(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119562973 A
(43)申请公布日 2025.03.04

(21)申请号 202380053155.9
(22)申请日 2023.07.10
(30)优先权数据
10-2022-0084866 2022.07.11 KR
10-2022-0085847 2022.07.12 KR
10-2022-0097012 2022.08.03 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2023/009763 2023.07.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/014808 KO 2024.01.18
(71)申请人 基诺富公司
地址 韩国首尔市钟路区庆熙宫街14(邮编:03175)
(72)发明人 朴兴禄 裴铜球 辛玹秀 崔恩珠 朴秀峰 李光现 金隽溟
(74)专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205
专利代理师 马雯雯 臧建明
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 14/55(2006.01)
C07K 14/54(2006.01)
C07K 14/715(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)

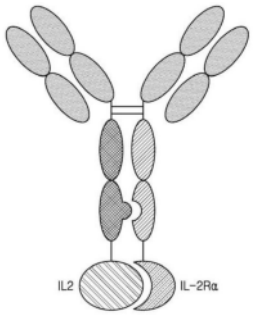
权利要求书3页 说明书33页
序列表（电子公布） 附图22页

(54)发明名称

细胞激素融合蛋白质

(57)摘要

本发明涉及一种包括可特异性诱导免疫细胞靶向域及免疫细胞的增殖和/或活化的细胞激素作用域的细胞激素融合蛋白质。具体而言,本发明涉及一种将细胞激素(例如,IL-2或IL-15)特异性传递至肿瘤内耗竭的免疫细胞(例如耗竭T细胞),从而诱导及增强免疫细胞的活化的融合蛋白质。本发明的融合蛋白质可将促进免疫细胞的增殖或活化的细胞激素选择性地传递至肿瘤微环境内的效应T细胞等,从而不仅可在肿瘤内诱导强烈的免疫增强及抗癌反应,而且通过细胞激素作用域的独特结构可显着减少由细胞激素引起的全身毒性乃至副作用。



CN 119562973 A

1.一种融合蛋白质,包括一个以上免疫细胞抗原结合域、由两个Fc链形成的Fc域及细胞激素作用域,其中所述细胞激素作用域包括白血球介素-2受体的α-次单元多肽或白血球介素-15受体的α-次单元多肽。

2.根据权利要求1所述的融合蛋白质,其中所述细胞激素作用域包括IL-2Rα多肽及IL-2多肽,所述IL-2Rα多肽及所述IL-2多肽彼此间不进行共价键结且分别连接至所述Fc域的彼此不同的Fc链。

3.根据权利要求1所述的融合蛋白质,其中所述细胞激素作用域为包括IL-2Rα多肽及IL-2多肽的复合体,所述复合体内的所述IL-2Rα多肽与所述IL-2多肽彼此共价键结,且所述复合体通过IL-2Rα多肽或IL-2多肽连接至所述Fc域的所述Fc链中的一者。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的融合蛋白质,其中所述IL-2Rα多肽为具有SEQ ID NO:3的胺基酸序列的IL-2Rα多肽或IL-2Rα多肽的IL-2结合片段、细胞外域或斯世域,且所述IL-2Rα多肽可包括增加对结合配位体IL-2多肽的结合的一种以上胺基酸修饰。

5.根据权利要求4所述的融合蛋白质,其中所述IL-2Rα多肽包括以SEQ ID NO:3的胺基酸序列号为基准的选自以下中的一个以上的胺基酸置换:L2D、L2E、L2Q、M25L、M25I、N27A、N27T、N27I、N27Y、S39K、L42F、L42I、L42A、L42V、L45R、N57E、I118R、H120A、H120D、H120K、H120Y、H120L、H120W、H120R及K153G。

6.根据权利要求4所述的融合蛋白质,其中所述IL-2Rα多肽包括以SEQ ID NO:3的胺基酸序列号为基准的L42I的胺基酸置换或包括SEQ ID NO:5的胺基酸序列。

7.根据权利要求2或3所述的融合蛋白质,其中所述IL-2多肽包括以SEQ ID NO:1的胺基酸序列号为基准的C125S的胺基酸置换或增加对所述IL-2Rα多肽的结合的一种以上胺基酸修饰,或者所述IL-2多肽进行循环置换。

8.根据权利要求7所述的融合蛋白质,其中所述IL-2多肽包括以SEQ ID NO:1的胺基酸序列号为基准的T37K的胺基酸置换。

9.根据权利要求1所述的融合蛋白质,其中所述细胞激素作用域包括IL-15Rα多肽及IL-15多肽,且所述IL-15Rα多肽及所述IL-15多肽分别连接至所述Fc域的彼此不同的Fc链。

