb-IL-21单体或二聚双重突变蛋白融合物

(具有多个电荷对突变)刺激后实现的pSTAT3信号传导,其中双重突变体为R5E/R76A;R9E/R76A;R5A/R76E或R5Q/R76E。如此组图所示,rhIL-21显示在PD-1^{-ve}与PD-1^{+ve}细胞中的活性。相比之下,单体和同源二聚体双重突变蛋白融合物仅仅在PD-1^{+ve}细胞中能够显示pSTAT3(基于IL-21)活性,而在PD-1^{-ve}细胞中则不能。因此,具有IL-21双重突变体的单体融合物展现与其对应二聚融合物类似水平的在PD-1^{-ve}细胞中的IL-21活性减弱和PD-1^{+ve}细胞中的IL-21活性拯救。

[0540] 在PD-1报道基因测定(RGA;图21A和21B)和MLR测定(图21C和21D)中测试在图20A-20D中评估的融合蛋白。图21A-21D中所示的结果证明抗PD-1 mAb-IL-21单体和二聚双重突变蛋白融合物能够诱导PD-1活性。

[0541] 测试除不同抗PD-1 mAb外,与图20A-20D中的构建体相同的抗PD-1 mAb-IL-21单体和二聚双重突变蛋白融合物构建体的pSTAT3测定的结果展示于图22A-22D中。图22A-22D中的结果类似于图20A-20D中所见的结果。

[0542] 测试除不同抗PD-1 mAb外,与图21A-21D中的构建体相同的抗PD-1 mAb-IL-21单体和二聚双重突变蛋白融合物构建体的PD-1报道基因测定和MLR测定的结果展示于图23A-23D中。

[0543] 这些资料证明包含IL-21双重突变蛋白的融合蛋白部分减弱可无需同源二聚体构型。选择以下双重突变蛋白(呈单体或同源二聚体融合)与抗PD-1 mAb融合(表14),用于进一步评估。

[0544] 表14

[0545]	IL-21突变蛋白	形式
A-2-017 (22D4.017)	R5Q:R76E	同源二聚体
A-2-017 (22D4.017)	R5Q:R76E	V1单体
A-2-017 (22D4.017)	R9E:R76A	同源二聚体
A-2-017 (22D4.017)	R9E:R76A	V1单体

[0546] 基于细胞的数据表明这些突变蛋白在与PD-1抗体融合时,可选择性地靶向表达PD-1受体的T细胞(使用T细胞系证明)。这些双官能PD-1×IL-21分子具有自融合分子的各臂(抗PD-1 mAb和IL-21突变蛋白)获得的独特性质。

[0547] 实例11

[0548] 以下材料和方法用于实例中。

[0549] 抗PD-1Ab-IL-21突变蛋白融合物的产生

[0550] 将重组抗PD-1Ab-IL-21突变蛋白序列克隆至pTT5中以在HEK293-6E中短暂表达,或克隆至含有抗生素选择盒的载体中以在CHO-K1细胞中稳定表达。表达产生在36°C下进行5-7天,且收获上清液进行纯化。所有蛋白质批次通过蛋白A亲和层析法(Mab Select SuRe)来纯化,接着阳离子交换(SP Sepharose HP),且缓冲液交换(UF/DF)成A5.2Su缓冲液。通过尺寸排阻层析,所有批次均>95%主峰,其中内毒素<0.2EU/mg(查尔斯河公司(Charles River)的Endosafe LAL)。

[0551] JurkatPD-1报道基因测定

[0552] 将GloResponse JurkatNFAT-luc2/PD-1稳定效应细胞(普洛麦格公司(Promega),#CS187102)和CHO PD-L1稳定细胞系(普洛麦格公司(Promega),#CS178103)以

1.25:1的比率在连续稀释的抗体存在下在37°C、5%CO₂下一式三份地共培养6小时。使用Bio-Glo荧光素酶测定系统(普洛麦格公司(Promega), #G7940)测量发光。

[0553] STAT3磷酸化测定

[0554] pSTAT3 AlphaScreen.接着将HuT 78亲本和HuT 78PD-1稳定细胞系在连续稀释的抗体存在下在37°C、5%CO₂下以每孔40,000个细胞一式三份地接种至单独盘上,历时40分钟。使用AlphaLisa Surefire Ultra Pstat3 (Tyr705) 测定试剂盒(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer), #ALSU-PST3-A10K)测量Pstat3 Tyr705水平。

[0555] HTRF磷酸化STAT3测定。将细胞在补充有1%L-谷氨酰胺的RPMI 1860培养基(海克隆公司(HyClone)目录号SH30034.01)中血清饥饿隔夜。接着使细胞以 2.5×10^6 细胞/毫升悬浮于不含钙和镁的汉克平衡盐液(Hanks' Balanced Salt Solution)(HBSS;赛默飞世尔公司(ThermoFisher)目录号14175095)中,且8微升/孔涂铺在384孔小体积白色盘(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer)目录号6008289)。接着在37°C下用于HBSS中稀释的4微升/孔IL-21突变蛋白分子刺激细胞40分钟。根据制造商的建议(希思公司(Cisbio)目录号64NT3PEH)使用HTRF®磷酸化-STAT3 (Tyr705) 测定试剂盒,检测STAT3磷酸化。使用EnVision Multilable盘式读数器(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))检测来自测定的FRET信号。通过如希思公司(Cisbio)所建议,首先测量HTRF比率,接着使用来自未受刺激的细胞的数据计算相对于背景值的倍数来分析数据。对于每个实验,绘制给药曲线,且所给药的分子的效力表示为观察到限定的相对于背景值的倍数的浓度。

[0556] 混合淋巴细胞反应 (MLR)

[0557] 自AllCells公司(AllCells Inc)获得错配供体对leukopak。使用全T细胞分离试剂盒(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec), #130-096-535)分离供体T细胞,且使用全单核细胞分离试剂盒(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec), #130-096-537)分离错配供体的单核细胞。使用CellXVivo人类单核细胞衍生的树突状细胞分化试剂盒(研究开发系统公司(R&D Systems), #CDK004)使单核细胞进一步成熟10天。将全T细胞与成熟单核细胞在37°C、5%CO₂下在连续稀释的抗体存在下以10:1的比率一式三份地培养72小时。通过ELISA(默沙东公司(Mesoscale Discoveries), #K151QQD-4)测量上清液IL-2水平。

[0558] IL-21R和PD-1结合测定

[0559] 人类和食蟹猕猴IL-21R结合亲和力:测试单价IL-21R-FLAG-His与二价IL-21R-Fc重组试剂,但产生非常类似的结果(约2-3倍内)。重组可溶性IL-21R试剂最低程度地生物素化,且捕捉在抗生蛋白链菌素SAX尖端上至2.0nm负载水平。接着将尖端在其中PD-1抗体-IL-21样品3倍连续稀释的孔中培育。对于野生型IL-21融合物,最高样品浓度为10nM,而对于IL-21突变蛋白融合物,最高样品浓度为300nM。20分钟的缔合时间和1.5小时的解离时间用于最大化结合图中的曲率以获得准确动力学拟合。

[0560] 人类和食蟹猕猴PD-1结合亲和力:人类和食蟹猕猴PD-1结合亲和力通过首先经由EDC-NHS胺与AR2G尖端偶合来捕捉PD-1抗体-IL-21样品进行测试;样品负载通常在pH 6下进行2000秒,接着用1M乙醇胺淬灭,以固定至少2nm水平。一旦样品固定,将尖端在含有可溶性重组受体人类PD-1(1-170)-FLAG-His或食蟹猕猴PD-1(1-167)-FLAG-His的3倍连续稀释液的孔中培育。在两种情况下,最高PD-1浓度为30nM。使用300秒的缔合和500秒的解离,因为其产生足够曲率用于准确动力学拟合。

[0561] 用ForteBio Octet HTX和RED384仪器定量以上人类/食蟹猕猴IL-21R和人类/食蟹猕猴PD-1结合亲和力。在所有情况下,标准Octet样品缓冲液用于样品稀释和所有结合基线、缔合和解离步骤(10mM Tris pH 7.5、150mM NaCl、1mM CaCl₂、0.10mg/ml BSA、0.13% (v/v) Triton X-100)。

[0562] 所有ForteBio原始数据均以下列方式使用标准仪器数据分析软件(v9和v10)进行处理:(a)将具有固定靶标但无相互作用(即仅仅缓冲液)的两种参考尖端曲线求平均值且自相同管柱中的剩余样品尖端曲线中减去;(b)分离缔合与解离曲线且对准Y轴;(c)对准缔合和解离中间步骤;(d)执行萨维茨基-格雷过滤(Savitzky-Golay filtering)以减少信号噪声;和(e)所获得的各样品-靶标相互作用的缔合和解离曲线组整体上拟合单一1:1结合模型,以确定缔合速率常数 k_a 和解离速率常数 k_d 的测量值;平衡解离常数 K_D 计算为解离速率与缔合速率常数的比率($=k_d/k_a$)。

[0563] 实例12

[0564] 本实例描述用于包含IL-21突变蛋白的融合蛋白中的抗PD-1mAb的产生。

[0565] 抗PD-1免疫反应的产生

[0566] 小鼠品系

[0567] 通过对XENOMOUSE®转基因小鼠进行免疫接种来产生针对人类PD-1的完全人类抗体(美国专利第6,114,598号;第6,162,963号;第6,833,268号;第7,049,426号;第7,064,244号,将其通过引用以其全文并入本文中;Green等人,1994,Nature Genetics[自然遗传学]7:13-21;Mendez等人,1997,Nature Genetics[自然遗传学]15:146-156;Green和Jakobovits,1998,J.Ex.Med[实验医学杂志],188:483-495;Kellerman和Green,Current Opinion in Biotechnology[生物技术新观点]13,593-597,2002)。来自XM4-K和XM4-KL XENOMOUSE®品系的动物用于这些免疫接种。

[0568] 免疫接种

[0569] 基于细胞的免疫接种途径用于产生抗人类PD-1免疫反应。将CHO-S细胞用经由Gly-Ser-Ser接头与E3K T细胞抗原决定基标签融合的人类PD-1或者食蟹猕猴PD-1作为免疫原来源短暂转染。将动物用这些经短暂转染的CHO细胞中的任一个进行免疫接种,将Alum与CpG-ODN混合,使用TIP(尾根和腹膜内)注射在8周内进行13次。初始的增强免疫由四百万表达人类PD-1的细胞构成,而随后的增强免疫含有两百万表达人类或食蟹猕猴PD-1的细胞。用人类PD-1(1-6、8、10和13)进行总共9次免疫接种,且剩余4次免疫接种用食蟹猕猴PD-1进行。在第10次增强免疫之后将动物放血,以评定PD-1特异性效价。

[0570] 通过Accuri流式细胞仪上活细胞FACS分析,监测PD-1特异性血清效价。简言之,将HEK293细胞用人类或食蟹猕猴PD-1模拟转染或短暂转染。将来自经免疫接种的动物的血清稀释100倍且在转染细胞上冰上培育1小时。接着洗涤细胞,以移除未结合的抗体,且用Cy5标记的二级抗人类Fc特异性抗体在细胞上在4°C下另外培育15分钟。将细胞洗涤一次,以移除未结合的二级抗体,且通过FACS定量细胞上的荧光信号。针对人类和食蟹猕猴PD-1具有最高抗原特异性血清天然效价的动物用于产生杂交瘤(Kohler和Milstein,1975)。

	免疫原	佐剂	品系	收获
[0571]	人类 PD-1 或食蟹猕猴 PD-1 短暂转染至 CHO-S	Alum + CpG ODN	G4K	4 只小鼠
			G4KL	4 只小鼠

[0572] 单克隆抗体的制备

[0573] 杂交瘤产生

[0574] 鉴别展现合适血清效价的动物且自脾和/或引流淋巴结获得淋巴细胞。通过在合适培养基(例如达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM); 加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司(Invitrogen, Carlsbad, CA))中研磨,自淋巴组织解离汇集的淋巴细胞(来自各次收获)。使用标准方法选择和/或扩增B细胞,且使用本领域中已知的技术与合适融合配偶体融合。

[0575] 膜制剂的产生:

[0576] 使用293fectin™转染试剂(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher)),目录号:12347019)将2000万293T细胞用pTT5-mini4:huPD-1::GSS:E3K转染。在转染之后24小时,通过将293T细胞在含有EZ-Link™NHS-LC-LC-生物素(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher),目录号:21343)的pH 8.6PBS中以400µg/mL培育30分钟,将这些细胞生物素化。接着在中性pH PBS中洗涤细胞,接着再悬浮于含有无EDTA的蛋白酶抑制剂和10%triton X100的低渗缓冲液中。通过经具有26规格针的注射器重复抽吸使细胞破碎。通过在12000G下离心20分钟,使细胞片段粒化。接着收集含有膜颗粒的上清液,且在Amicon Ultracel 100k离心管柱(密理博公司(Millipore),目录号UFC810024)中用PBS洗涤3次,以移除洗涤剂。接着在追踪命(tracking hit)中(对PD-1具有特异性的阳性对照杂交瘤细胞)上测试膜制剂以检查IgG相关的膜制剂结合。接着将膜制剂等分试样,且冷冻在-20°C下,直至使用。

[0577] 杂交瘤细胞的抗原特异性染色:

[0578] 将杂交瘤细胞自烧瓶移除,且在无菌FACS缓冲液(含2%FBS的PBS)中洗涤。接着将细胞与PD-1膜制剂(在FACS缓冲液中1:10稀释,1mL反应体积,例如900µL FACS缓冲液中100µL膜制剂)混合且在4°C下培育1小时。将细胞再次在FACS缓冲液中洗涤,且用1mL含有5µg/mL Alexa Fluor 488结合的F(ab')₂片段山羊抗人类IgG Fc(杰克逊公司(Jackson),目录号:109-546-098)和Alexa Fluor647结合的抗生蛋白链菌素(杰克逊公司(Jackson),目录号:016-600-084)的检测混合物染色,接着在4°C下在黑暗中培育30分钟。将细胞再次在FACS缓冲液中洗涤,再悬浮于培养基中,接着穿过40微米细胞过滤器以移除聚集的细胞。使用BD FACSAria 3,通过对展现Alexa Fluor 488与Alexa Fluor 647荧光的群体(IgG+和抗原结合细胞)进行闸控,将抗原特异性细胞分类。

[0579] 将经分类的细胞在杂交瘤培养基中培养几天。取出富集细胞的小样品,且使用与如上所提及相同的染色条件,测试与PD-1膜制剂的结合。在证实PD-1特异性细胞成功富集之后,接着使用BD FACSAria3,将杂交瘤进行单细胞分类至384孔微量滴定盘。在培养2周之后,自微量滴定盘收集上清液,且针对PD-1结合进行筛选。

[0580] PD-1特异性结合抗体的初始选择

[0581] 通过Cell Insight,针对与在HEK293细胞上短暂表达的人类PD-1的结合,测试耗尽型杂交瘤上清液。简言之,使用293Fectin将HEK293细胞用编码PD-1的哺乳动物表达构建体短暂转染。第二天,将15µL耗尽型杂交瘤培养基添加至384孔FMAT盘的各孔中。接着将经转染的HEK293细胞(27万/mL)、核染剂Hoechst 33342(7.5µg/mL)和二级检测抗体(0.75µg/mL-山羊抗人类IgG(H+L)Alexa 488(杰克逊免疫研究公司(Jackson ImmunoResearch)))混合,且将30µL此混合物添加至384孔FMAT盘的各孔中。在约3小时之后,使用AquaMax盘式读

数器吸出上清液,且使用多点仪器将30 μ L FACS缓冲液添加至各孔中。将盘置于Big Bear盘式震荡器上,以使细胞均匀分布在孔中,接着在Cell Insight平台上使用Cell Health Bio-App读取。此分析可鉴别出来自此次收获的383种抗原特异性抗体。

[0582] Jurkat人类PD-1/NFAT-荧光素酶报道子测定

[0583] 将稳定表达人类PD-1和NFAT-荧光素酶报道子的Jurkat细胞(普洛麦格公司(Promega))在补充有10%胎牛血清(西格玛公司(Sigma))、2mM L-谷氨酰胺(西格玛公司(Sigma))、10mM HEPES(海克隆公司(Hyclone),通用医疗集团(GE Healthcare Life Sciences))、500 μ g/mL遗传霉素(geneticin)(吉博科生命科学(Gibco Life Technologies))、100 μ g/mL潮霉素B(英杰公司(Invitrogen))的RPMI 1640培养基(西格玛公司(Sigma))中在37 $^{\circ}$ C/5%CO₂下培养。将稳定表达食蟹猕猴PD-1和NFAT-荧光素酶报道子的Jurkat细胞(普洛麦格公司(Promega))在补充有10%胎牛血清(西格玛公司(Sigma))、2mM L-谷氨酰胺(西格玛公司(Sigma))、10mM HEPES(海克隆公司(Hyclone),通用医疗集团(GE Healthcare Life Sciences))、200 μ g/mL潮霉素B(英杰公司(Invitrogen))、300 μ g/mL吉欧霉素(英杰公司(Invitrogen))的RPMI 1640培养基(西格玛公司(Sigma))中在37 $^{\circ}$ C/5%CO₂下培养。将稳定表达人类PD-L1的中国仓鼠卵巢(CHO)纯细胞系99(普洛麦格公司(Promega))在Nutrient Mixture F12 HAM(西格玛公司(Sigma))、10%胎牛血清、10mM HEPES、250 μ g/mL遗传霉素、200 μ g/mL潮霉素B中在37 $^{\circ}$ C/5%CO₂下培养。在实验当天,将JurkatNFAT-荧光素酶/PD-1细胞和CHO纯系99PD-L1细胞(用胰蛋白酶分离)在200x g下离心5分钟,且再悬浮在测定培养基(RPMI 1640培养基、2%胎牛血清、15mM HEPES)中。在384孔黑色/透明底测定盘(康宁公司(Corning))中使用测定缓冲液稀释和滴定测试分子。通过首先以1:1比率混合所制备的细胞,接着添加细胞混合物至测定盘中,将所制备的细胞以40,000细胞/孔接种。将盘在37 $^{\circ}$ C/5%CO₂下培育18至24小时。通过Bio-Glo荧光素酶测定系统试剂(普洛麦格公司(Promega))测量产生的荧光素酶的量,接着将盘在室温下培育20分钟,且用EnVision盘式读数器(珀金埃尔默公司(PerkinElmer))检测发光。对于单点测定,首先定量ESN样品,标准化且以0.5 μ g/mL测试。为测量效力,将ESN样品或纯化抗体在测定培养基中连续滴定3倍且用于处理人类或食蟹猕猴PD-1报道细胞。在单一浓度筛选和效力分级期间显示所需活性的抗体数目展示于表15中。

[0584] 表15

单点	效力分级	独特序列
86/383	12/86	4/12

[0586] 经纯化的抗PD-1抗体(对于所示人类PD-1测定,n=1)的活性展示于图24中且在人类和食蟹猕猴PD-1报道子测定中纯化的抗PD-1抗体的效力列于表16中。

[0587] 表16

Ab ID	效力 (nM)			
	人类 PD-1 n=1	人类 PD-1 n=2	食蟹猕猴 PD-1 n=1	食蟹猕猴 PD-1 n=2
A-1 (20A2)	3.10	1.27	2.34	ND
A-3 (20C1)	5.51	1.88	5.17	4.16
A-2 (22D4)	2.43	0.71	2.72	2.89