10.根据权利要求1所述的融合蛋白质,其中所述细胞激素作用域为包括IL-15Rα多肽及IL-15多肽的复合体,所述复合体内的所述IL-15Rα多肽与所述IL-15多肽彼此共价键结,且所述复合体通过IL-15Rα多肽或IL-15多肽连接至所述Fc域的所述Fc链中的一者。

11.根据权利要求1、9及10中任一项所述的融合蛋白质,其中所述IL-15Rα多肽为具有SEQ ID NO:7的胺基酸序列的IL-15Rα多肽或IL-15Rα多肽的IL-15结合片段、细胞外域或斯世域,且所述IL-15Rα多肽可包括增加对配位体IL-15多肽的结合的一种以上胺基酸修饰。

12.根据权利要求9或10所述的融合蛋白质,其中所述IL-15多肽包括增加对所述IL-15Rα多肽的结合的一种以上胺基酸修饰或者所述IL-15多肽进行循环置换。

13.根据权利要求1所述的融合蛋白质,其中所述免疫细胞抗原结合域包含与一种以上T细胞靶抗原特异性结合的抗体的Fab分子或所述抗体的抗原结合片段。

14.根据权利要求13所述的融合蛋白质,更包含与一种以上肿瘤细胞靶抗原特异性结合的抗体的Fab分子或所述抗体的抗原结合片段。

15.根据权利要求13所述的融合蛋白质,其中所述免疫细胞抗原结合域包含与程序性细胞死亡-1蛋白质特异性结合的抗体的Fab分子或所述抗体的抗原结合片段。

16.根据权利要求15所述的融合蛋白质,其中所述免疫细胞抗原结合域为帕博利珠单抗或纳武单抗抗体的Fab分子或其抗原结合片段、或者为与和帕博利珠单抗或纳武单抗抗体或抗原结合片段相同的抗原决定区结合或与帕博利珠单抗或纳武单抗抗体或抗原结合片段竞争的抗体的Fab分子或其抗原结合片段。

17.根据权利要求15所述的融合蛋白质,其中所述免疫细胞抗原结合域为包含以下的抗PD-1抗体的Fab分子或其抗原结合片段:

重链互补性决定区1,包含SEQ ID NO:9的胺基酸序列,

重链互补性决定区2,包含选自由SEQ ID NO:10至15组成的群组中的任一者的胺基酸序列,

重链互补性决定区3,包含选自由SEQ ID NO:16至31组成的群组中的任一者的胺基酸序列,

轻链互补性决定区1,包含选自由SEQ ID NO:32至35组成的群组中的任一者的胺基酸序列,

轻链互补性决定区2,包含SEQ ID NO:36的胺基酸序列,以及

轻链互补性决定区3,包含SEQ ID NO:37的胺基酸序列。

18.根据权利要求15所述的融合蛋白质,其中所述免疫细胞抗原结合域包括包含以下的抗PD-1抗体的Fab分子或其抗原结合片段:包含SEQ ID NO:38、40、42或44的胺基酸序列的重链可变区的互补性决定区1、互补性决定区2及互补性决定区3;以及包含SEQ ID NO:39、41、43或45的胺基酸序列的轻链可变区的互补性决定区1、互补性决定区2及互补性决定区3。

19.根据权利要求17或18所述的融合蛋白质,其中所述免疫细胞抗原结合域为包含以下的抗PD-1抗体的Fab分子或其抗原结合片段:包含与SEQ ID NO:38、40、42或44的胺基酸序列序列同一性至少为75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%以上的胺基酸序列的重链可变区;以及包含与SEQ ID NO:39、41、43或45的胺基酸序列序列同一性至少为75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%以上的胺基酸序列的轻链可变区。

20.根据权利要求1所述的融合蛋白质,其中所述Fc域为IgG类Fc域或IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类Fc域,且于为IgG4 Fc域的情况能够包括S228P的胺基酸置换(以卡巴文献的EU编号系统为基准)。

21.根据权利要求1所述的融合蛋白质,其中所述Fc域包括使与Fc受体的结合或效用功能降低的一种以上的胺基酸修饰,或者所述Fc域缺少CH2域。

22.根据权利要求21所述的融合蛋白质,其中所述Fc域包括在选自E233、L234、L235、G236、G237、N297、L328、P329及P331中的一个以上位置(以卡巴文献的EU编号系统为基准)处的胺基酸修饰。

23.根据权利要求1所述的融合蛋白质,其中所述Fc域包括促进所述两个Fc链间的异二聚体的形成的修饰。

24.根据权利要求23所述的融合蛋白质,其中所述修饰为在所述Fc域的任一Fc链中包括杵修饰且在另一Fc链中包括臼修饰的杵入臼修饰。

25.根据权利要求24所述的融合蛋白质,其中所述杵修饰包括以卡巴的EU编号系统为基准T366W的胺基酸置换,且所述臼修饰包括T366S、L368A及Y407V的胺基酸置换。

26.根据权利要求25所述的融合蛋白质,其中所述Fc域的杵链更包括S354C的胺基酸置换,且所述Fc域的臼链更包括Y349C的胺基酸置换。

27.根据权利要求24至26中任一项所述的融合蛋白质,其中

所述Fc域的任一Fc链更包括K360E的胺基酸置换,且另一Fc链更包括Q347R的胺基酸置换,或者

所述Fc域的任一Fc链更包括K360E及Q347E的胺基酸置换,且另一Fc链更包括Q347R的胺基酸置换或K360R及Q347R的胺基酸置换。

28.根据权利要求1所述的融合蛋白质,其中所述细胞激素作用域通过连接子与所述Fc域结合。

29.根据权利要求28所述的融合蛋白质,其中所述连接子为肽连接子。

30.根据权利要求29所述的融合蛋白质,其中所述连接子为一般式(GX)n、(GGGX)n、(XGGG)nXGG或(GGGGX)n的肽,此处X为A或S,且n为1至4的自然数。

31.根据权利要求13至19中任一项所述的融合蛋白质,其中所述抗原结合片段为单链可变区片段、$(scFV)_2$、双单链可变区片段、二硫键稳定性Fv片段、$(dsFv)_2$、Fv、dsFv-dsFv'、双抗体、双链双抗体、三抗体、四抗体、奈米抗体、域抗体、单域抗体或二价域抗体。

32.一种多核苷酸,对如权利要求1至3、9及10中任一项所述的融合蛋白质进行编码。

33.一种表达载体,包括如权利要求32所述的多核苷酸。

34.一种宿主细胞,包含如权利要求32所述的多核苷酸或包括所述多核苷酸的表达载体。

35.一种根据权利要求1至3、9及10中任一项所述的融合蛋白质的生产方法,包括以下步骤:培养包括包含多核苷酸的表达载体的宿主细胞,所述多核苷酸对如权利要求1至3、9及10中任一项所述的融合蛋白质进行编码。

36.根据权利要求35所述的融合蛋白质的生产方法,其中所述表达载体包括:

第一表达载体,包括对SEQ ID NO:51的胺基酸序列进行编码的多核苷酸序列及对SEQ ID NO:57的胺基酸序列进行编码的多核苷酸序列,以及

第二表达载体,包括对SEQ ID NO:51的胺基酸序列进行编码的多核苷酸序列及对SEQ ID NO:58的胺基酸序列进行编码的多核苷酸序列。

37.根据权利要求36所述的融合蛋白质的生产方法,其中在宿主细胞中同时表达所述第一表达载体及所述第二表达载体,以获得所述融合蛋白质。

38.一种药学组成物,包含如权利要求1至3、9及10中任一项所述的融合蛋白质,用以预防、改善或治疗肿瘤、癌症、转移性肿瘤、转移性癌症或感染性疾病。

细胞激素融合蛋白质

技术领域

[0001] 本发明涉及一种包括免疫细胞靶向域及可特异性诱导免疫细胞的增殖和/或活化的细胞激素作用域的细胞激素融合蛋白质。具体而言,本发明涉及一种将细胞激素(例如,IL-2或IL-15)特异性传递至肿瘤内耗竭的免疫细胞(例如耗竭的T细胞),进而诱导及增强免疫细胞的活化的融合蛋白质。另外,本发明涉及一种对所述融合蛋白质进行编码的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体及宿主细胞。另外,本发明涉及一种所述融合蛋白质的生产方法、以及使用所述融合蛋白质用于治疗哺乳动物的疾病(例如癌症)或增强免疫反应的药学组成物、方法及其用途。

背景技术

[0002] 细胞激素是参与免疫系统的调节的细胞讯号传递分子。举例而言,IL-2是参与T细胞的增殖与活化的必需细胞激素。IL-2刺激T细胞的增殖与分化,诱导细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes,CTL)的生成,且将末梢淋巴细胞分化成细胞毒性细胞与淋巴激素活化杀手细胞(lymphokine-activated killer cell,LAK),刺激自然杀手细胞(natural killer cell)的增殖与活化。

[0003] 因IL-2如上所述的作用,期待IL-2免疫疗法对治疗转移性癌症有效,经过研究,美国食品药物管理局(Food and Drug Administration,FDA)批准了人类重组IL-2(普留净(Proleukin®),阿地白介素(aldesleukin))用于转移性肾细胞癌与转移性黑色素瘤适应症。然而普留净引起如微血管渗漏症候群(capillary leak syndrome,CLS)等严重的副作用,从而限制了施药对象患者与可施药的量。另外,半衰期短于2小时以下,因此存在需要重复进行连续5天每天3次IV施药的循环的不便。