[0589] PD-1拮抗剂抗体的分子拯救和测序

[0590] 使用Qiagen RNeasy mini或Invitrogen mRNA catcherplus试剂盒,自含有产生PD-1拮抗剂抗体的杂交瘤细胞的孔纯化RNA(总RNA或mRNA)。经纯化的RNA用于使用经由逆转录的cDNA合成、接着聚合酶链反应(RT-PCR)来扩增抗体重链和轻链可变区(V)基因。使用Qiagen单步逆转录酶PCR试剂盒(凯杰公司(Qiagen))获得完全人类抗体 γ 重链。此方法用于自RNA模板产生第一链cDNA,接着使用多重PCR扩增 γ 重链的可变区。将5' γ 链特异性引物与抗体重链的信号序列退火,而3'引物与 γ 恒定域的区域退火。使用Qiagen单步逆转录酶PCR试剂盒(凯杰公司(Qiagen))获得完全人类 κ 轻链。此方法用于自RNA模板产生第一链cDNA,接着使用多重PCR扩增 κ 轻链的可变区。将5' κ 轻链特异性引物与抗体轻链的信号序列退火,而3'引物与 κ 恒定域的区域退火。使用Qiagen单步逆转录酶PCR试剂盒(凯杰公司(Qiagen))获得完全人类 λ 轻链。此方法用于自RNA模板产生第一链cDNA,接着使用多重PCR扩增 λ 轻链的可变区。将5' λ 轻链特异性引物与轻链的信号序列退火,而3'引物与 λ 恒定域的区域退火。

[0591] 使用外切核酸酶I和碱性磷酸酶将扩增的cDNA以酶法纯化,且直接对经纯化的PCR产物测序。通过生物信息学方法,自对应核酸序列推导出氨基酸序列。各杂交瘤样品完成两次另外的独立的RT-PCR扩增和测序循环,以证实观察到的任何突变并非PCR的结果。接着分析衍生的氨基酸序列,以确定抗体的种系序列起源,且鉴别与种系序列的偏差。指示重链和轻链序列中每一个与其原始种系序列的比较。将对应于测序抗体的互补决定区(CDR)的氨基酸序列比对,且这些比对用于通过类似性将纯系分组。

[0592] 原代细胞结合测定

[0593] 通过流式细胞术测试杂交瘤上清液与由原代人类和食蟹猕猴细胞表达的PD-1的结合。对于人类原代细胞结合测定,将经纯化的人类T细胞(生物专业公司(Biological Specialty Corp.))解冻且以 2.5×10^6 细胞/毫升的浓度悬浮。在 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 下将T细胞在预涂 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗小鼠IgG Fc(皮尔斯公司(Pierce))的盘中用 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗人类CD3纯系OKT3(e生物科学公司(eBioscience))和 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗人类CD28(BD Pharmingen公司)刺激72小时。在72小时之后,移出细胞,洗涤且以 0.5×10^6 细胞/毫升的浓度用 $10\text{ng}/\text{mL}$ IL-2(派普泰克公司(Pepro Tech))悬浮。接着将细胞在 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 下再培育48小时。对于食蟹猕猴原代细胞结合测定,将食蟹猕猴PBMC(SNBL)解冻且以在 4×10^6 与 5×10^6 细胞/毫升之间的浓度悬浮。在 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 下将PBMC在预涂 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗小鼠IgG Fc(皮尔斯公司(Pierce))的盘中用 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗人类CD3纯系SP34(BD Pharmingen公司)和 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗人类CD28(BD Pharmingen公司)刺激72小时。在72小时之后,移出细胞,洗涤且以 0.5×10^6 细胞/毫升的浓度用 $20\text{ng}/\text{mL}$ IL-2(派普泰克公司(Pepro Tech))悬浮。接着将细胞在 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 下再培育48小时。在最终培育之后,通过以 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 最终浓度与标准化的杂交瘤上清液、阳性对照抗体和同种型对照抗体一起培育来制备细胞,以用于流式细胞术。 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ Alexa Fluor 647AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人类IgG(H+L)(杰克逊免疫研究公司(Jackson ImmunoReserach))用于二级检测且 8.25nM YoPro1(英杰公司(Invitrogen))用于活/死细胞染色。接着细胞在BD FACSCanto II流式细胞仪上跑动以检测抗PD-1抗体结合。结果表示为表达PD-1的细胞的FACS几何平均值,且资料展示于表17中。

[0594] 表17

抗体 ID	原代食蟹猕猴 (FACS 几何平均值)	原代人类 (FACS 几何平均值)
[0595] A-1 (20A2)	194	326
A-3 (20C1)	187	312
A-2 (22D4)	188	329

[0596] 受体-配体竞争测定

[0597] 接着测试结合PD-1的杂交瘤上清液阻断PD-1结合配体的能力。在抗原特异性杂交瘤上清液样品上,使用FACS,在短暂表达人类PD-1的HEK293细胞上如下进行竞争性结合测定。将表达人类PD-1的HEK293细胞与抗体样品(对PD-1具有特异性的杂交瘤上清液)混合且在4°C下培育1小时,接着洗涤两次。接着将具有结合样品的细胞与huPD-L1-Fc-Alexa647或huPD-L2-Fc-Alexa 647(明尼苏达州明尼阿波利斯的研究开发系统公司(R&D systems, Minneapolis, MN))在4°C下一起培育45分钟。接着添加7-AAD细胞活力染剂,且将细胞在4°C下进一步培育15分钟,洗涤两次且再悬浮于FACS缓冲液中。使用BD Accuri™流式细胞仪和Intellicyt HyperCyt自动取样器分析样品。表18中的数据反映在1 μ g/mL下人类PD-L1或PD-L2与人类PD-1的结合的抑制百分比。

[0598] 表18

[0599] PD-L1或PD-L2与PD-1结合的抗PD-1抗体的竞争分析

抗体ID	R-LPD-L1 (抑制%)	R-LPD-L2 (抑制%)
[0600] A-1 (20A2)	72%	71%
A-3 (20C1)	64%	65%
A-2 (22D4)	71%	72%

[0601] 亲和力缺口分析

[0602] 使用KinExA®方法评估若干抗体的动力学测量。此方法包括基于溶液,测量平衡状态下的形式亲和力测量。

[0603] 通过首先用生物素化BSA、Neutravidin吸附涂布PMMA珠粒,接着用生物素化PD-1涂布,将聚(甲基丙烯酸甲酯)或PMMA珠粒用生物素化人类PD-1涂布。

[0604] 使用自动化流动免疫测定系统KinExA 3200进行KinExA实验,其中与PD-1偶合的珠粒用作固相。简言之,将恒定量的抗hPD-1 mAb (3nM或1nM或100pM)与在样品缓冲液(具有0.1%BSA的PBS以减少非特异性结合)中以100nM起始的滴定浓度的h-PD-1或cy-PD-1一起培育。将抗原/抗体复合物在室温下培育48小时至72小时以达到平衡。使混合物穿过PD-1偶合的珠粒以累积未结合的抗体。变化混合物的体积和流速,视各实验中获得的特定信号而定。

[0605] 使用含有二级Ab山羊抗Hu IgG (H+L) -Alexa647抗体在样品缓冲液中的溶液检测捕捉的mAb。结合信号转变成相对值,呈缺少hu-PD-1或cy-PD-1下对照物的比例形式。针对所有平衡实验,测量各样品的两个复制物。使用KinExA n-曲线分析软件内含有的单点均一结合模型,自数据的非线性回归分析获得平衡解离常数(Kd)。软件计算Kd且通过将数据点与理论Kd曲线拟合,确定95%置信区间。给予95%置信区间为Kd低和Kd高。

[0606] 表19

[0607] 经纯化的抗PD-1抗体对重组人类和食蟹猕猴PD-1的亲和力

[0608]	对人类 PD-1 的亲合力			对食蟹猕猴 PD-1 的亲合力				
[0609]	mAb ID	KD (pM)	95% CI (pM)	%活性 mAb	KD (pM)	95% CI (pM)	%活性 mAb	Hu:Cy 差异倍数
	A-1 (20A2)	17	13-23	25	15	12-19	21	0.9
	A-3 (20C1)	16	13-21	17	60	52-68	18	3.8
	A-2 (22D4)	4.5	3.6-5.5	27	3.7	2.7-4.8	23	0.8

[0610] Kd通过取PD-1浓度为已知浓度且用软件计算Kd和mAb浓度来计算。

[0611] MLR测定中证实经纯化抗体的活性

[0612] 将人类不成熟单核细胞衍生的树突状细胞(阿斯塔特公司(Astarte))解冻且使用CellXVivo人类单核细胞衍生的树突状细胞分化试剂盒(研究开发系统公司(R&D Systems)#CDK004),经由在IL-4、GM-CSF和TNF- α 中培养72小时,分化成成熟树突状细胞。将未黏附和松散黏附的细胞移除,组合且离心以使细胞粒化。在移除培养基之后,使细胞以 400×10^3 细胞/毫升再悬浮在X-Vivo-15培养基中且将树突状细胞添加至96孔盘的各孔(50 μ L中20k细胞)。使人类T细胞(阿斯塔特公司(Astarte))迅速解冻,且在X-Vivo-15培养基中洗涤。使细胞以 2×10^6 细胞/毫升再悬浮且添加100 μ L至各孔(200k细胞/100 μ L)。将抗体稀释且以50 μ L总体积添加至各孔中。将混合物在37 $^{\circ}$ C下培育三天。此时,将细胞短暂离心,且175 μ L用于根据制造商建议,使用IL-2V-Plax试剂盒(MSD)测量IL2产生,作为T细胞增殖的量度。

[0613] 表20

[0614]	抗体ID	MLRIC50 (nM)	MLRIC50 (nM)
	A-1 (20A2)	0.73	0.80
	A-3 (20C1)	0.97	1.65
	A-2 (22D4)	0.65	0.58

[0615] 实例13

[0616] 可能时,对A-1 (20A2)、A-3 (20C1)和A-2 (22D4)抗PD-1可变域序列进行工程化以移除具有侧链降解风险的基序。此类氨基酸基序包括:(1)有天冬酰胺脱酰胺倾向的CDR 'NG'和'NT'序列;(2)有天冬氨酸异构化倾向的CDR 'DG'、'DH'、'DS'和'DT'序列;和(3)有氧化倾向的CDR3色氨酸。通常,取代性质来源于种系序列或序列相关的PD-1结合mAb。对于生物信息学或结构分析不提供明确取代性质的情况下,选择化学上类似于亲本残基的残基类型。

[0617] 还移除违反基于多重序列比对的成对残基协方差趋势的可变域序列基序。经由用种系或种系相关的残基类型补救成对协方差违反者可使可制造性更佳,因为mAb表达水平和生物物理学稳定性增加。参见Kannan,G.Method of Correlated Mutational Analysis to Improve Therapeutic Antibodies.[用于改进治疗性抗体的相关突变分析方法]美国专利申请案PCT/US2012/028596,于2012年3月9日申请。如上所论述,使用类似于用于补救降解位点的方法,选择协方差违反者的取代性质。

[0618] 20A2工程化产生20A2.003。20C1工程化产生20C1.006和20C1.009。22D4工程化产生22D4.006和22D4.017。

[0619] 实例14

[0620] 在未处理的非人类食蟹猕猴中评估包含抗PD-1抗体22D4.017与包含R9E和R76A突变的IL-21双重突变蛋白融合的融合蛋白(“[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)”)的体内活性。第一组猴接受单独抗PD-1抗体22D4.017(不与IL-21突变蛋白融合),且第二组猴接受融合蛋白[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)。使用FACS,在外周血中监测药效学(PD)参数,且包括免疫细胞动力学和淋巴细胞中的STAT3转录因子磷酸化(pSTAT3)。还通过Millipore Milliplex®多分析物概况测定(MAP)多重测定,检查血清细胞因子和穿孔素。进行外周血参数的给予前分析以允许数据集相对于基线标准化。给药在第1天开始。在预定固定时间点提取血液和血清。

[0621] 尽管T细胞中Ki67[图25A和25B]和STAT3[图25C和25D]活化,但在施用22D4.017抗体或者[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)融合蛋白的组中未观察到整批T细胞群体显著增加[图25A和25B],此表明这些处理自身均不足以诱导整批T细胞群体扩增[图25E和25F]。这些资料支持以下概念:PD-1信号传导的全身性阻断可能对整批T细胞群体具有更整体的影响,包括活化STAT3信号传导和Ki67,但这些变化可能单独不足以表明显著功能输出(还如抗PD-1单一疗法或融合蛋白治疗无法诱导更广泛的T细胞扩增所证明)。

[0622] 为更好地了解近端信号传导的变化可如何具体地影响表达PD-1的T细胞,且因为PD-1(+)T细胞仅仅反映外周血中整批T细胞群体的一小部分,所以通过使用非竞争性PD-1检测mAb对PD-1(+)CD4和CD8 T细胞进行闸控,更直接地检查这些细胞[图16和17]。在循环PD-1(+)细胞的绝对数初始轻度减少之后,在[22D4.017]抗体组中此群体保持稳定。相比之下,在外周血PD-1(+)CD4和CD8T细胞的数目初始减少之后,在[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)融合蛋白处理组群体中给药后336小时观察到PD-1(+)细胞的数目显著回弹(超过基线)[图25G]。因此,尽管缺乏整批群体的显著扩增,但这些数据表明在施用[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)融合蛋白后PD-1(+)T细胞数目选择性地增加[图]。

[0623] 为确定PD-1(+)T细胞的扩增的可能功能影响,检查PD-1(+)CD4/8T细胞与血清穿孔素之间的关系。实际上,数据表明此两个参数之间存在正向关系:血清穿孔素在施用[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)融合蛋白的动物中最高,其经历外周血PD-1(+)T细胞的显著增加[图25I]。

[0624] 综上所述,这些数据表明虽然[22D4.017]-[R9E:R76A](单体)融合蛋白的全身性暴露无法显现总的整批T细胞群体增加,但在相同细胞(表达PD-1)上PD-1的阻断和IL-21信号的同时递送足以诱导群体扩增。这还与血清穿孔素的增加相关[图25I]。

[0625] 实例15

[0626] 以下实例证明多种抗PD-1抗体的结合亲和力。

[0627] 抗PD-1抗体::PD-10tet结合亲和力如下表征。为定量抗PD-1抗体与重组可溶性人类和食蟹猕猴PD-1之间的 K_D 结合亲和力(平衡解离常数),使用16尖端模式的Pall® ForteBio® Octet® RED384仪器或者96尖端模式的Pall® Octet® HTX仪器测量结合和解离速率常数。在所有情况下,第二代胺反应性光纤生物传感器尖端(AR2G)用于共价捕捉抗体至在2.5与4nm之间的最终负载水平。结合测定法使用以下固定步骤:(1)在水中平

衡,60秒;(2)用与10mM N-羟基磺基丁二酰亚胺(磺基-NHS)混合的新鲜20mM 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳化二亚胺盐酸盐(EDC)活化,600秒;(3)固定在10mM乙酸盐pH 6.0缓冲液中稀释的20nM抗体,2000秒;(4)用1M乙醇胺淬灭,300秒;以及最终(5)在Octet操作缓冲液(10mM TRIS pH7.5、150mM NaCl、1mM CaCl₂、0.13% (v/v) Triton X-100和0.10mg/ml牛血清白蛋白(BSA))中基线培育,60秒。所有实验均用制造商提议的384孔黑色样品盘(每孔100 μ L体积)在27 $^{\circ}$ C和1000RPM下进行。

[0628] 对于各Ab::PD-1相互作用,如上所述用相同抗体同等固定一行八个尖端。三个尖端用于结合可溶性人类PD-1(1-170)-FLAG-His的三点稀释系列,又三个尖端用于结合可溶性食蟹猕猴PD-1(1-167)-FLAG-His的三点稀释系列,接着剩余两个尖端(如管柱中的其余尖端,固定Ab)暴露于Octet[®]缓冲液,因此其可为参考尖端。所有光纤尖端一旦使用即处理掉;即不再生。通过在Octet操作缓冲液中产生可溶性PD-1受体的1:3倍连续稀释系列而产生人类和食蟹猕猴PD-1结合曲线;最终PD-1浓度为30nM、10nM和3.3nM(除了IgG4抗PD-1 mAb,其PD-1浓度为33nM、11nM、3.7nM)。将具有固定抗体的光纤生物传感器在含有PD-1连续稀释系列的孔中培育300秒(缔合步骤),接着用刚刚操作缓冲液移至孔中,历时500秒(解离步骤)。

[0629] 原始数据用仪器数据分析软件(v10)进行处理。对于传感器的各行,将两个参考传感器的结合信号求平均值且自剩余六个样品传感器减去。接着用默认软件选择处理减去参考的数据:Y轴对准基线,相对于解离进行中间步骤校正,且最终用萨维茨基-格雷(Savitzky-Golay)过滤器处理。接着将结合三种人类或三种食蟹猕猴PD-1浓度的每种抗体的最终处理的数据整体与1:1结合模型拟合且作图。所有图均显示处理数据以及与1:1结合模型的拟合。1:1结合模型拟合用于确定缔合速率常数(k_a ;单位 $M^{-1}sec^{-1}$)和解离速率常数(k_d ;单位 sec^{-1})。接着平衡解离常数(K_D ;单位纳摩尔(nM) = $1 \times 10^{-9} Mo1/L$)计算为 k_d/k_a 的比率。

[0630] 图26显示抗PD-1抗体22D4.017、20C1.009和20A2.003的结合概况,这些抗体与两种PD-1 mAb(IgG1抗PD-1 mAb和IgG4抗PD-1 mAb)一起测试。使用FortéBio Octet[®]系统确定结合概况。显示针对人类和食蟹猕猴PD-1受体的结合。

[0631] 如图26A-26E所示,当针对人类PD-1蛋白测试时22D4.017、20C1.009和20A2.003 PD-1抗体展现比可商购的抗体大2至14倍的 K_D 值。另外,食蟹猕猴PD-1蛋白与22D4.017、20C1.009和20A2.003抗体的交叉反应性的分析显示总体类似亲和力,而可商购的抗体显示约2倍的亲和力差异(图26F-26J)。

[0632] 实例16

[0633] 以下实例描述多种抗PD-1抗体的稳定性。

[0634] 抗PD-1抗体的热构型稳定性如下表征。通过差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)评估抗体20C1.009和22D4.017的热稳定性。DSC是一种测量随温度而变的热容的技术。将来自样品细胞的信号与缺乏蛋白质的参考细胞相比较。当细胞温度升高时,测量各展开转变的焓和熔融温度、峰宽。此提供有关蛋白质的热稳定性和高阶结构,包括蛋白质结构域的热稳定性的信息。图27表示在A52SuT中1mg/mL的各抗PD-1抗体的DSC温度记录图,且表21提供各测试抗体的 T_m 。

[0635] 表21

[0636]	抗体	20C1.009	22D4.017
	通过DSC获得的T _m	75.1°C	66.1°C

[0637] 黏度另外使用锥板式流变仪(特拉华州纽卡斯尔的热分析仪器公司(TA Instruments, New Castle, DE)),通过测量由分子之间的摩擦力引起的流动阻力来测量。使用20mm 1.988°锥板和Peltier钢板-990918,自100至1000s⁻¹,应用流动扫描程序。黏度以Pa·s测量,其中1m Pa·s=1000s⁻¹下1cP。测量在0.01%表面活性剂添加至配制缓冲液(A52Su)下70mg/mL和150mg/mL的各抗体的黏度。在室温下测量所有样品。黏度数据(1000剪切速率)展示于图28中且提供于表22中。

[0638] 表22

[0639]	抗体	cP70mg/mL	cP150mg/mL
	22D4.017	3.4	44.7
	20C1.009	2.5	7.1

[0640] 抗体的稳定性特性是在研发候选治疗剂期间考虑的重要因素。举例而言,抗体的聚集倾向(在溶液中形成大复合物,可引起沉淀)可影响存放期、施用模式(例如静脉内对比皮下)和分子活性。通常,抗体的热稳定性和黏度特性为抗体在高温和高浓度下维持结构完整性的能力的优良指标。如以上数据所证明,20C1.009展现使其尤其适合作为能够静脉内与皮下(和高浓度)施用的治疗剂的稳定性特性。

[0641] 实例17

[0642] 本实例描述由多种融合蛋白引起的IL-21活性。

[0643] 制造包含IL-21突变蛋白的多种融合蛋白,且使用pSTAT3 AlphaLISA®测定测试IL-21活性。一种包含抗TIGIT单克隆抗体(mAb),而第二种包含抗LAG3 mAb。产生四种细胞系用于这些实验中:(A)PD-1阳性的变体Hut78 T细胞系;(B)TIGIT阳性的变体Hut78 T细胞系;(C)LAG3阳性的变体Hut78 T细胞系;和(D)不内源性表达PD-1、TIGIT或LAG3的亲本Hut78 T细胞系。所有四种细胞系暴露于(i)单独rhIL-21;(ii)单独抗PD-1 mAb;(iii)单独抗TIGIT mAb;(iv)单独抗LAG3 mAb;(v)抗PD-1 mAb与IL-21(R5Q:R76E)突变蛋白(单体)的融合物;(vi)抗TIGIT mAb与IL-21(R5Q:R76E)突变蛋白(二聚体)的融合物;和(vii)抗LAG3 mAb与IL-21(R5Q:R76E)突变蛋白(二聚体)的融合物。

[0644] STAT3磷酸化测定的结果和各分子针对STAT信号传导的EC₅₀分别展示于图29A-29D和表23中。

[0645] 表23

分子	Hut78 亲本	Hut78/PD-1	Hut78/TIGIT	Hut78/Lag3
	EC50 (pM)	EC50 (pM)	EC50 (pM)	EC50 (pM)
rhIL-21	65	59	58	68
抗 PD-1 mAb	-	-	-	-
抗 TIGIT mAb	-	-	-	-
抗 LAG3 mAb	-	-	-	-
抗 PD-1 mAb + IL-21 突变蛋白的融合物	-	341	-	-
抗 TIGIT mAb + IL-21 突变蛋白的融合物	-	-	1390	-
抗 LAG3 mAb + IL-21 突变蛋白的融合物	-	-	-	-

[0647] 如图29A-29D和表23所示,抗TIGIT和抗LAG3融合蛋白展现与rhIL-21相比显著降低的效力(抗TIGIT)或效力不可测量(抗LAG3)。

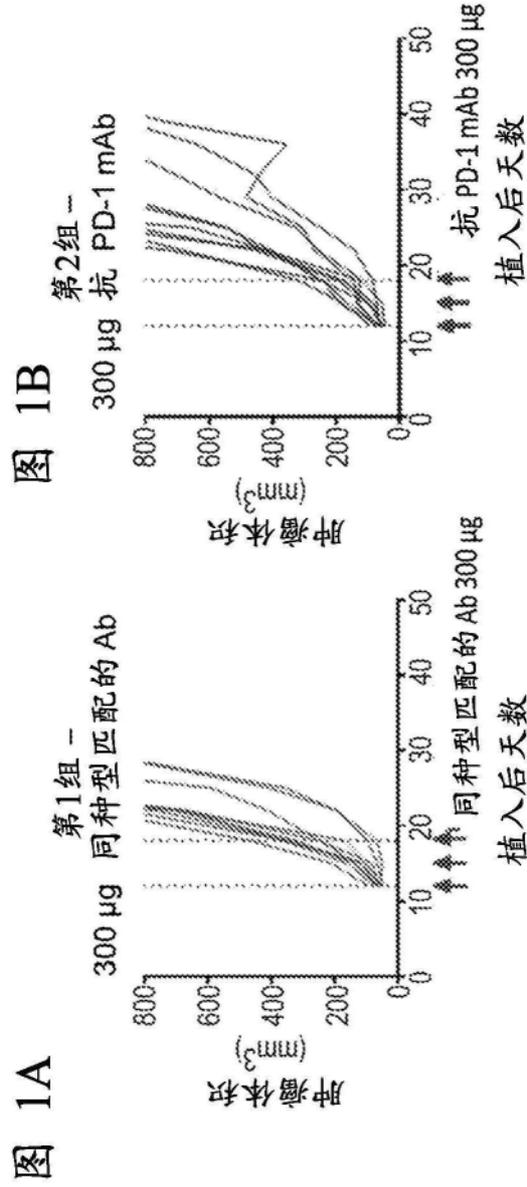
[0648] 本文中引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请案和专利均在此通过引用并入本文中,其并入程度如同个别且特定地指示各参考文献通过引用以其全文并入本文中和阐述一般。

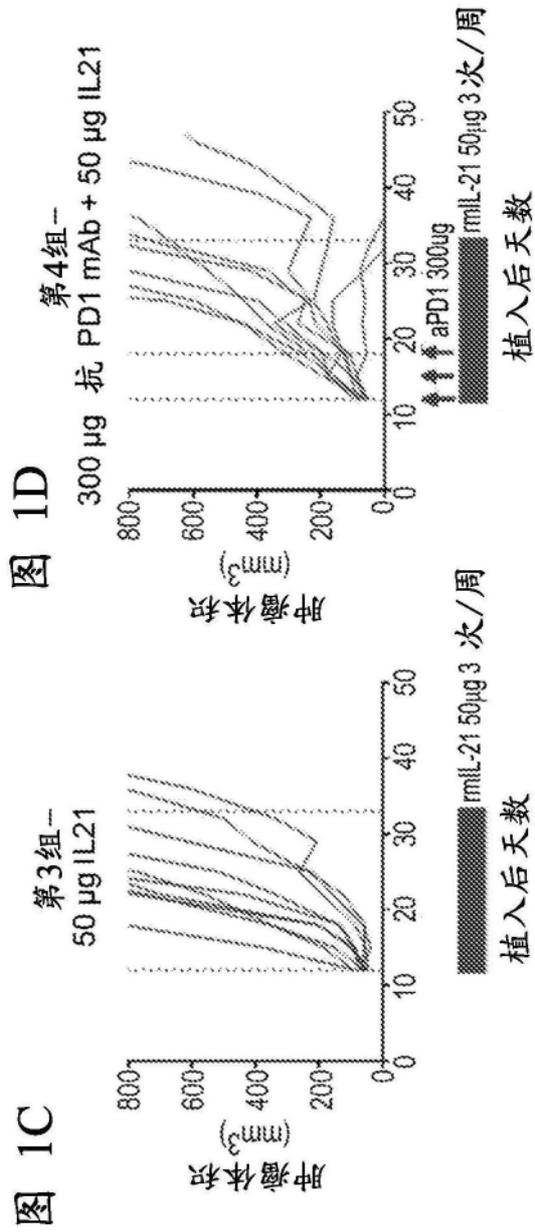
[0649] 除非本文中另外指示或上下文明显相矛盾,否则在描述本披露内容的上下文中(特别是在以下权利要求的上下文中)使用术语“一个/一种(a/an)”和“该”以及类似指示物将视为涵盖单数与复数两者。除非另作描述,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”将视为开放性术语(还即意指“包括(但不限于)”)。

[0650] 除非本文中另外指示,否则本文中数值范围的叙述仅仅旨在用作单独地提及在该范围内的各独立值和各终点的一种速记方法,且各独立值和终点并入说明书中,如同本文中单独地叙述其一样。

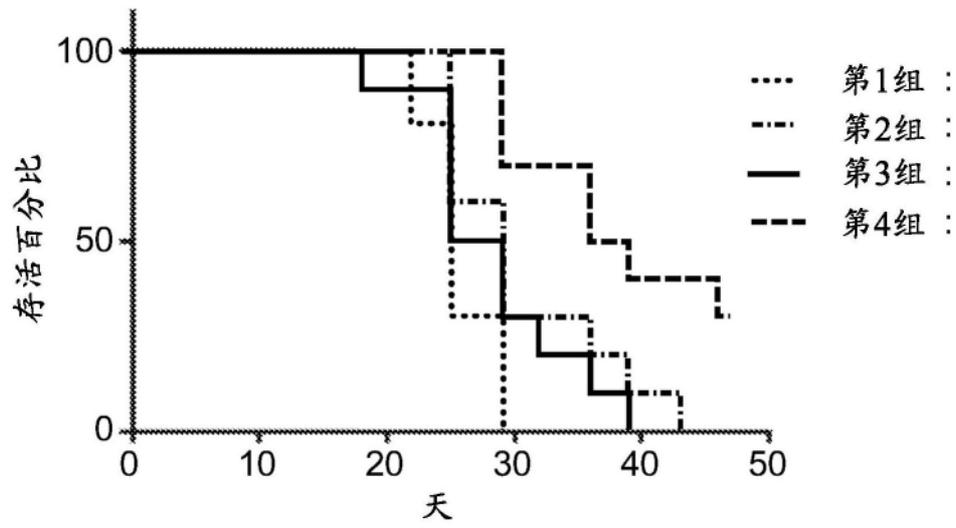
[0651] 除非本文中另外指示或与上下文另外明显相矛盾,否则本文所述的所有方法均可按任何合适的顺序进行。除非另外要求保护,否则关于本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如“诸如”)的使用仅旨在更好地描述本披露内容,而非对本披露内容的范围施加限制。说明书中的语言不应视作指示任何未要求保护的要素为实施本披露内容所必要的。

[0652] 本文描述了本披露内容的优选实施例,包括诸位发明人已知用于实施本披露内容的最优选地方式。在阅读以上描述后,那些优选实施例的变化对于本领域中普通技术人员是显而易见的。诸位发明人预期熟练技术人员视情况采用此类变化,且诸位发明人旨在以除本文特别描述外的方式实施本披露内容。因此,本披露内容包括所附权利要求中叙述的主题的为适用法律所允许的所有修改和等同物。此外,除非本文中另外指示或上下文另外明显相矛盾,否则本披露内容涵盖上述要素呈所有可能变体的任何组合。





存活比例



同种型对比IL-21, p=ns, 0.1269
同种型对比 α PD-1 mAb, p=0.0408
同种型组合, p=0.0002
 α PD-1 mAb 对比组合, p=0.0143
IL-21 对比组合, p=0.0047