[0004] IL-2受体中存在高亲和度、中等亲和度、低亲和度三种受体。高亲和度受体由IL-2受体阿尔法(IL-2Rα,CD25)、贝塔(IL-2Rβ,CD122)及伽马(IL-2Rγ,CD123)三个次单元组成。中等亲和度受体由IL-2Rβ与IL-2Rγ组成,且低亲和度受体仅由IL-2Rα组成。虽然由β与γ次单元组成的中等亲和度受体与由α、β、γ次单元组成的高亲和度受体相比与IL-2的亲和度还低约100倍,但在与IL-2结合时可传递讯号。α-次单元虽然赋予受体高亲和度结合能力,但在传递讯号方面不是必须的。

[0005] 休止期的免疫细胞中仅中等亲和度的IL-2受体(IL-2Rβγ)表达。当休止期的T细胞因抗原而活化时,IL-2Rα迅速表达,当IL-2与IL-2Rα结合时,IL-2Rβ与IL-2Rγ参与其中。通过该IL-2Rαβγ复合物与IL-2的结合发生讯号传递,从而促进包括可杀死被病毒感染的细胞或肿瘤细胞的细胞毒性T细胞在内的效应T细胞(T_{eff})的生长。

[0006] 另外,IL-2介导T细胞的活化-诱导细胞死亡(activation-induced cell death,AICD)。AICD是完全活化的T细胞经历程序性细胞死亡的过程,因此不仅对正常的自身抗原,而且对如肿瘤抗原等持续存在的抗原也会产生免疫宽容。

[0007] IL-2亦参与维持末梢$CD4^+CD25^+$调节T细胞(T_{reg})。在调节T细胞中持久地表达IL-2Rα。调节T细胞抑制细胞毒性T细胞攻击自身抗原或肿瘤细胞的功能。由于此种IL-2的多方面

的作用,IL-2不适合展现最佳的肿瘤抑制效果。

[0008] 为了减少IL-2的毒性并增强肿瘤抑制效果,已经进行了各种尝试。作为一例,已经尝试了抑制IL-2与IL-2Rα结合的策略,用于使IL-2可作用于T_{eff}细胞的中等亲和度IL-2Rβγ而并非T_{reg}细胞的高亲和度IL-2Rβγ受体。作为其例子,具有如抗-IL-2单克隆(monoclonal)抗体与IL-2的组合(神村(Kamimura)等人,免疫学杂志(J Immunol)177,306-14(2006);博伊曼(Boyman)等人,科学(Science)311,1924-27(2006))、在与IL-2Rα的结合部位引入突变的IL-2变异体(WO2012/107417等)、在IL-2Rα结合部位引入聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)基的IL-2(WO2012/065086)等。

[0009] 但是迄今为止开发的IL-2变异体仍然作为抗癌剂的治疗指数(therapeutic index)是不佳的,且即便以表现出毒性的高容量施药,抗癌效果亦不明显。其原因认为是由于IL-2变异体以选择性地作用于T_{eff}细胞而非T_{reg}细胞的方式制成,但主要在末梢表现出此种作用且在肿瘤微环境(tumor microenvironment,TME)中的此种作用不充分。

[0010] 为了克服此种缺点,进行了用于使IL-2变异体可在肿瘤组织中起作用的研究,且尝试了使肿瘤相关抗原(tumor associated antigen,TAA)-特异性抗体与IL-2结合从而将IL-2带入肿瘤组织的策略。然而,虽然此种策略可将IL-2诱导至肿瘤部位,但难以在肿瘤内的T_{eff}细胞中有效地提供IL-2。需要可选择性地对各种肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrated lymphocyte,TIL)中的T_{eff}细胞提供IL-2的方法。

[0011] 不仅IL-2,其他细胞激素(例:IL-15)亦可在肿瘤微环境中起到诱导免疫活性或免疫抑制的重要的媒介作用,且此种细胞激素是在免疫细胞中分泌的物质,大体局部作用于多种靶,从而起到使微环境变化的作用。但是该些细胞激素亦具有局部作用短并消失的特性,从而难以开发成治疗剂。

发明内容

[0012] 发明所欲解决的课题

[0013] 本发明人欲开发一种有效的细胞激素治疗剂,所述细胞激素治疗剂使肿瘤微环境中耗竭的免疫细胞选择性活化,从而在增强抗癌活性的同时亦减少由外源性细胞激素引起的全身副作用。

[0014] 解决课题的手段

[0015] 本发明涉及一种包括免疫细胞靶向域及可特异性诱导免疫细胞的增殖和/或活化的细胞激素作用域的融合蛋白质。本发明人为了使促进免疫细胞的增殖或活化的细胞激素不对存在于末梢的其他免疫细胞或内皮细胞等造成影响,同时可选择性地传递至TME环境的T_{eff}细胞,设计了将细胞激素作用域连接至以免疫细胞为靶的抗体域,两个域以“顺式(in-cis)”方式作用于肿瘤内T_{eff}细胞的融合蛋白质。

[0016] 本发明提供一种包括一个以上免疫细胞抗原结合域、由两个Fc链形成的Fc域及细胞激素作用域的融合蛋白质。在本发明的一方面,所述细胞激素作用域是促进免疫细胞的增殖或活化的细胞激素或与所述细胞激素结合的域。所述细胞激素可使用自外部注入的外源性细胞激素或存在于内部的内源性细胞激素。作为此种细胞激素,可使用可与IL-2受体的β-次单元(IL-2Rβ)及共同γ链受体(亦可称为IL-2Rγ)结合并诱导通过IL-2Rβγ进行的讯号传递活化的IL-2多肽及IL-15多肽。

[0017] 在一方面,本发明提供一种融合蛋白质,所述融合蛋白质包括一个以上免疫细胞抗原结合域、由两个Fc链形成的Fc域及细胞激素作用域,所述细胞激素作用域包括白血球介素-2受体的α-次单元(α-subunit of interleukin-2receptor,IL-2Rα)多肽及IL-2多肽,所述IL-2Rα多肽及IL-2多肽彼此间不进行共价键结且分别连接至所述Fc域的彼此不同的Fc链。

[0018] 此种结构的本发明的融合蛋白质由于IL-2被IL-2Rα抢占,因此与表达高亲和度IL-2受体(或简称为IL-2Rαβγ)的调节T细胞(T_{reg})、Foxp3-阴性CD4 T细胞、一部分先天性淋巴细胞或其他内皮(endothelial)细胞的结合力弱化,相比之下,在不存在IL-2Rα时可与表达由IL-2Rβ及IL-2Rγ组成的中等亲和度IL-2受体(或简称为IL-2Rβγ)的细胞毒性CD8+T细胞、记忆T细胞、NK-T细胞等T_{eff}细胞特异性结合,从而可增强抗癌效果且显着减少全身毒性或副作用。

[0019] 在一方面,本发明提供一种融合蛋白质,所述融合蛋白质包括一个以上免疫细胞抗原结合域、由两个Fc链形成的Fc域及细胞激素作用域,所述细胞激素作用域为IL-2Rα多肽与IL-2多肽彼此共价键结的复合体,且所述复合体通过IL-2Rα多肽或IL-2多肽与所述Fc域任一侧的Fc链结合。

[0020] 在一方面,本发明提供一种融合蛋白质,所述融合蛋白质包括一个以上免疫细胞抗原结合域、由两个Fc链形成的Fc域及细胞激素作用域,所述细胞激素作用域包括白血球介素-15受体的α-次单元(α-subunit of interleukin-15receptor,IL-15Rα)多肽及IL-15多肽,所述IL-15Rα多肽及IL-15多肽分别连接至所述Fc域的彼此不同的Fc链。

[0021] 在一方面,本发明提供一种融合蛋白质,所述融合蛋白质包括一个以上免疫细胞抗原结合域、由两个Fc链形成的Fc域及细胞激素作用域,所述细胞激素作用域为IL-15Rα多肽与IL-15多肽彼此共价键结的复合体,且所述复合体通过IL-15Rα多肽或IL-15多肽与所述Fc域任一侧的Fc链结合。

[0022] 在一方面,本发明提供一种融合蛋白质,所述融合蛋白质包括一个以上免疫细胞抗原结合域、由两个Fc链形成的Fc域及细胞激素作用域,所述细胞激素作用域不包括IL-2多肽及IL-15多肽而仅包括IL-2Rα多肽或IL-15Rα多肽,从而可与内源性IL-2或IL-15结合并将其诱导至T_{eff}细胞。

[0023] 在本发明的一方面,所述IL-2Rα多肽包括具有本说明书随附序列目录的SEQ ID NO:3的胺基酸序列的野生型成熟IL-2Rα多肽或IL-2Rα多肽的IL-2结合片段、细胞外(extracellular)域或斯世(Sushi)域或其变异体。