图2

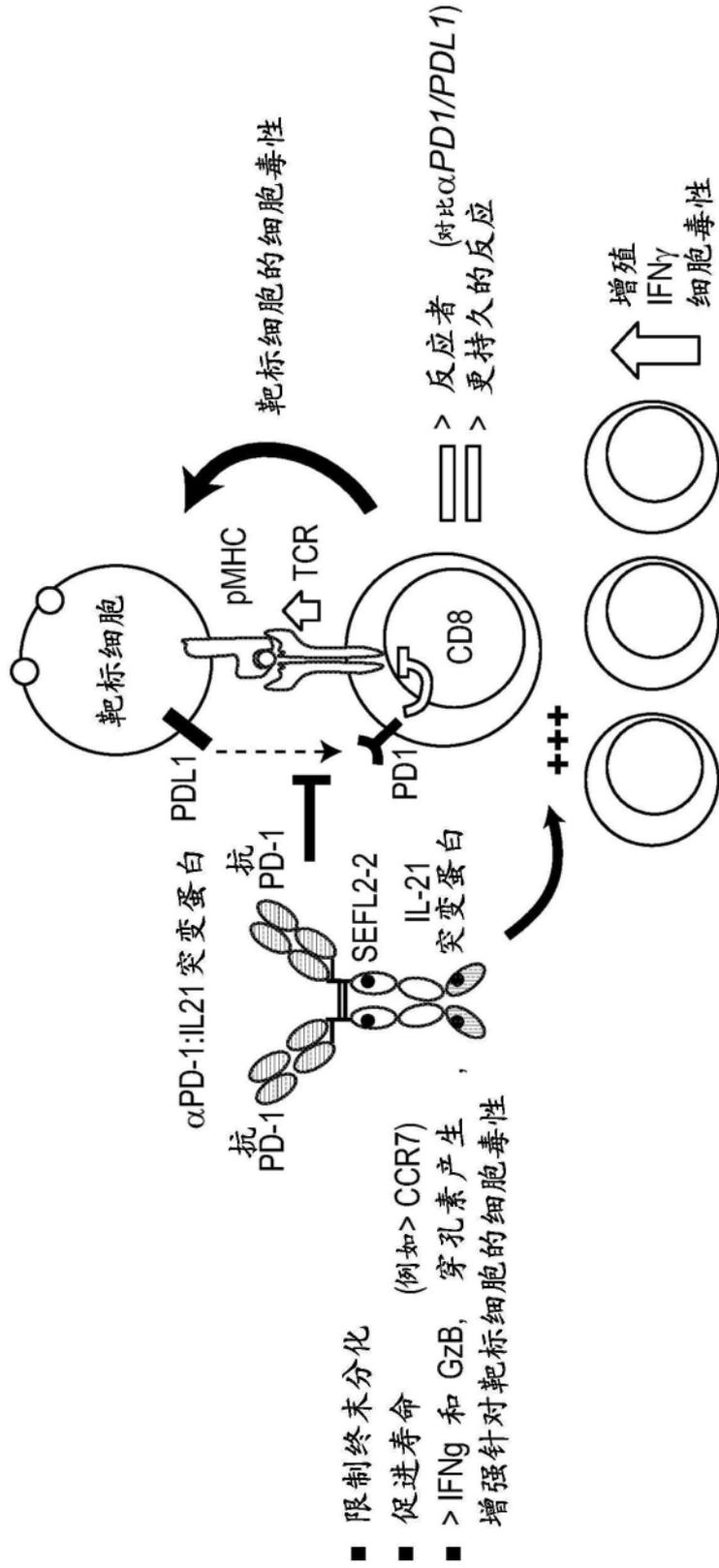


图3

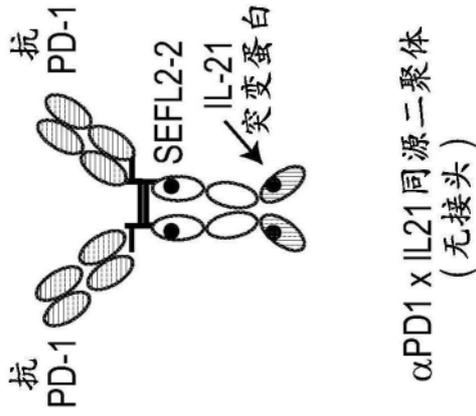


图4A

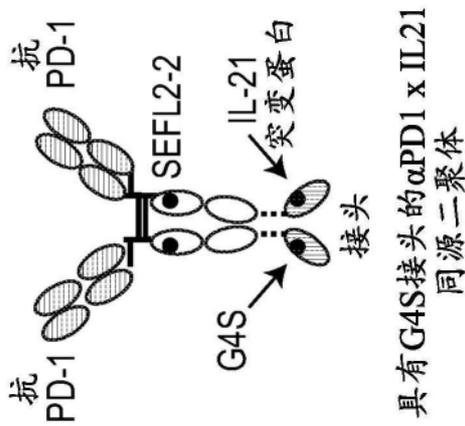


图4B

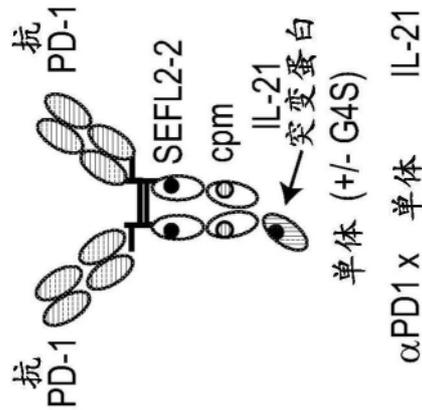


图4C

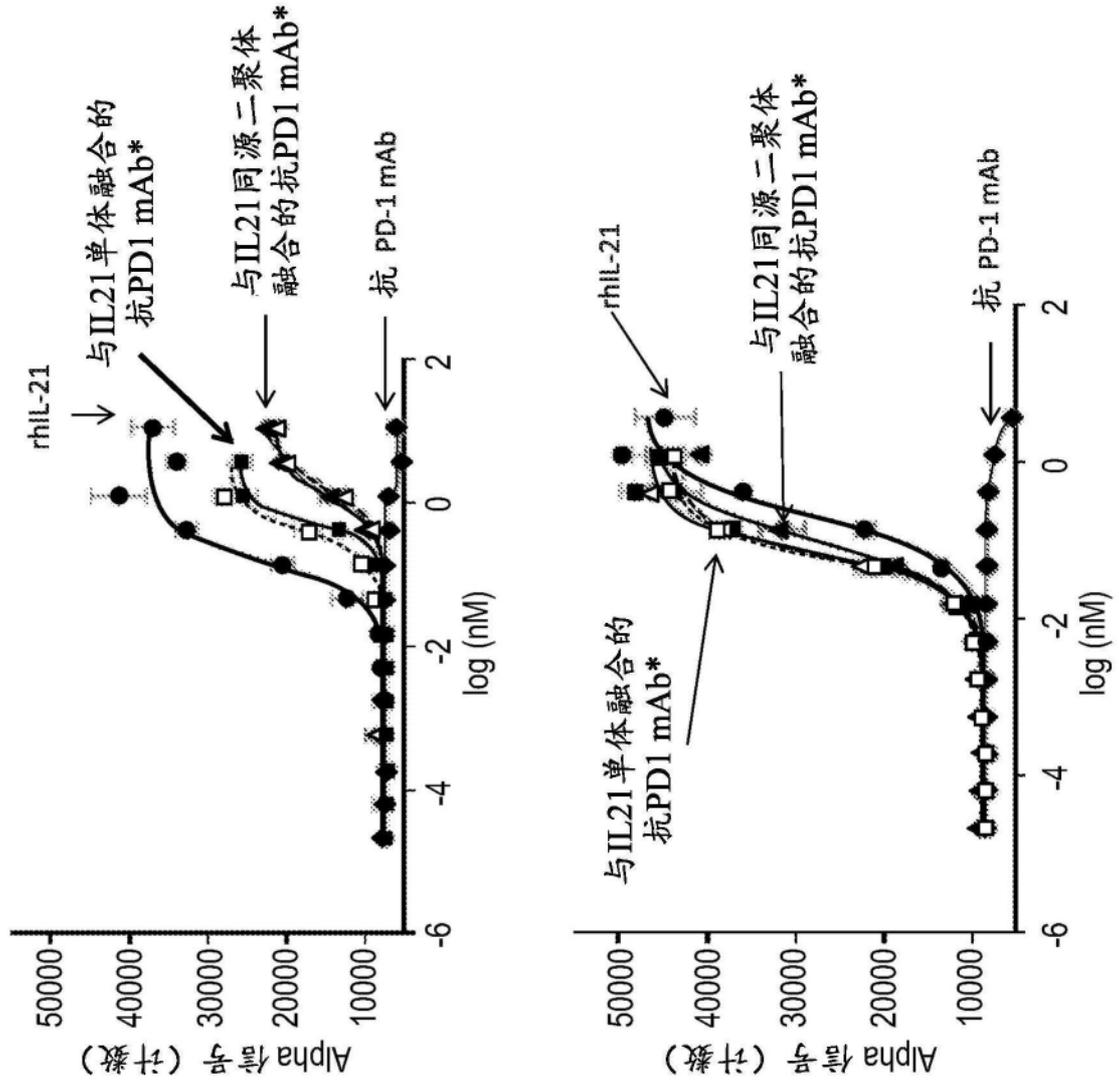


图5A:
pSTAT3 AlphaLISA Hut78 T 细胞:
PD-1^{-ve}

图5B:
pSTAT3 AlphaLISA Hut78 T 细胞:
PD-1^{+ve}

* 实线表示无接头的融合物，且虚线表示有接头的融合物

图5

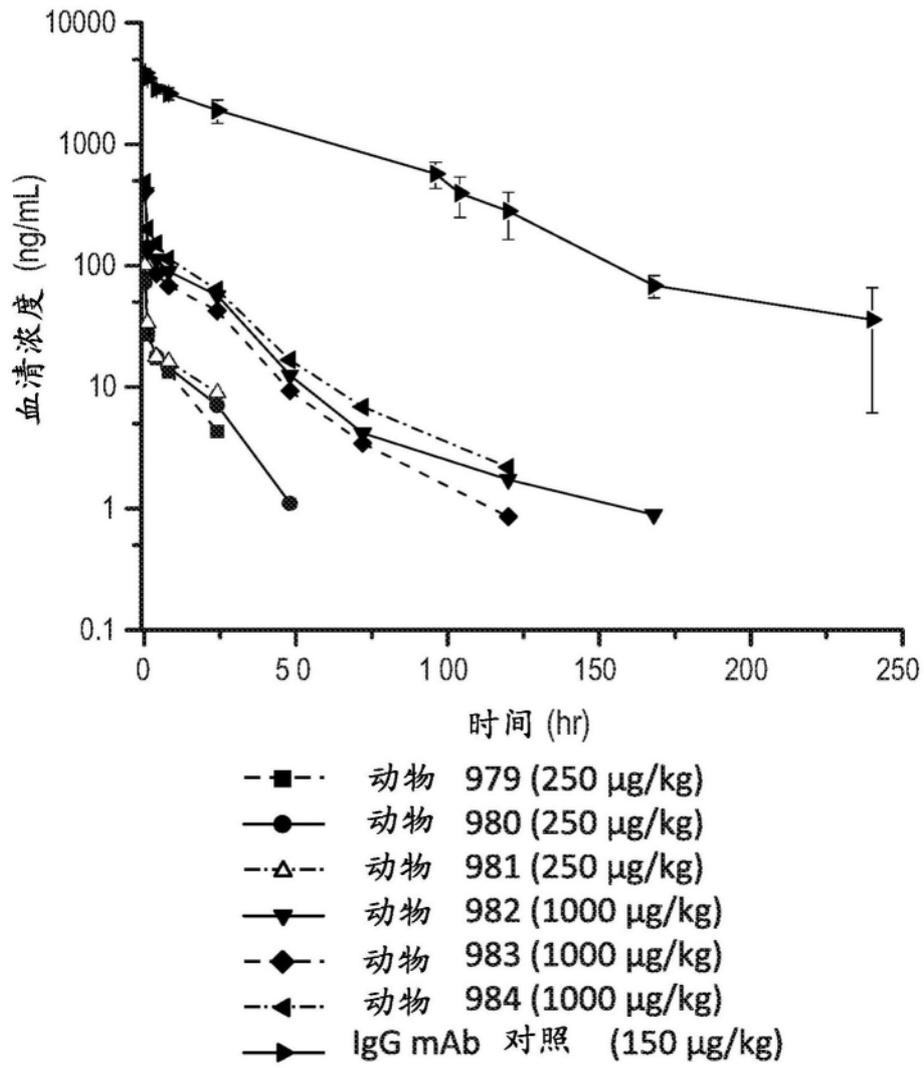
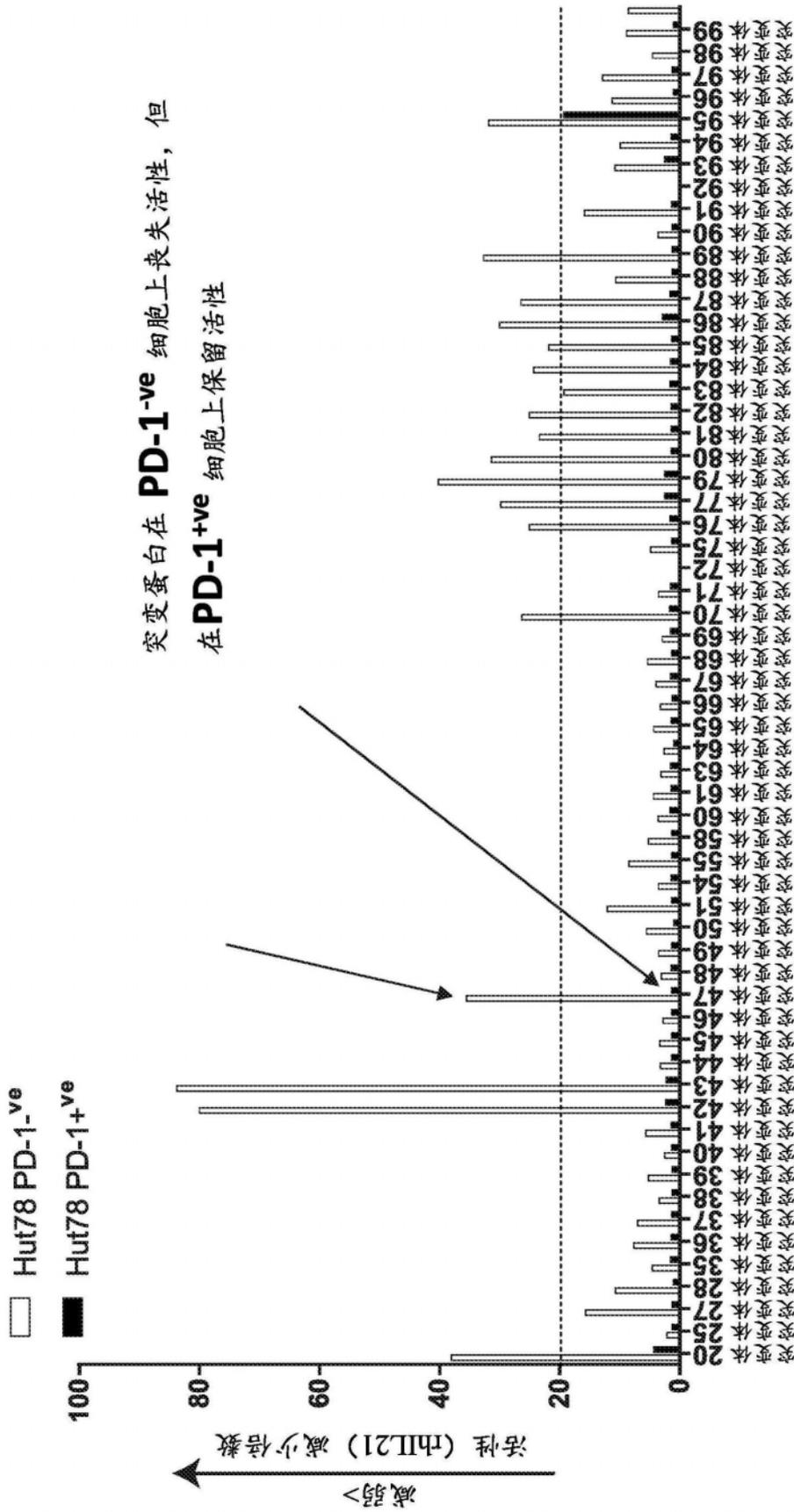


图6



设计成对IL-21Rα的结合减少的突变蛋白
 相对于rhIL21 PD1^{-ve}细胞, 靶标突变蛋白功效减少>20倍

图7

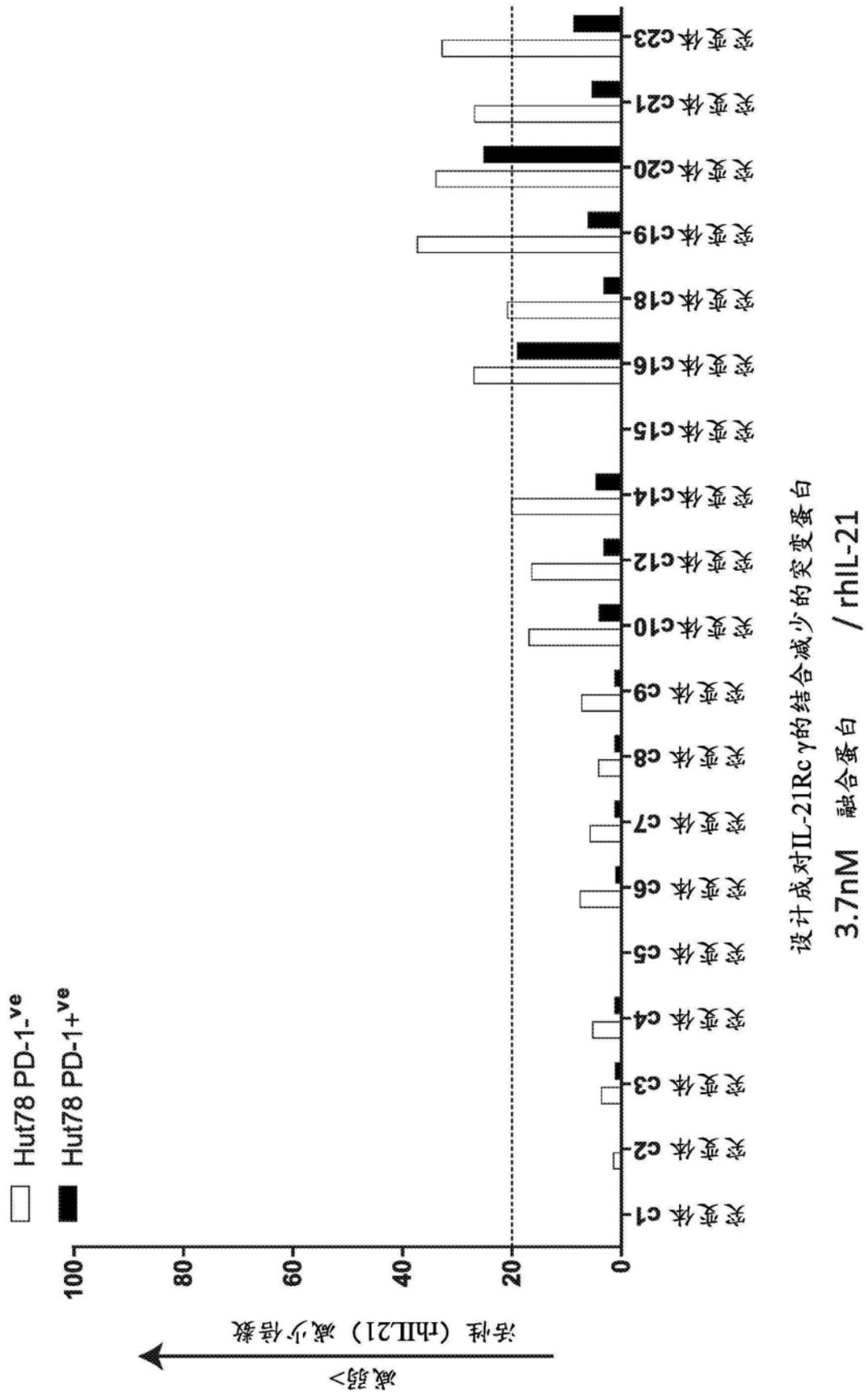
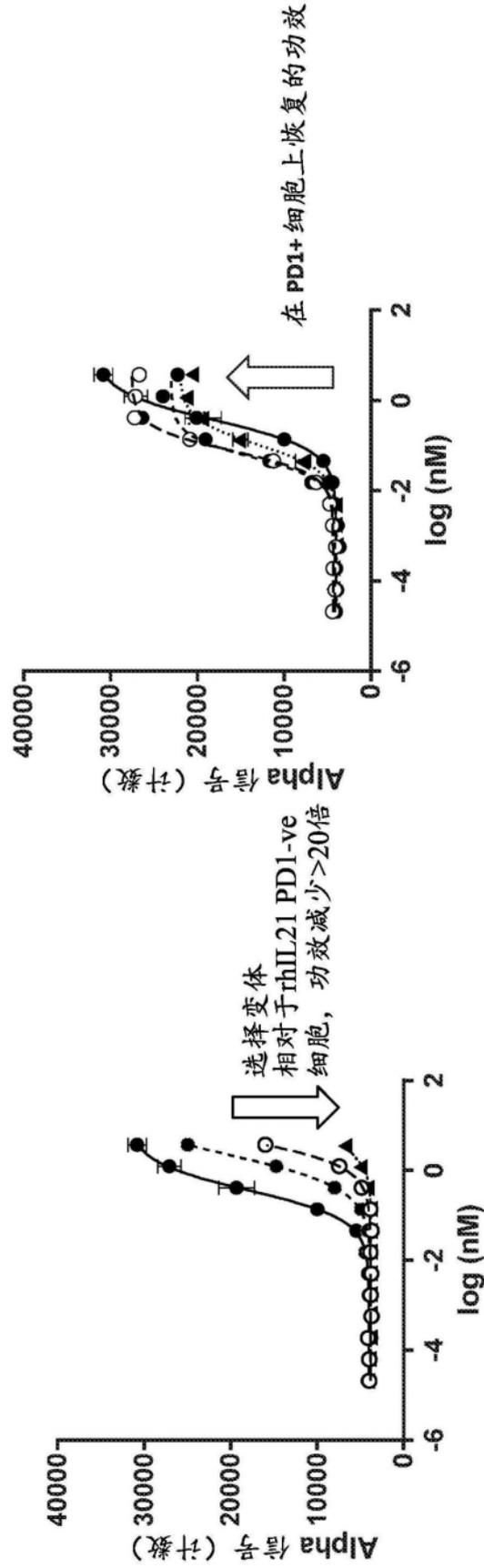


图8

鉴别符合标准（在PD1^{-ve}细胞上减弱>20倍）且视PD-1而定进行靶向的突变蛋白

- 人类 IL-21
- PD1 mAb
- PD1 mAb x WT IL-21 (单体)
-▲..... PD1mAb x IL-21 突变体 51



PD1^{-ve}

图 9A

PD1^{+ve}

图 9B

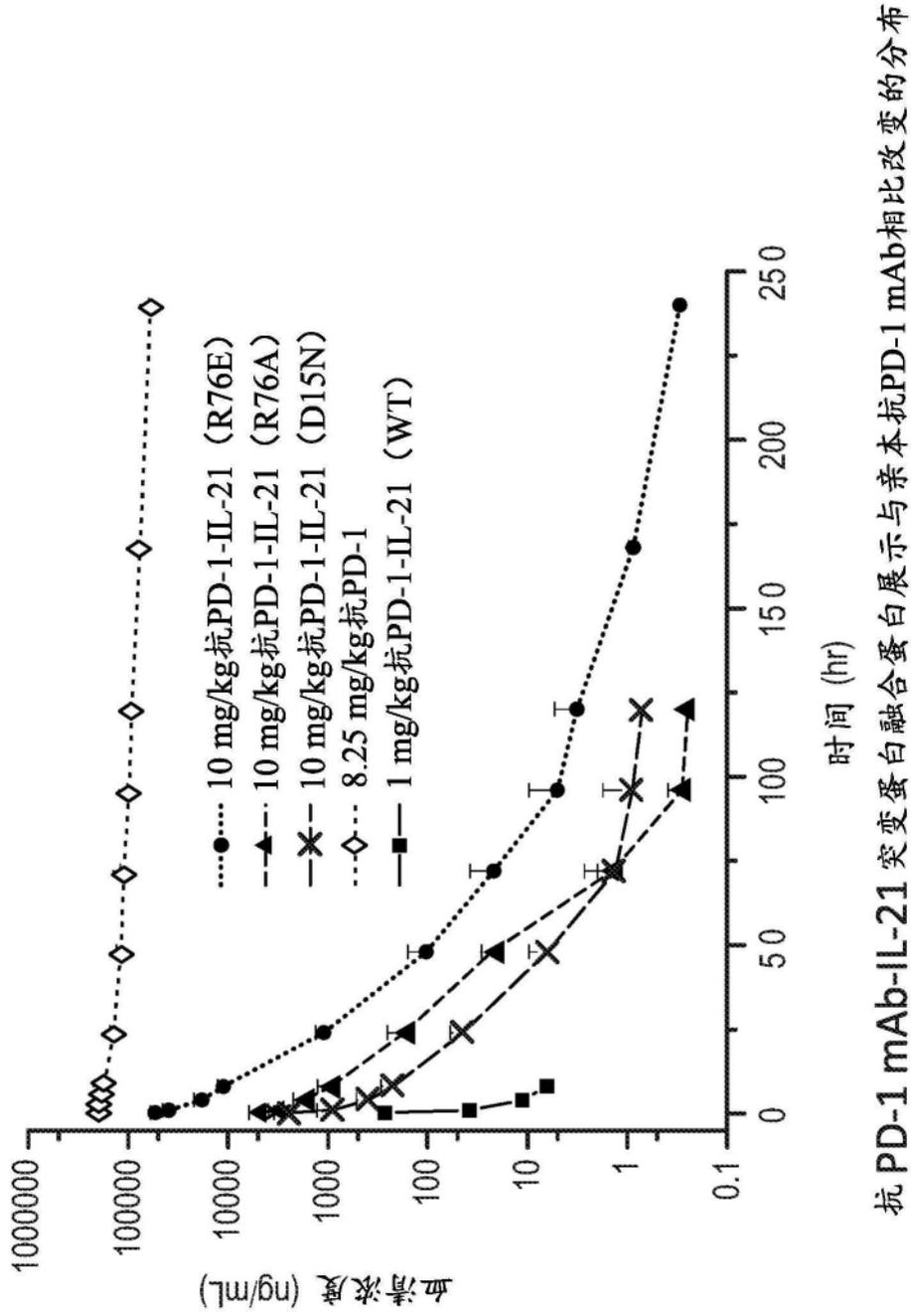


图10

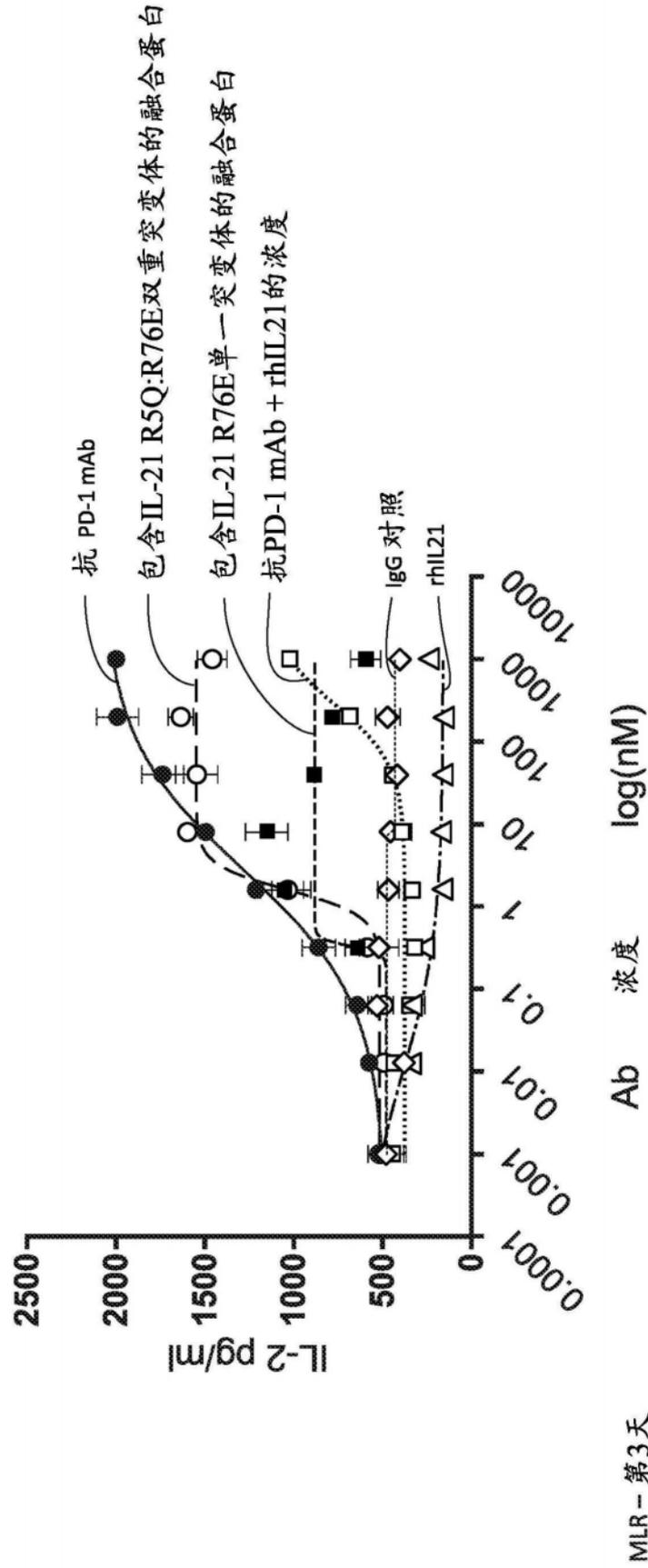


图11

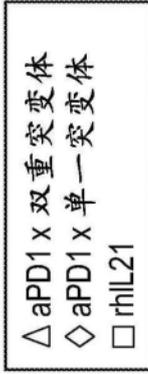


图 12A:

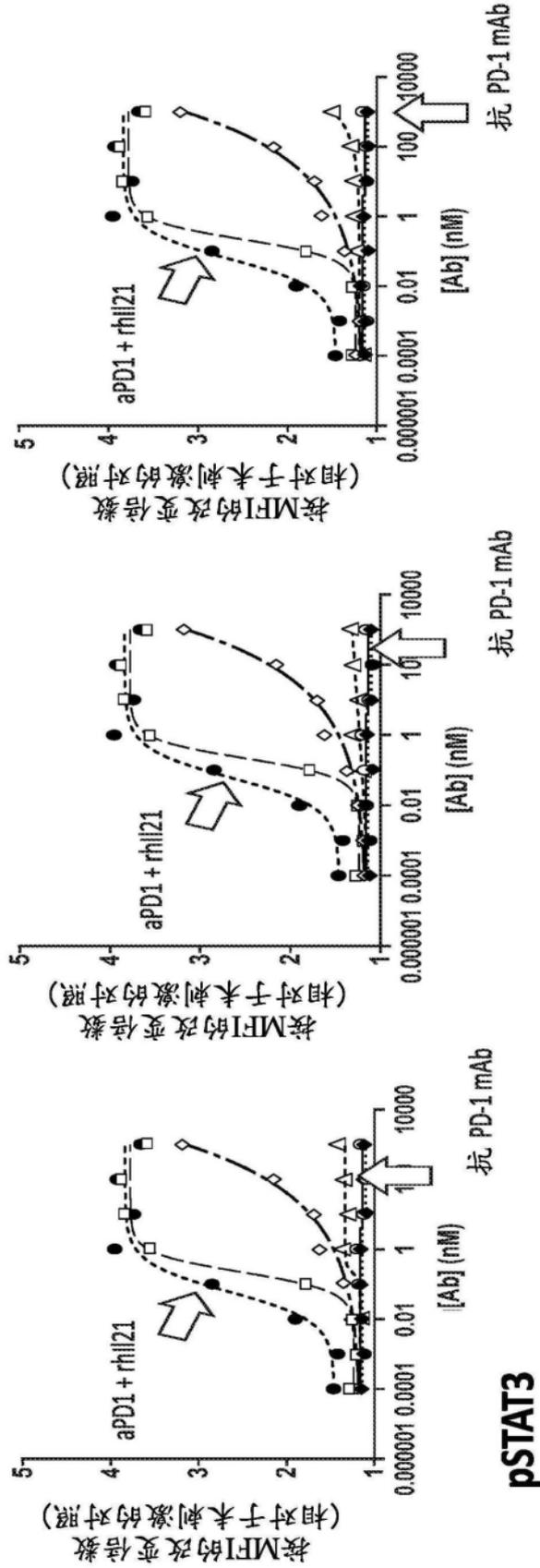
实线=包含与IL-21 R5E:R76A
双重突变蛋白融合的抗PD-1
mAb的融合蛋白

图 12B:

实线=包含与IL-21 R5Q:R76E
双重突变蛋白融合的抗PD-1
mAb的融合蛋白

图 12C:

实线=包含与IL-21 R9E:R76A
双重突变蛋白融合的抗PD-1
mAb的融合蛋白

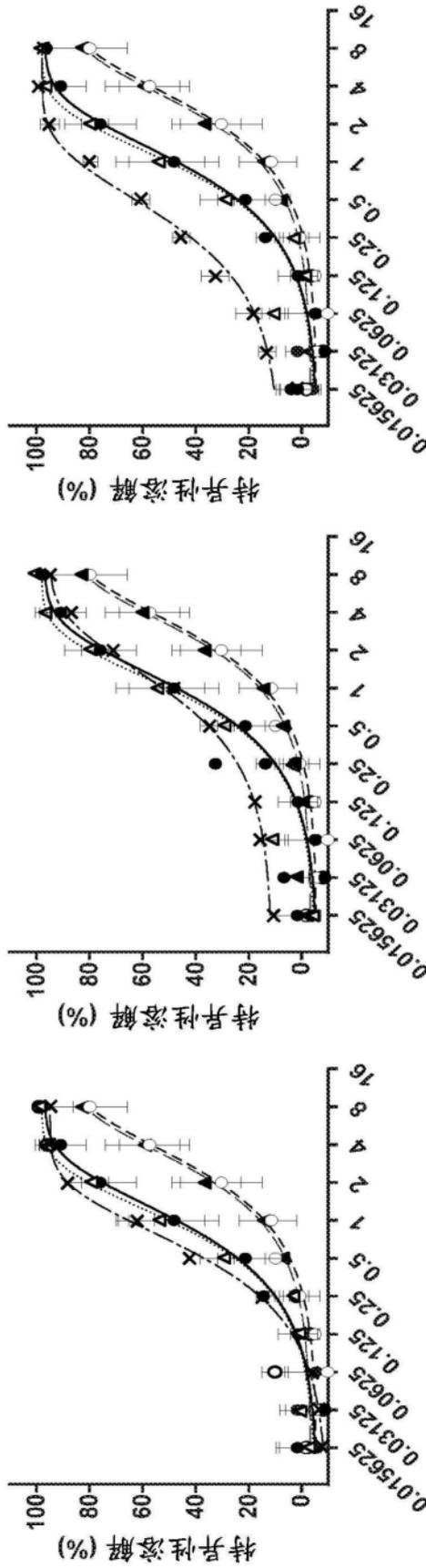


pSTAT3

在刺激10 min前使CTL静息48 h
静息24 h后基础PD1为低的

图12

- rhIL21
- hlgG4
- ▲— 抗 PD-1 mAb
-△..... 组合 PD-1 mAb + rhIL21
- *— 融合蛋白 IL-21 双重突变蛋白
(参见以下各图)



双重突变蛋白 = IL-21
R5E/R76A

图 13A

双重突变蛋白 = IL-21
R5Q/R76E

图 13B

双重突变蛋白 = IL-21
R9E/R76A

图 13C

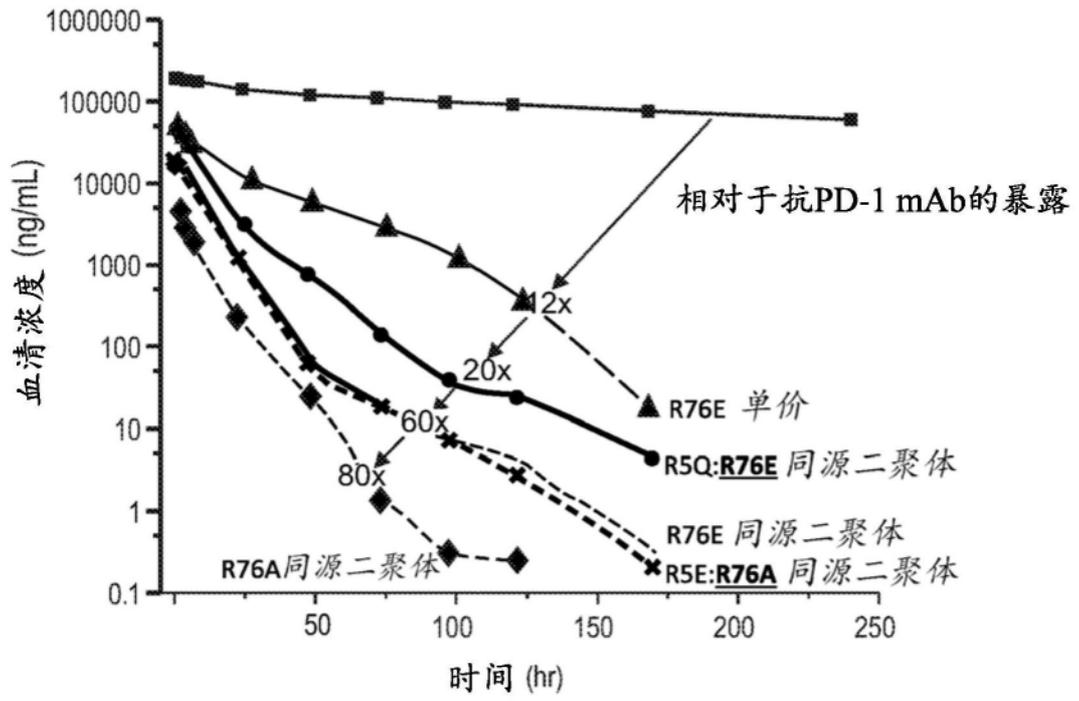
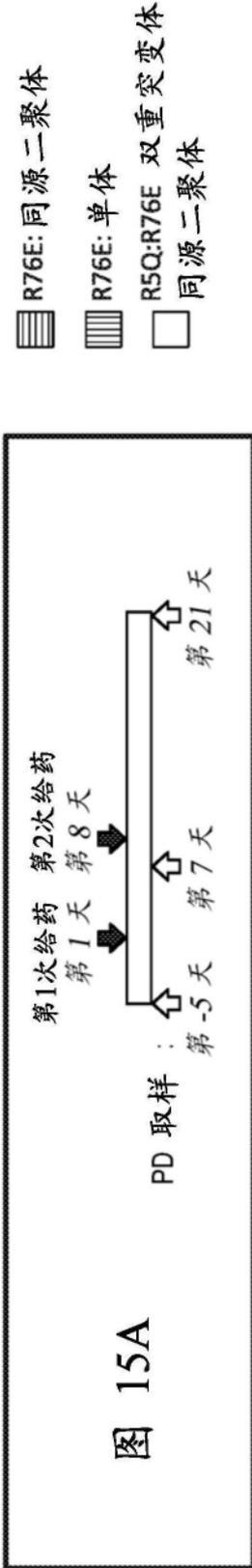


图14



- R76E:同源二聚体
- R76E:单体
- R5Q:R76E 双重突变体
- 同源二聚体

第7天(单次给药后测量) 第21天(重复给药后14天测量)