[0024] 在本发明的一方面,所述IL-15Rα多肽包括具有本说明书随附序列目录的SEQ ID NO:7的胺基酸序列的野生型成熟IL-15Rα多肽或IL-15Rα多肽的IL-15结合片段、细胞外(extracellular)域或斯世(Sushi)域或其变异体。

[0025] 在本发明的一方面,所述IL-2Rα多肽及IL-15Rα多肽可包括提高与各自的结合配位体、即IL-2多肽及IL-15多肽的结合亲和力的一种以上胺基酸修饰(modification),较佳为胺基酸置换。在例示性方面,本发明的融合蛋白质包括IL-2Rα变异体,所述IL-2Rα变异体包括以SEQ ID NO:3的胺基酸序列号为基准以下中的一个以上的胺基酸置换:L2D、L2E、L2Q、M25L、M25I、N27A、N27T、N27I、N27Y、S39K、L42F、L42I、L42A、L42V、L45R、N57E、I118R、H120A、H120D、H120K、H120Y、H120L、H120W、H120R及K153G。在较佳的方面,本发明的融合蛋

白质包括IL-2Rα变异体,所述IL-2Rα变异体包括以SEQ ID NO:3的胺基酸序列号为基准L42I胺基酸置换。

[0026] 在本发明的一方面,所述IL-2多肽包括具有本说明书随附序列目录的SEQ ID NO:1的胺基酸序列的野生型成熟IL-2多肽或其C125S变异体(SEQ ID NO:2)或循环置换的(循环排列的(circular permutated))变异体。在本发明的一方面,所述IL-15多肽包括具有本说明书随附序列目录的SEQ ID NO:6的野生型成熟IL-15多肽或其循环置换的变异体。在本发明的一方面,所述IL-2多肽或IL-15多肽可包括提高与各自的结合受体的α-次单元的结合亲和力的一种以上胺基酸修饰。在较佳的方面,本发明的融合蛋白质包括IL-2变异体,所述IL-2变异体包括以SEQ ID NO:1的胺基酸序列号为基准T37K胺基酸置换。

[0027] 在本发明的一方面,所述免疫细胞抗原结合域包含与一种以上T细胞靶抗原特异性结合的抗体的Fab分子或其抗原结合片段。在本发明的一方面,所述免疫细胞抗原结合域包含与在肿瘤微环境内的T_{eff}细胞中表达的免疫查核点(immunecheckpoint)蛋白质(例:程序性细胞死亡-1(programmed death-1,PD-1)蛋白质)特异性结合的抗体的Fab分子或抗体的抗原结合片段。在本发明的一方面,所述免疫细胞抗原结合域可为可与可对肿瘤微环境内T_{eff}细胞赋予结合特异性的CD8+效应T细胞的表面标记结合的成分、抗体或其抗原结合片段。在较佳的方面,本发明的所述免疫细胞抗原结合域为抗PD-1抗体的Fab分子或抗体的抗原结合片段。在例示性方面,本发明的免疫细胞抗原结合域为帕博利珠单抗(pembrolizumab)或纳武单抗(nivolumab)抗体的Fab分子或其抗原结合片段、或者为与和该些抗体或抗原结合片段相同的抗原决定区(epitope)结合或与该些抗体或抗原结合片段竞争的抗体的Fab分子或其抗原结合片段。较佳为本发明的融合蛋白质包括免疫细胞抗原结合域,所述免疫细胞抗原结合域包括包含以下的抗PD-1抗体的Fab分子或其抗原结合片段:包含本说明书随附序列目录的SEQ ID NO:38、40、42或44的胺基酸序列的重链可变区的互补性决定区(complementarity determining region,CDR)1、CDR2及CDR3;以及包含SEQ ID NO:39、41、43或45的胺基酸序列的轻链可变区的CDR1、CDR2及CDR3。

[0028] 在本发明的一方面,所述免疫细胞抗原结合域可为包括2个以上不同的T细胞靶抗原结合域的多特异性结合域。在本发明的一方面,本发明的融合蛋白质可包括与一种以上肿瘤细胞靶抗原特异性结合的抗体的Fab分子或其抗原结合片段作为额外的抗原结合域。

[0029] 在本发明的一方面,所述Fc域可为第一链与第二链彼此相同的同二聚体或彼此不同的异二聚体。在本发明的一方面,所述Fc域为人类IgG类Fc域。在本发明的一方面,所述Fc域为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类Fc域。在本发明的一方面,于所述Fc域为IgG4 Fc域的情况,较佳为包括S228P的胺基酸置换(以卡巴(Kabat)文献的EU编号系统为基准)。在本发明的一方面,所述Fc域缺少CH2域而可仅由CH3域组成。另外,本发明的所述Fc域可包括使与Fc受体的结合或效用功能(effector function)降低的一种以上的胺基酸修饰。在例示性方面,此种Fc域的修饰包括在选自E233、L234、L235、G236、G237、N297、L328、P329及P331中的一个以上位置(以卡巴文献的EU编号系统为基准)处的胺基酸修饰,但不限定于此。