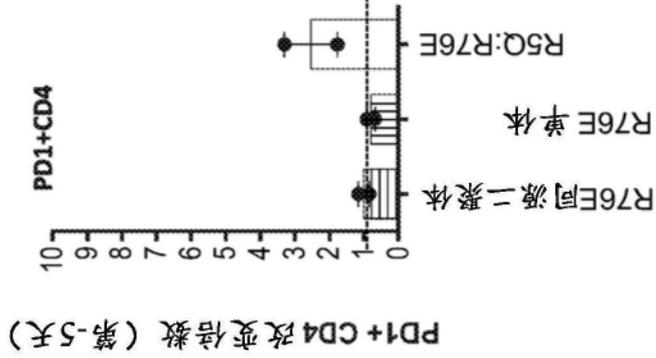


图 15B

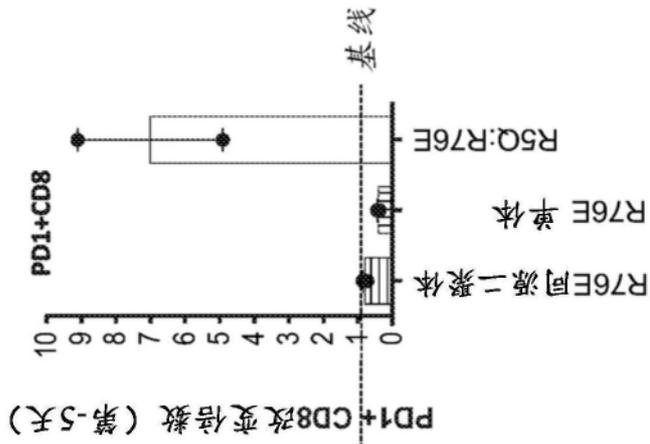


图 15C

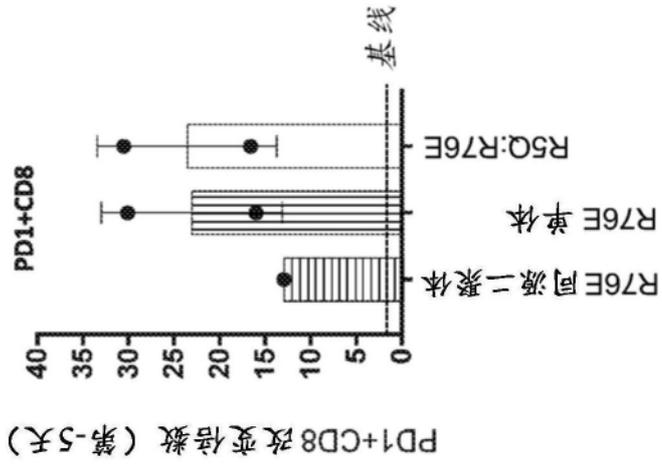


图 15D

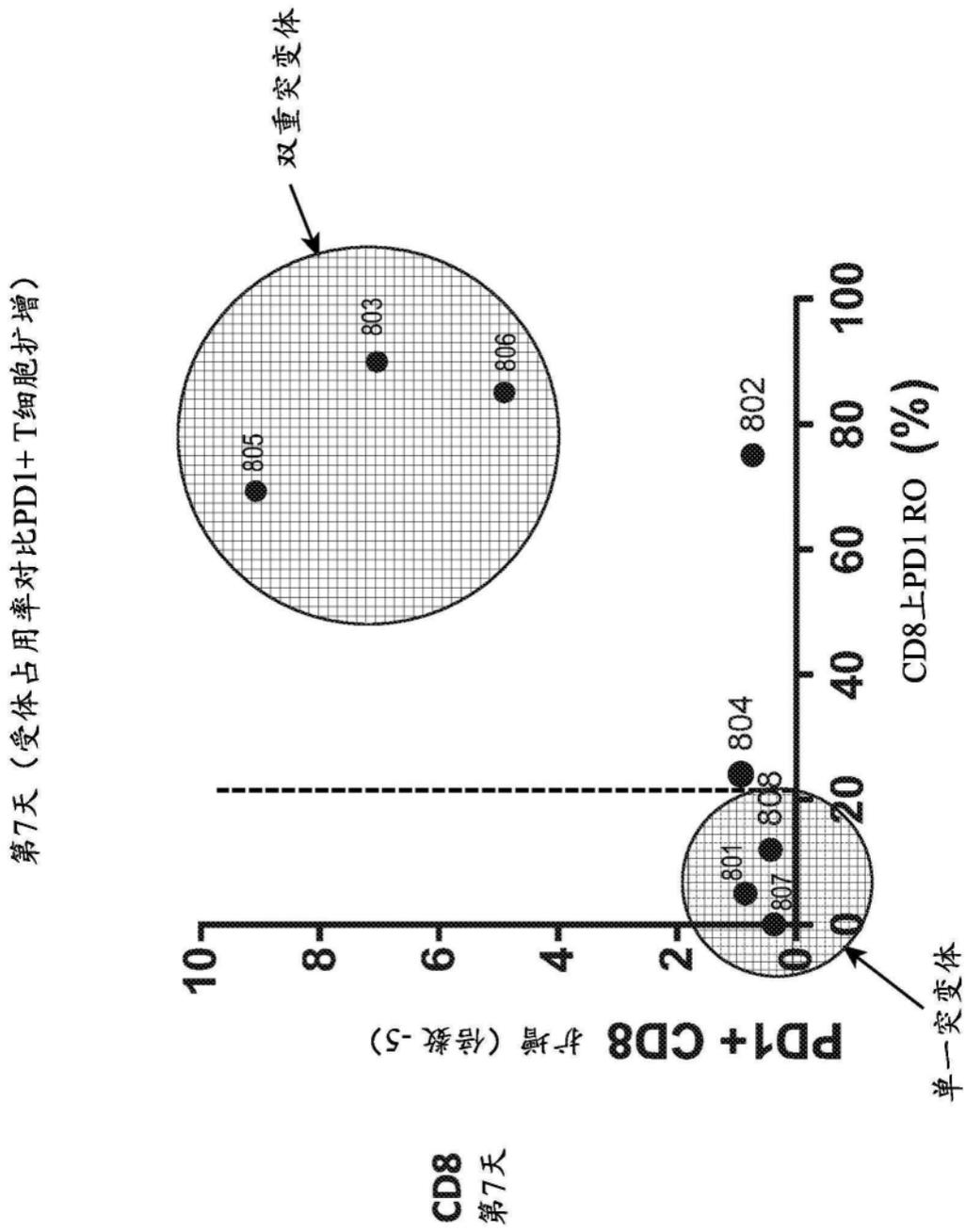


图16

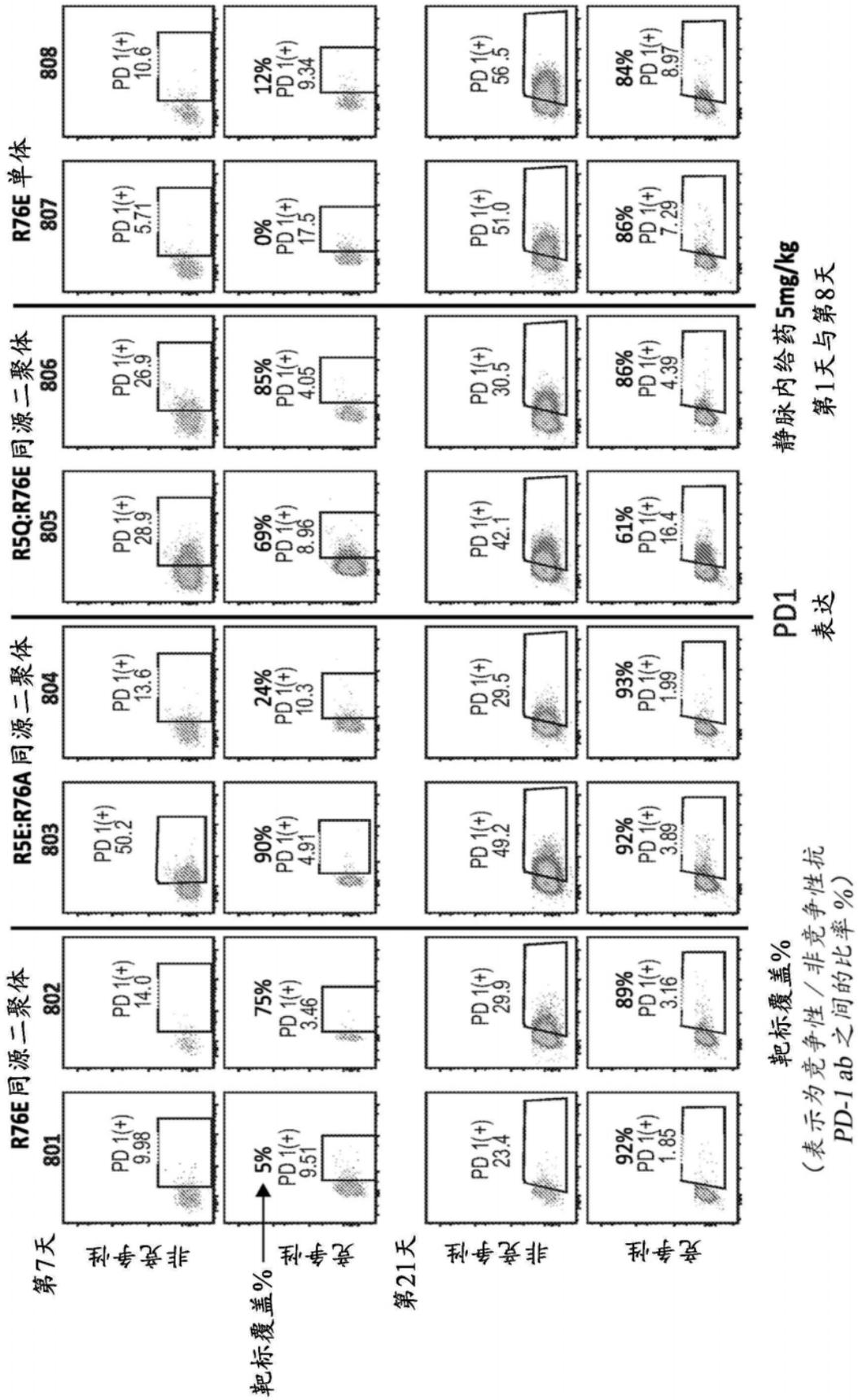


图17

pSTAT3信号传导需要PD-1靶向, 在不同PD-1 mAb变体中突变蛋白的活性相似

R5Q, R76E HUT78

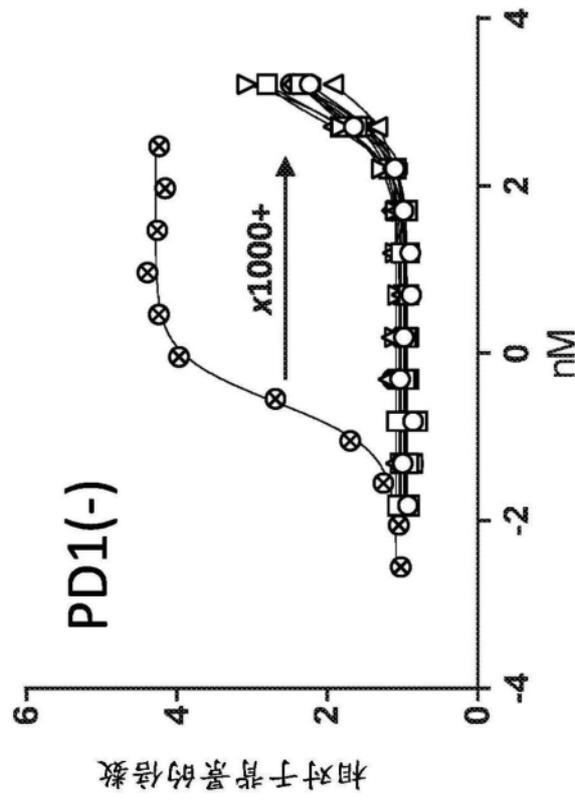


图 18A

R5Q, R76E HUT78-PD1

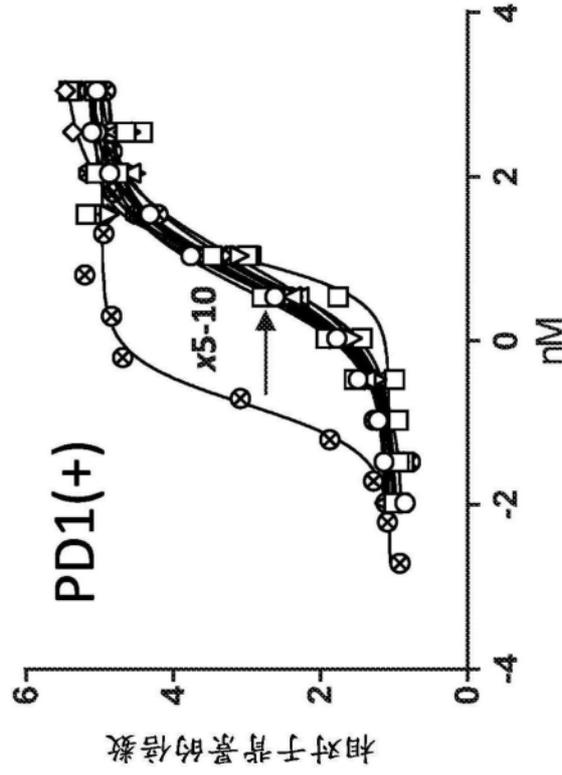


图 18B

pSTAT3信号传导需要PD-1靶向，在不同PD-1 mAb变体中突变蛋白的活性相似

R9E, R76A HUT78

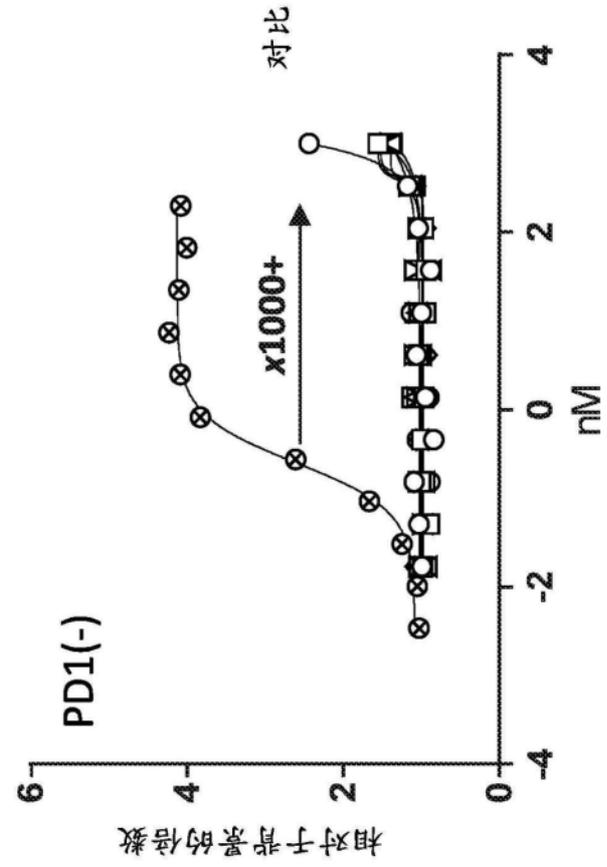


图 19A

R9E, R76A HUT78-PD1

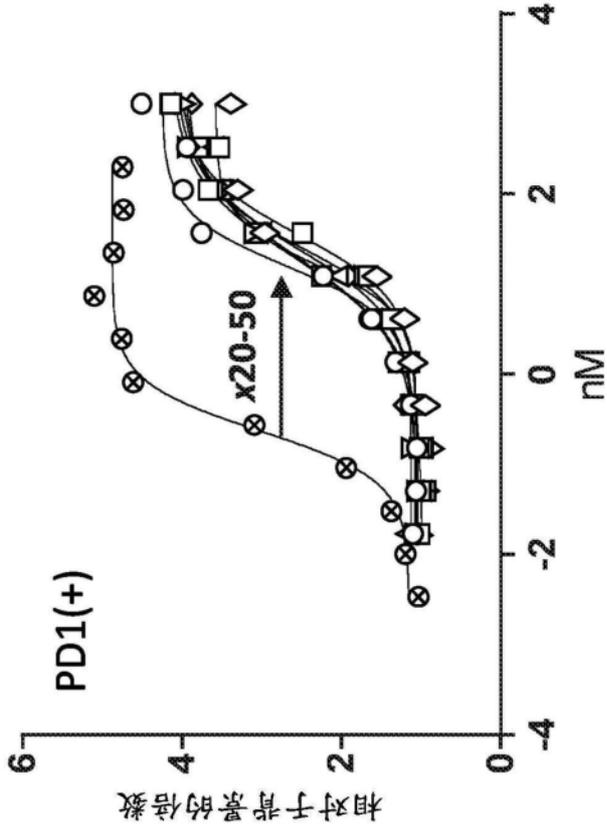