[0030] 在本发明的一方面,所述Fc域可包括用于促进两个Fc链间的异二聚体形成的修饰。在例示性方面,此种Fc域的修饰可包括杵入臼(knob-into-hole)修饰、杵入臼二硫化物(knob-into-holedisulfide)修饰等。在较佳的方面,本发明的融合蛋白质包括所述杵入臼(knob-into-hole)修饰或杵入臼二硫化物(knob-into-holedisulfide)修饰,以及任一Fc

链更包括K360E的胺基酸置换且另一Fc链更包括Q347R的胺基酸置换,或者任一Fc链更包括K360E及Q347E的胺基酸置换且另一Fc链更包括Q347R的胺基酸置换或K360R及Q347R的胺基酸置换的Fc域变异体。

[0031] 在本发明的一方面,所述免疫细胞抗原结合域及细胞激素作用域可直接连接至Fc域或通过连接子(linker)连接至Fc域。在本发明的一方面,所述免疫细胞抗原结合域连接至Fc域的N-末端,细胞激素作用域连接至Fc域的C-末端,或者可采取与之相反的结构。在本发明的一方面,所述连接子较佳为肽连接子,但不限定于此。

[0032] 本发明的又一方面提供对所述融合蛋白质或其各区进行编码的多核苷酸(polynucleotide)、包括所述多核苷酸的载体、或引入所述载体的转化细胞。本发明的又一方面提供一种包括所述载体的宿主细胞,且提供一种培养所述宿主细胞来生产本发明的融合蛋白质的方法。

[0033] 本发明的又一方面提供一种包含所述融合蛋白质作为有效成分的用以预防、改善或治疗肿瘤、癌症、转移性肿瘤、转移性癌症或感染性疾病的药学组成物。本发明的又一方面提供一种方法,所述方法通过向需要预防、改善或治疗肿瘤、癌症、转移性肿瘤、转移性癌症或感染性疾病的个体施用所述融合蛋白质来预防、改善或治疗肿瘤、癌症、转移性肿瘤、转移性癌症或感染性疾病。

[0034] 发明的效果

[0035] 根据本发明,可提供一种有效的抗癌细胞激素治疗剂,所述抗癌细胞激素治疗剂在肿瘤微环境中使细胞毒性效应T细胞选择性活化,从而在增强抗癌活性的同时减少全身副作用。

附图说明

[0036] 图1a至1c概略性地示出包括IL-2与IL-2Rα的根据本发明一实施方式的融合蛋白质的结构。

[0037] 图2a及2b概略性地示出包括IL-2与IL-2Rα的复合体或IL-15与IL-15Rα的复合体的根据本发明一实施方式的融合蛋白质的结构。

[0038] 图3a至3d概略性地示出不包括IL-2及IL-15而包括IL-2Rα或IL-15Rα的根据本发明一实施方式的融合蛋白质的结构。

[0039] 图4是示出为基于结构设计连接子、根据本发明一实施方式的融合蛋白质与hPD-1及IL-2Rβγ结合的方式的结晶结构分析结果。

[0040] 图5是确认根据本发明一实施方式的融合蛋白质A的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)结果。

[0041] 图6a及6b是确认根据本发明一实施方式的融合蛋白质B、C及D的SDS-PAGE结果。

[0042] 图7是利用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)对是否与根据本发明一实施方式的融合蛋白质的IL-2Rα蛋白质(图7a)及IL-2Rβγ蛋白质(图7b)进行选择性结合进行试验的结果。

[0043] 图8是示出是否表达根据本发明一实施方式的融合蛋白质的PD-1及根据IL-2受体表达种类的IL-2讯号传递反应性差异的一系列海克蓝(HEK-Blue)试验结果曲线图。

[0044] 图9示出用于确认在MC38小鼠肿瘤模型中根据本发明一实施方式的融合蛋白质的生物体内抗癌效果的动物实验日程。

[0045] 图10是将在MC38小鼠肿瘤模型中施用根据本发明一实施方式的融合蛋白质的随时间的肿瘤大小变化(图10a)、生存率(图10b)及体重变化(图10c)与根据单独施用抗PD-1抗体及单独施用异二聚体(heterodimeric)Fc-IL2/IL2Rα的结果进行比较的曲线图。