图 19B

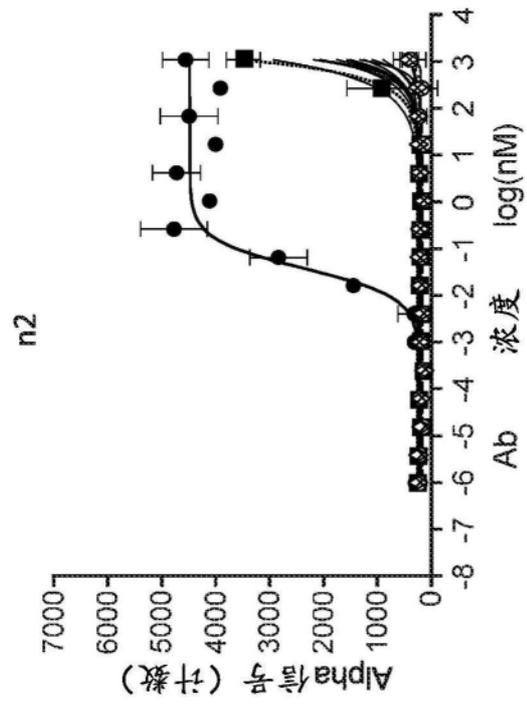


图 20A

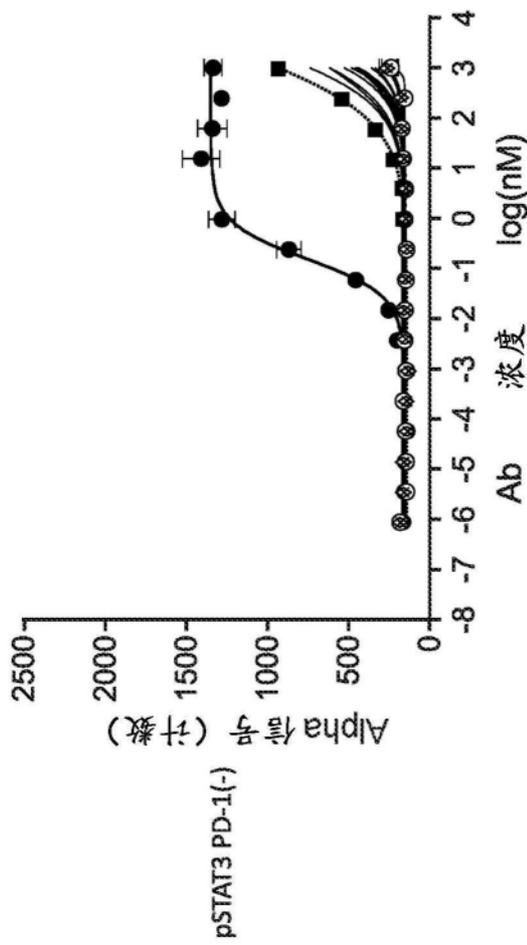


图 20B

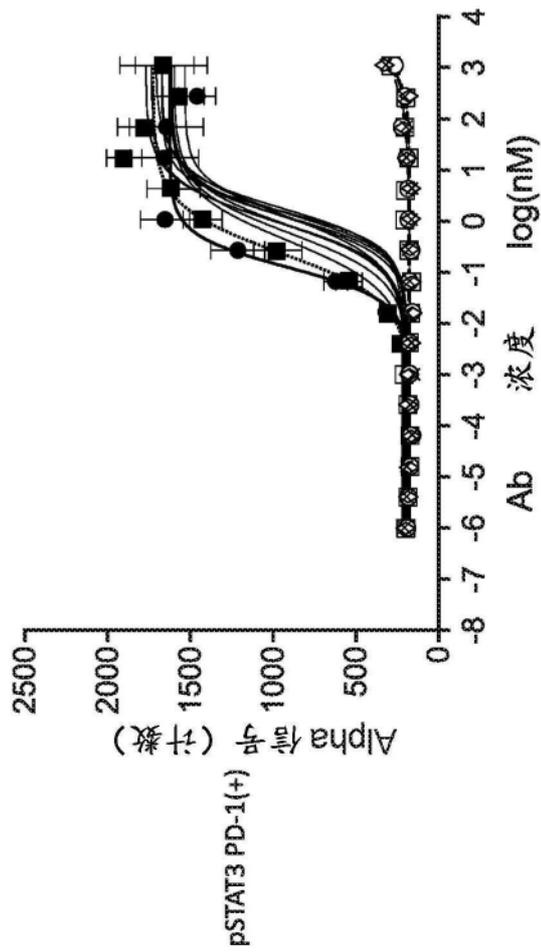


图 20C

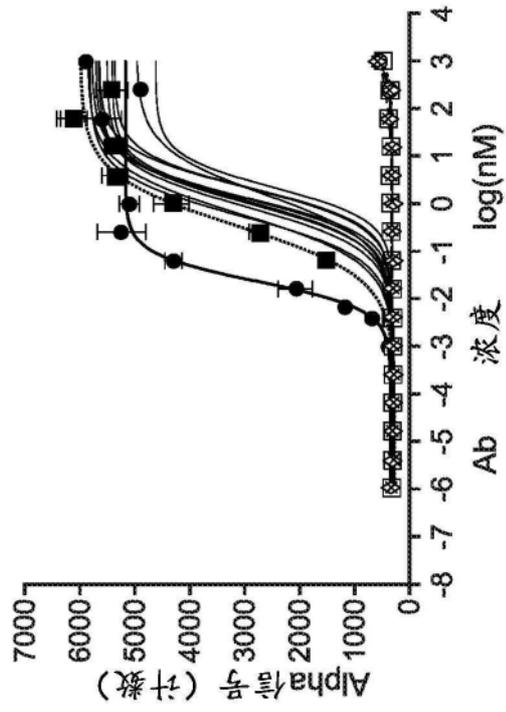


图 20D

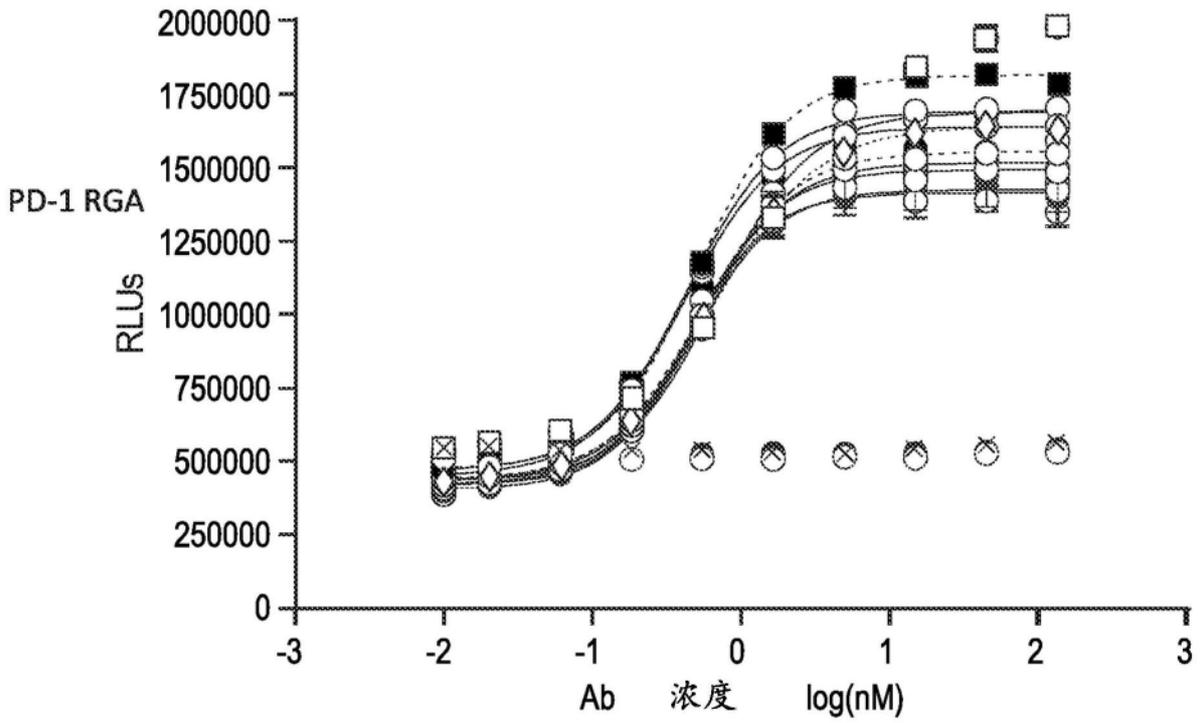


图21A

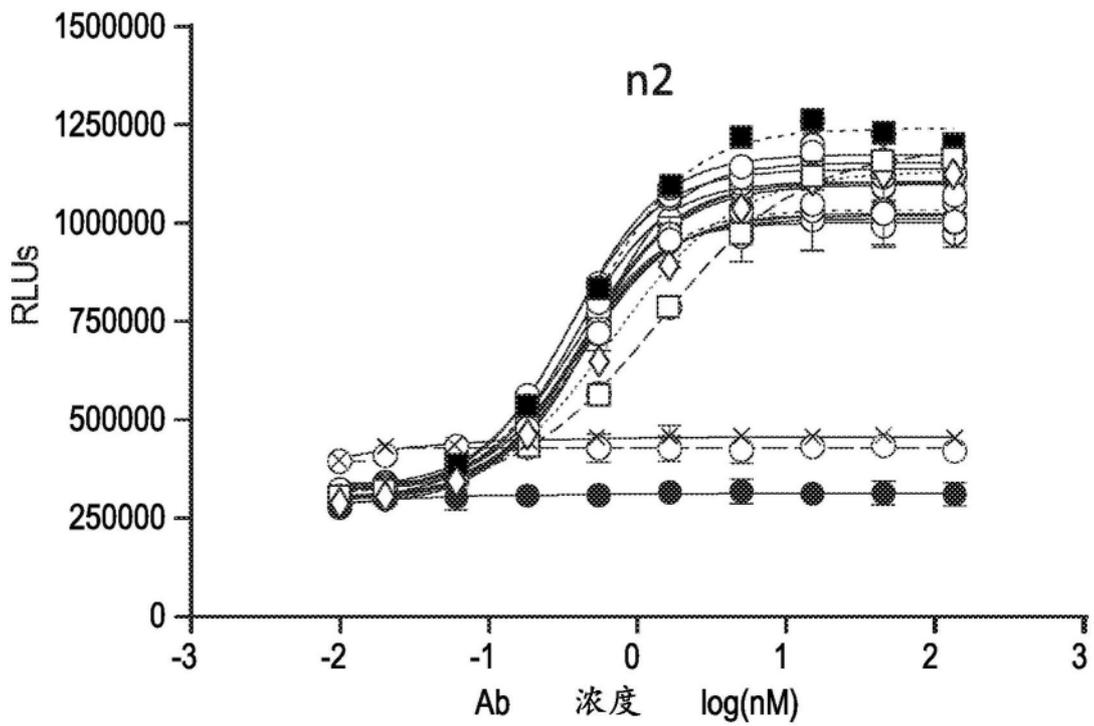


图21B

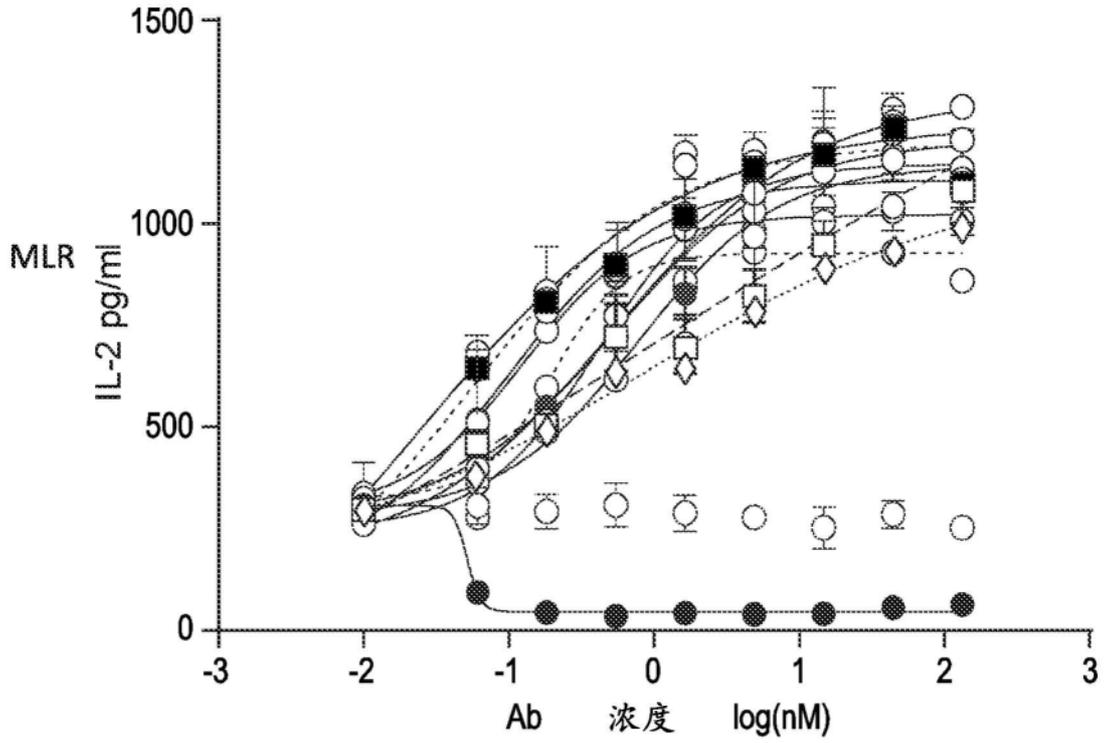


图21C

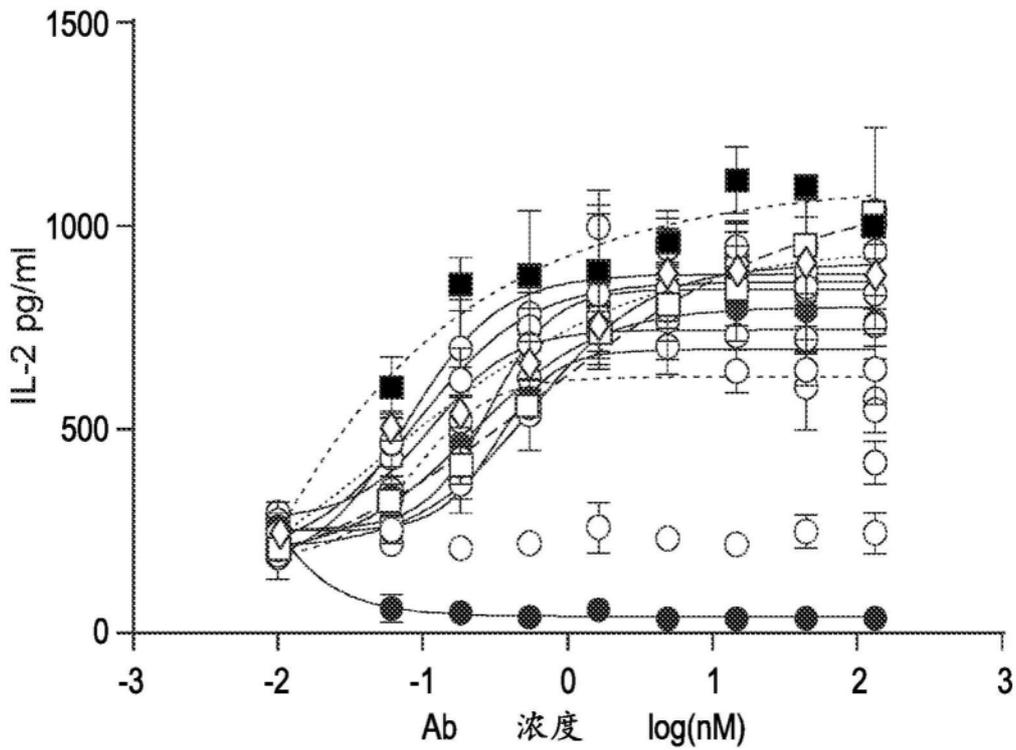


图21D

图 22A

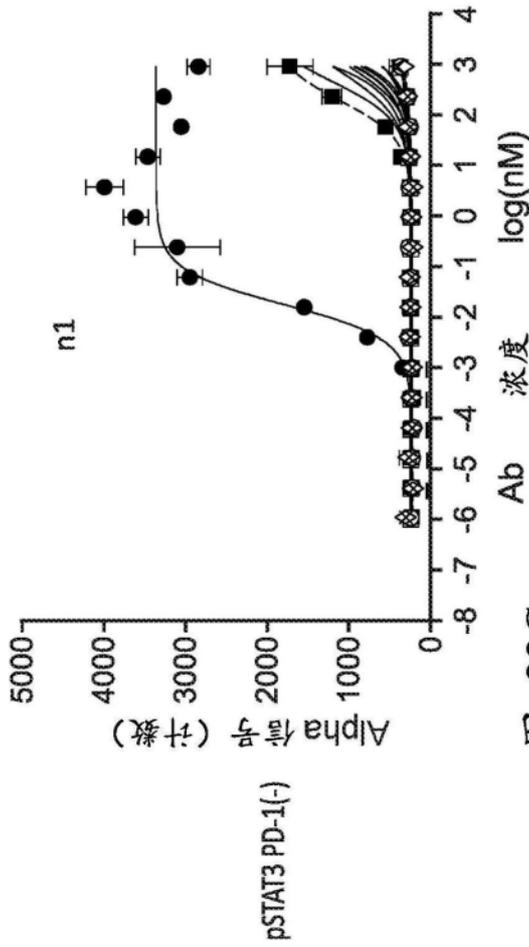


图 22B

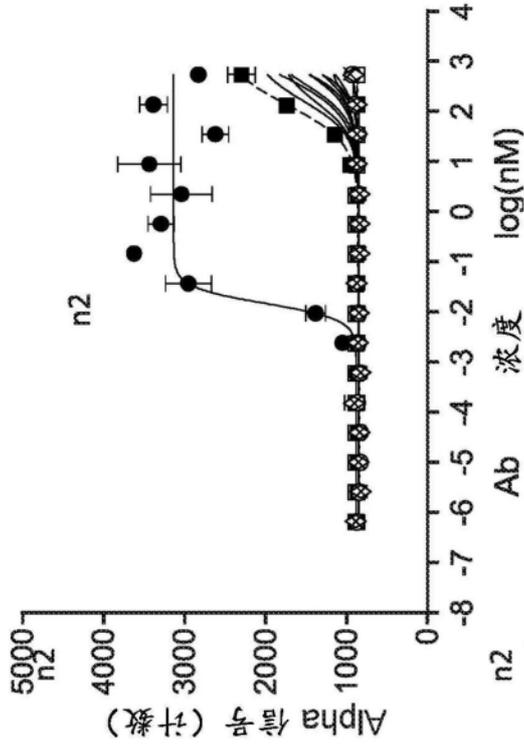


图 22C

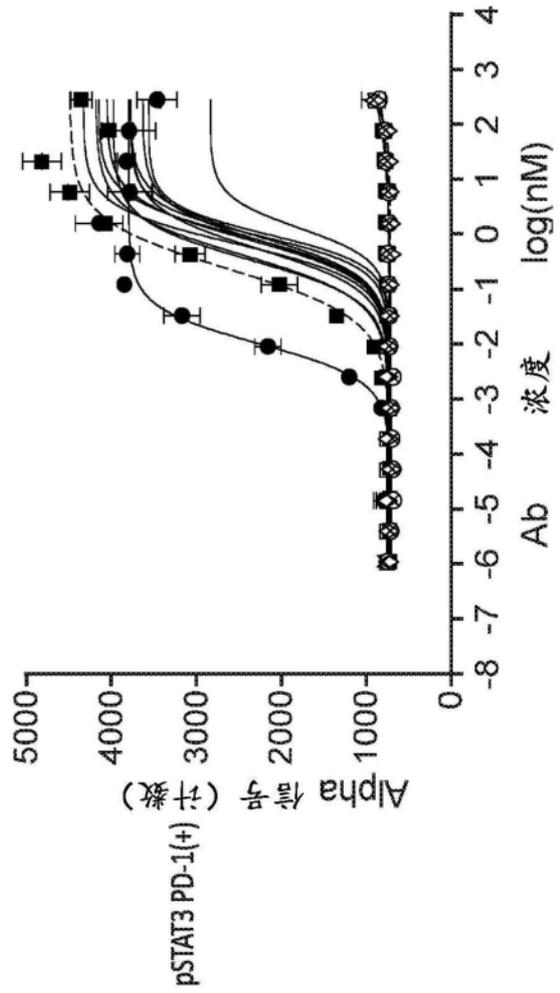
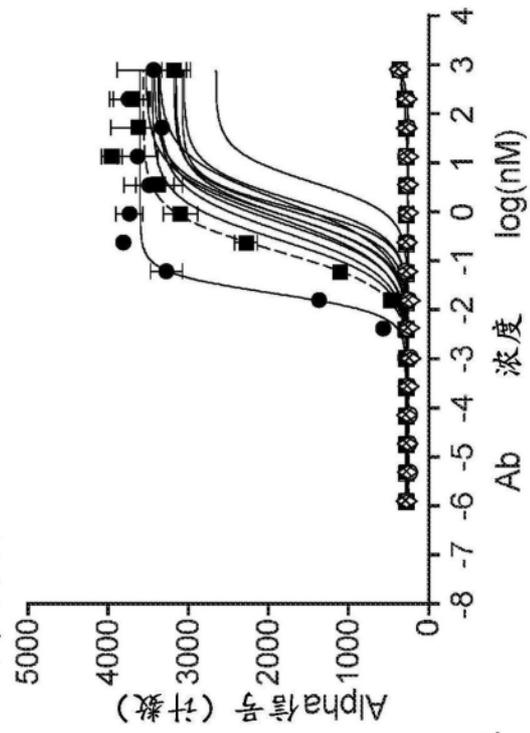


图 22D



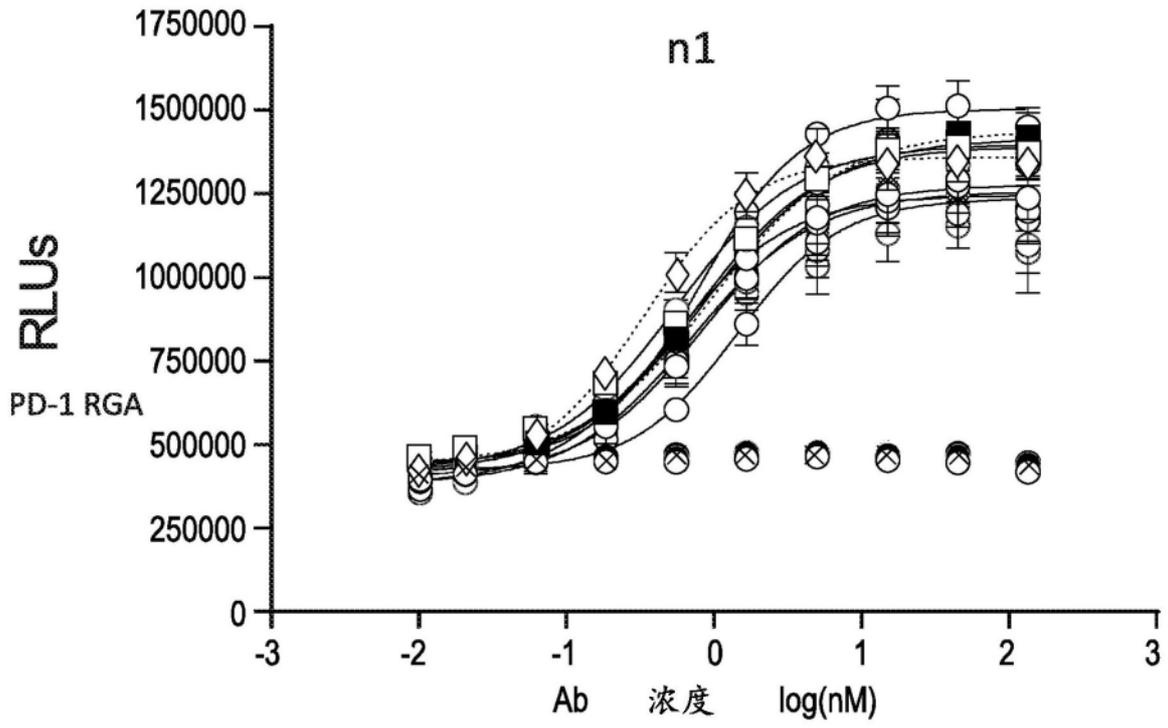


图23A

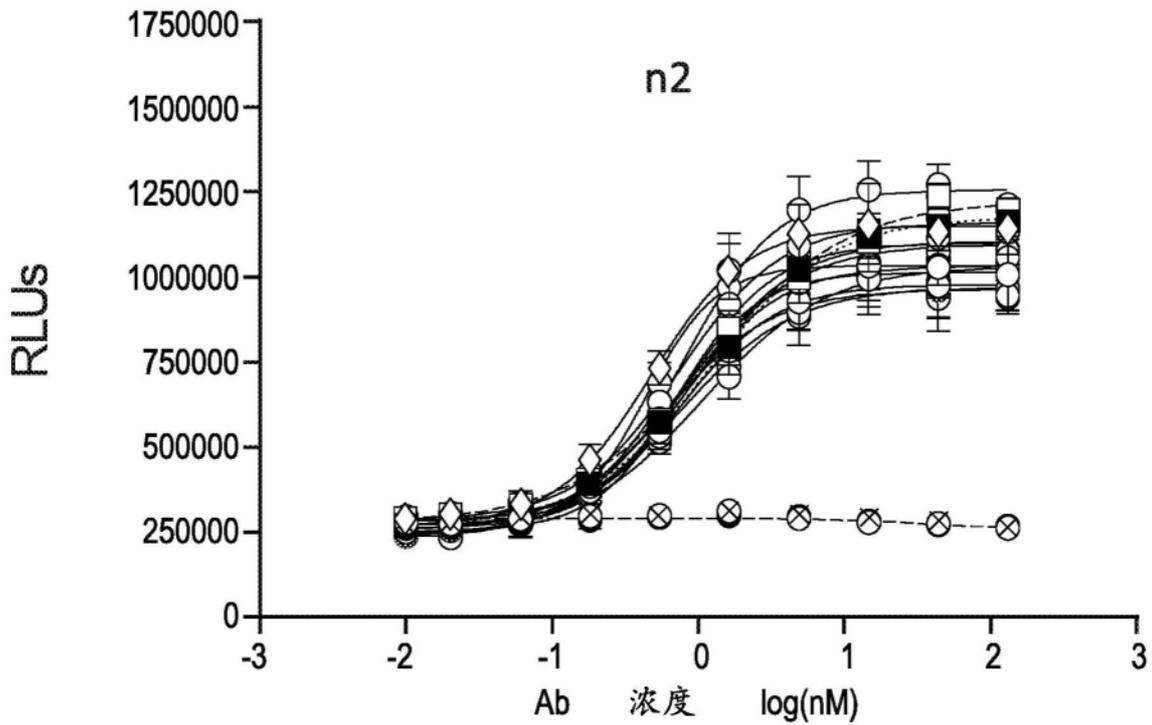


图23B

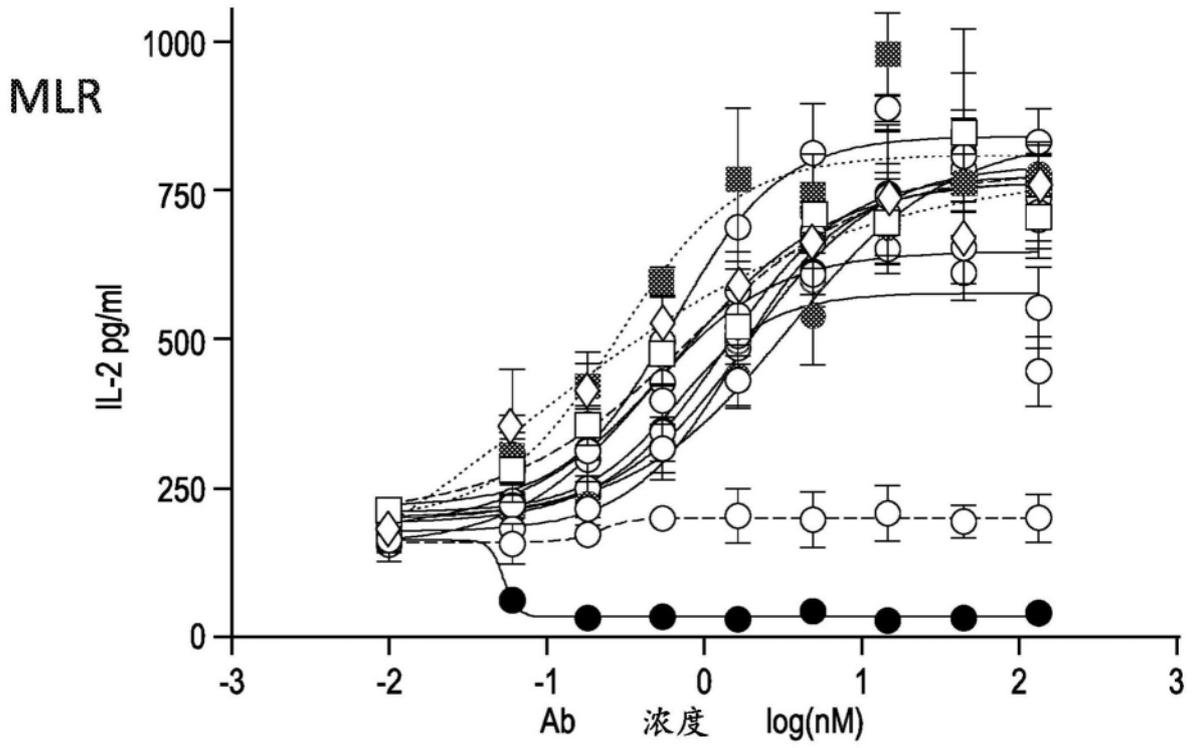


图23C

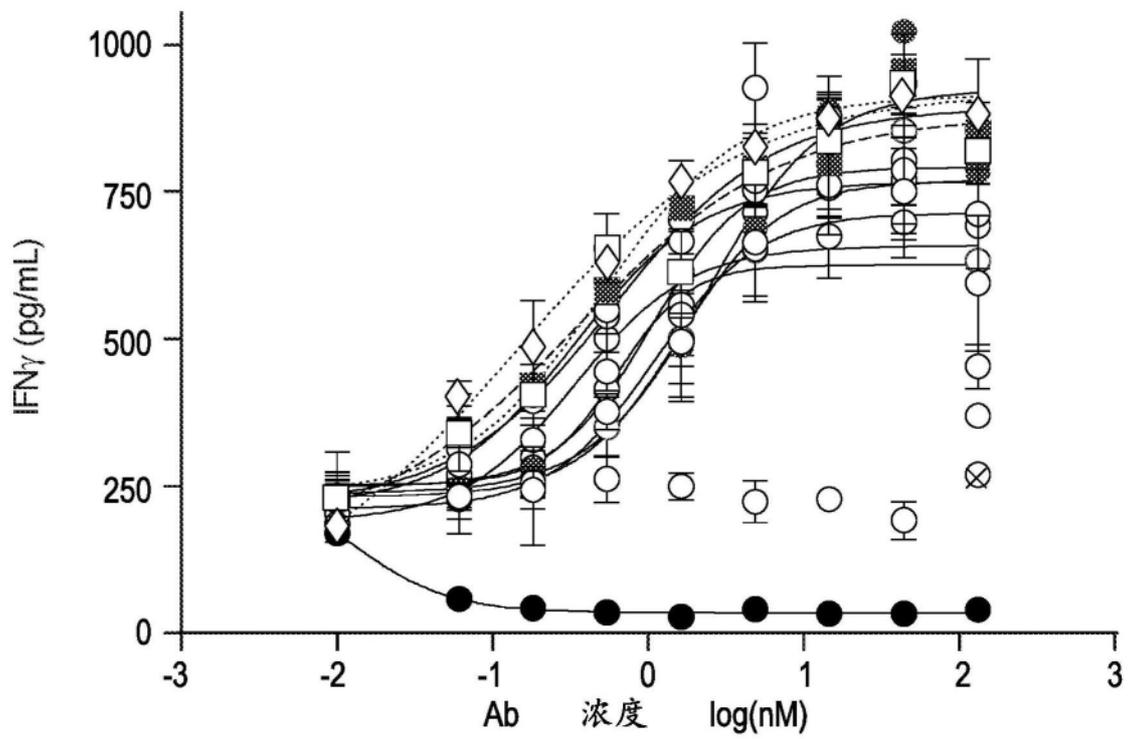


图23D

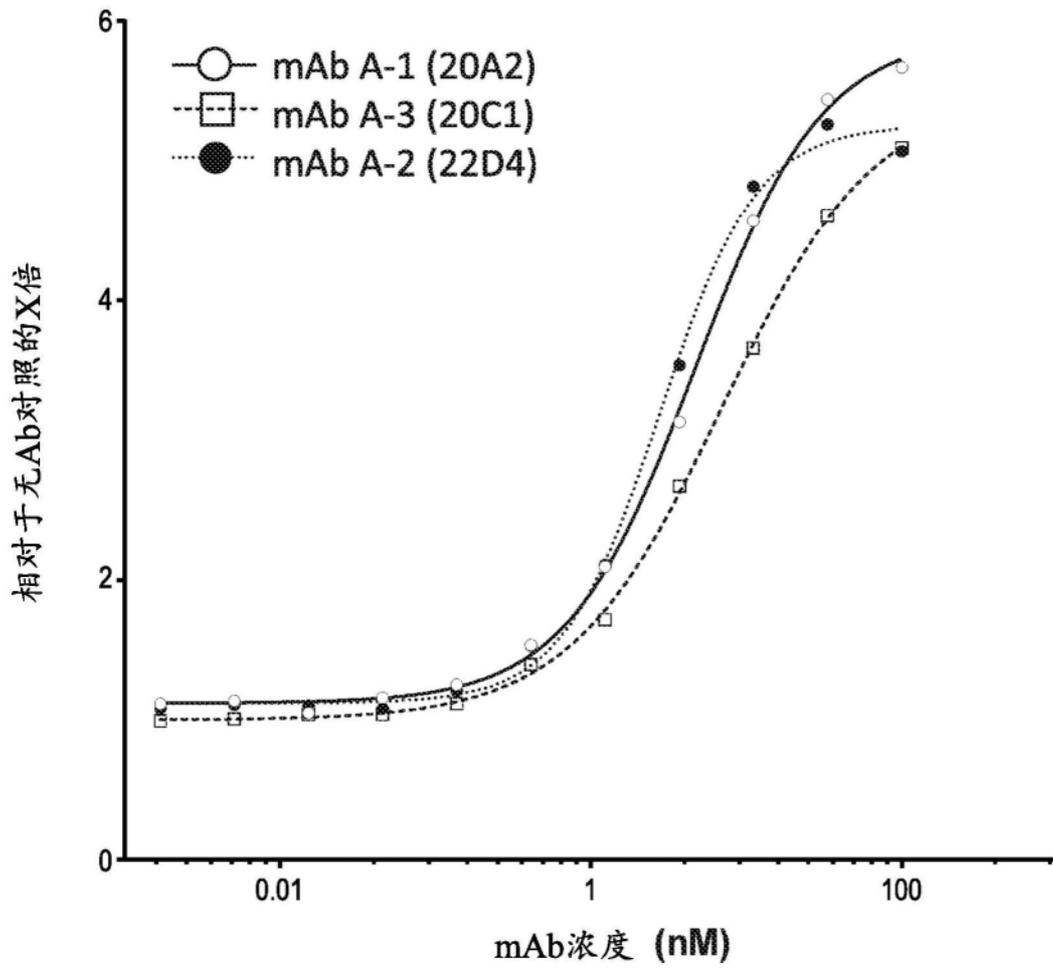


图24

图 25A

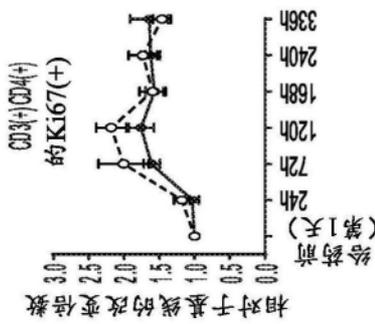


图 25C

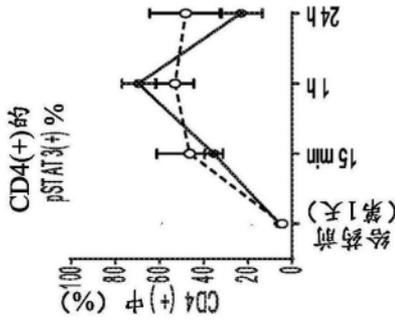


图 25E

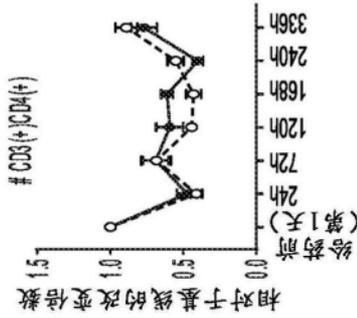


图 25G

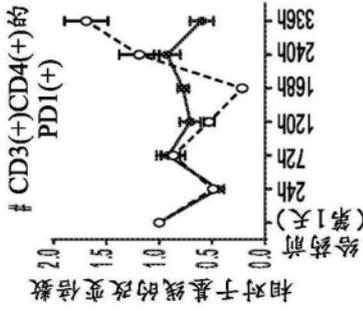


图 25I

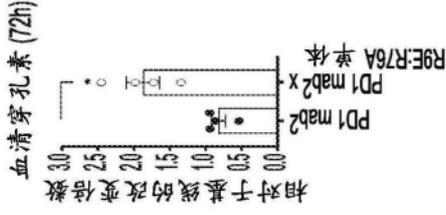


图 25B

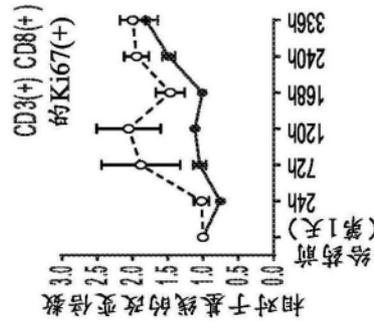


图 25D

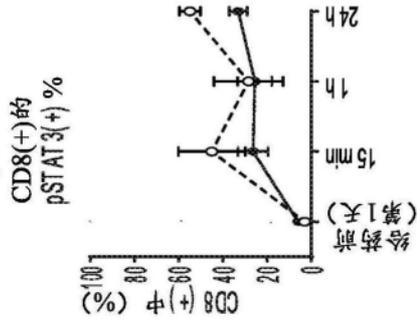


图 25F

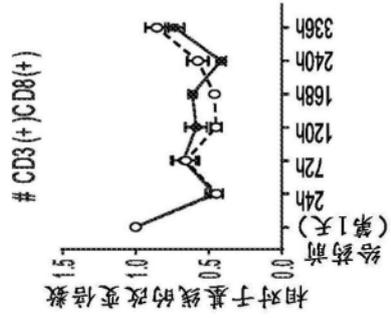


图 25H

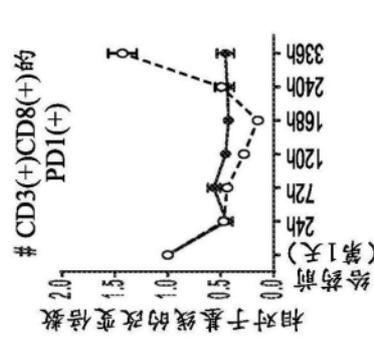
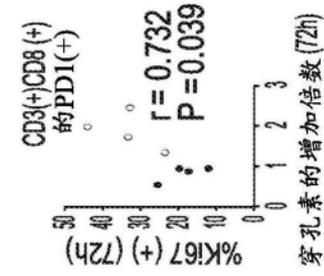


图 25J



--○--[22D4.017]-[R9E:R76A] (单体)

—●— [22D4.017]

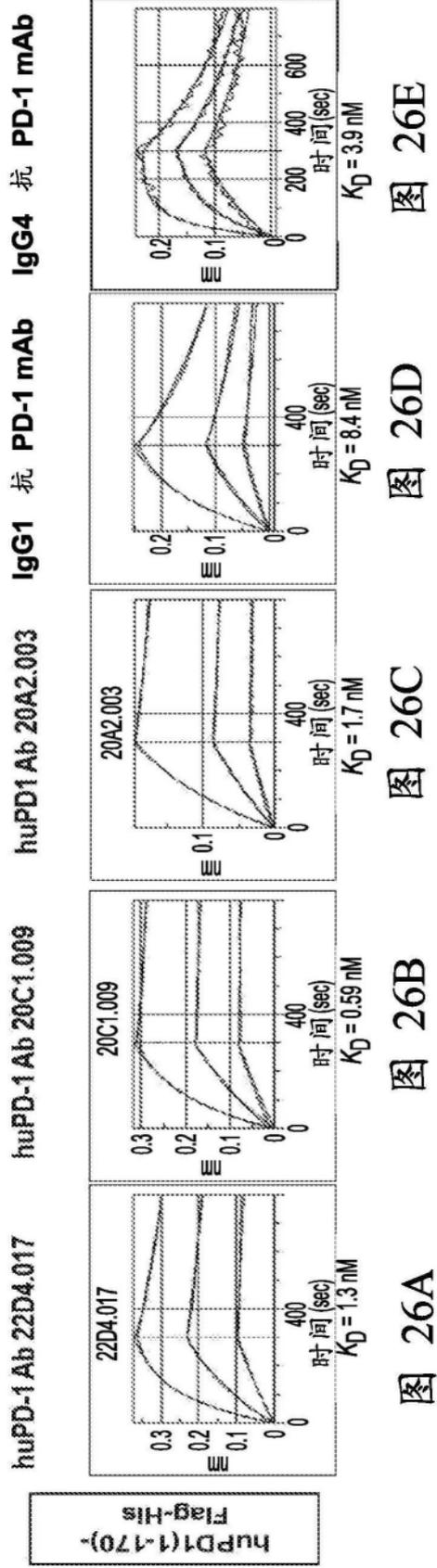


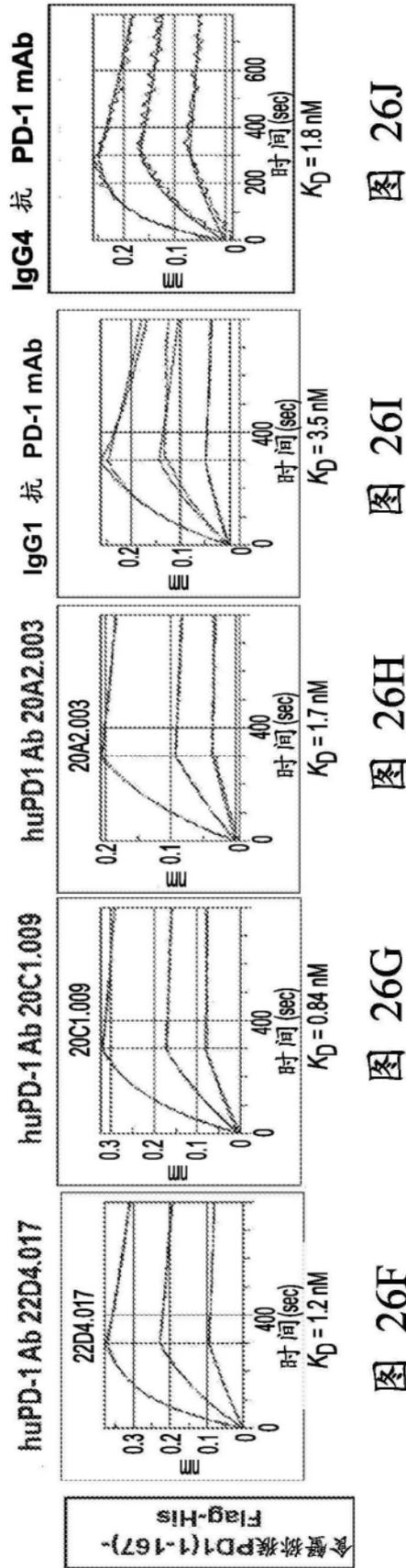
图 26A

图 26B

图 26C

图 26D

图 26E



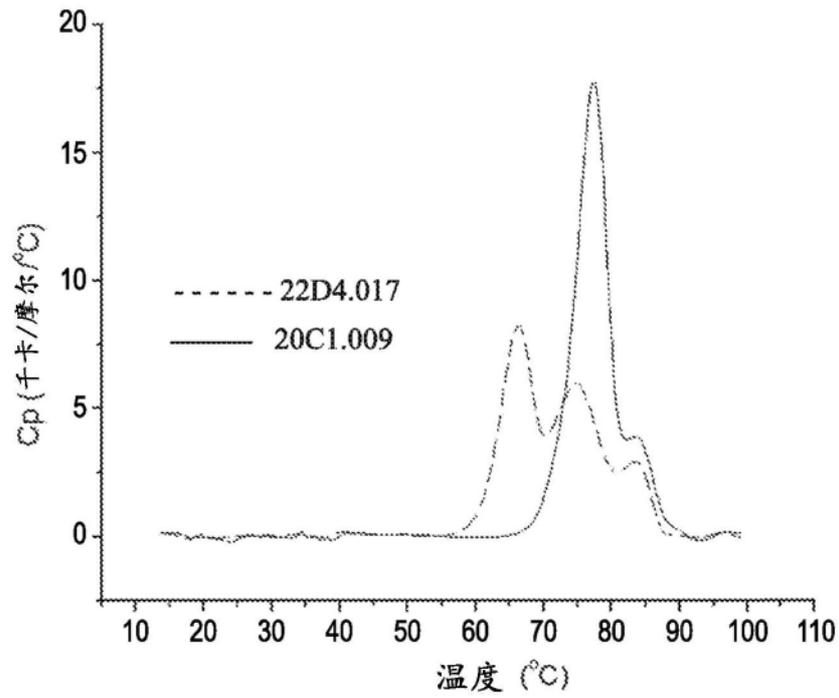


图27

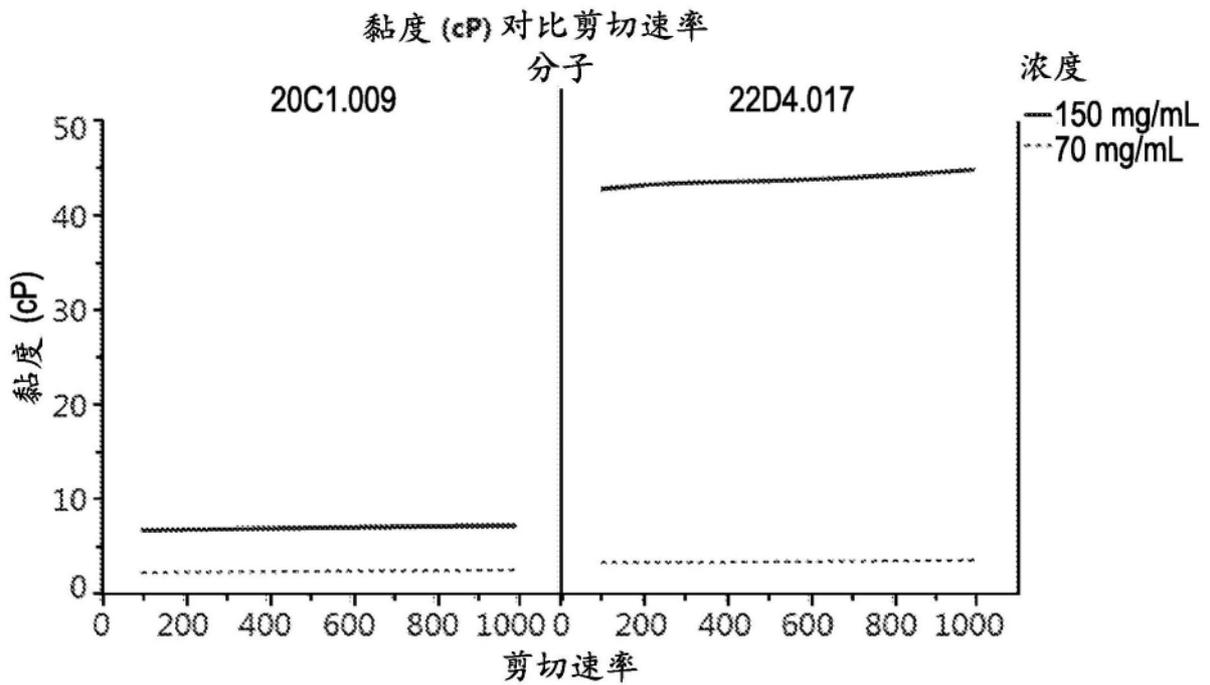


图28

图 29A

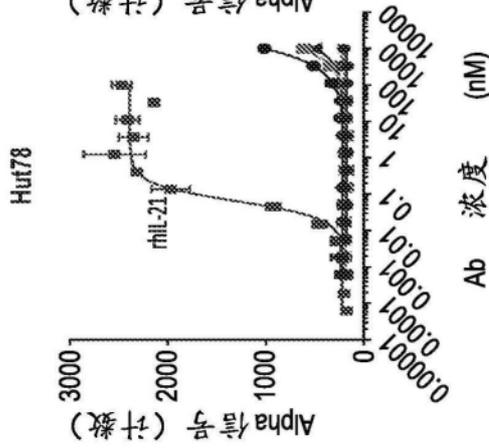


图 29B

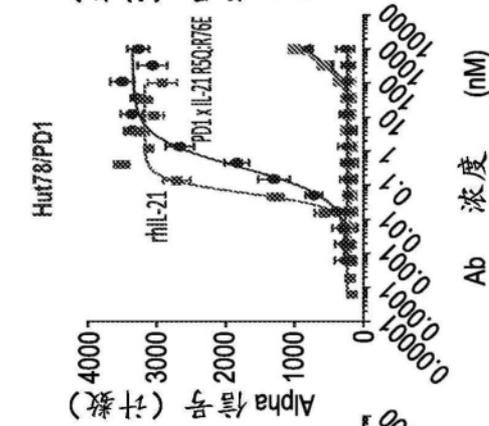


图 29C

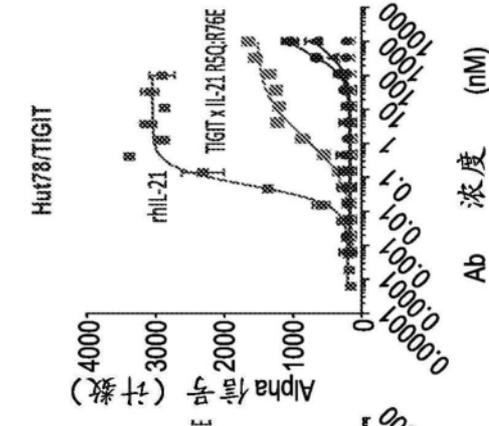
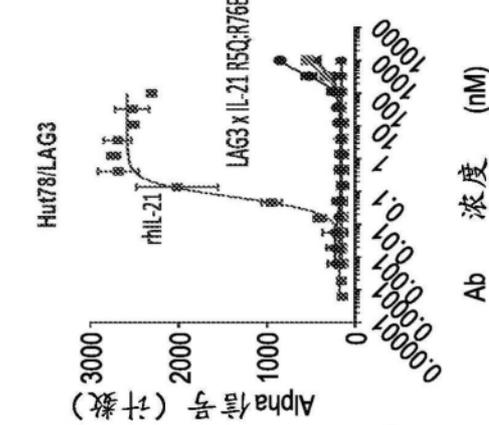


图 29D



- * huIgG1
- * rhIL-21
- * 22D4 017
- * TIGIT mAb
- * LAG3 mAb
- * PD1 mab x R5Q:R76E
- * TIGIT mab x R5Q:R78E
- * LAG3 mab x R5Q:R78E

经工程化的表达PD-1、TIGIT或LAG3的Hut78 T细胞系