[0046] 图11是将在MC38小鼠肿瘤模型中施用根据本发明一实施方式的融合蛋白质的随时间的肿瘤大小变化(图11a)、生存率(图11b)及体重变化(图11c)与根据联合施用抗PD-1抗体及异二聚体Fc-IL2/IL2Rα的结果进行比较的曲线图。

[0047] 图12示出用于确认根据本发明一实施方式的融合蛋白质的长期记忆免疫反应的动物实验日程。

[0048] 图13是示出在长期记忆免疫反应实验中施用根据本发明一实施方式的融合蛋白质的随时间的肿瘤大小变化的曲线图。

[0049] 图14是示出在长期记忆免疫反应实验中施用根据本发明一实施方式的融合蛋白质的肿瘤大小变化的动物模型照片。

[0050] 图15示出用于评估在MC38小鼠肿瘤模型中单次施用根据本发明一实施方式的融合蛋白质的容量相关性抗癌效果的动物实验日程。

[0051] 图16是示出在MC38小鼠肿瘤模型中单次施用根据本发明一实施方式的融合蛋白质的随时间的肿瘤大小变化(图16a)及体重变化(图16b)的曲线图。

[0052] 图17是在B16F10小鼠黑色素瘤模型中施用根据本发明一实施方式的融合蛋白质的随时间的肿瘤大小变化(图17a)及肿瘤生长抑制率(TGI%)(图17b)的曲线图。

[0053] 图18是示出在Pan02小鼠胰腺癌模型中施用根据本发明一实施方式的融合蛋白质的随时间的肿瘤大小变化(图18a)、生存率(图18b)及体重变化(图18c)的曲线图。

[0054] 图19是对MC38小鼠肿瘤模型中单次施用根据本发明一实施方式的融合蛋白质A与B的随时间的肿瘤大小变化(图19a)及肿瘤生长抑制率(TGI%)(图19b)进行比较并示出的曲线图。

[0055] 图20是海克蓝(HEK-Blue)试验结果的图表,示出依据是否利用根据本发明一实施方式的融合蛋白质的抗PD-1抗体进行预先处理的IL-2讯号传递反应性差异。

具体实施方式

[0056] 在本发明中,“蛋白质”或“多肽”解释为包括作为利用至少两个共价键附着的胺基酸的寡肽(oligopeptide)的概念。在本发明中,“A蛋白质”或“A多肽”可解释为包括作为亲本的A蛋白质或A多肽的全部或一部分、其类似体及突变体的概念。另外,“突变”、“修饰”及“变异体”是包括胺基酸残基的置换、插入和/或缺失的含义,较佳为本发明的突变体可包括胺基酸残基的置换。胺基酸残基的置换可按照作为亲本的野生型蛋白质中存在的胺基酸残基、胺基酸残基的编号及经置换的胺基酸残基的顺序表示。

[0057] 在本发明中,“融合蛋白质”可解释为包括两个以上蛋白质彼此结合的形态或包括所述形态的复合体的含义。

[0058] 在本发明中,用语“程序性细胞死亡-1”、“PD-1”、“PD-1蛋白质”相互交换地使用,包括变异体、同型、人类PD-1的物种同源物、及具有与至少一个PD-1共同的抗原决定区的相

似物。

[0059] 在本发明中,用语“抗体”包括整个抗体及任意的“抗原结合部分(portion)”或其单链。“抗体”指包括通过二硫键(disulfide bond)相互连接的至少两个重链及两个轻链的蛋白质或其抗原结合部分。各重链由重链可变区及重链恒定区形成。重链恒定区由三个域、即CH1、CH2及CH3形成。各轻链由轻链可变区及轻链恒定区形成。轻链恒定区由一个域、即CL形成。重链可变区(VH)及轻链可变区(VL)可额外地细分化为被称为互补性决定区(CDR)的超变异性(hypervariability)区,该区配置于更保守的被称为架构区(framework regions)(FR)的区之间。各VH及VL由三个CDR及四个FR形成,且自胺基末端至羧基末端按照以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链及轻链的可变区含有与抗原进行相互作用的结合域。

[0060] 在本发明中,“抗体”包括多克隆性、单克隆性、单特异性、多特异性、非特异性、人源化、单链、嵌合体、合成的、重组、杂交(hybrid)、突变的、及移植(grafted)抗体,但不限定于此。所述用语“抗原结合部分”包括任意抗体片段且包括保持抗原结合功能、即与抗原特异性结合的能力的所有抗体片段。典型地,此种抗原结合部分包括抗原结合片段。

[0061] 本发明的用语“抗原结合域”是可与靶抗原结合的任意域的总称,包括肽、蛋白质、抗体、适配体(aptamer)、化学残基等。于本发明的融合蛋白质包括抗体作为抗原结合域的情况,不仅可包括整个抗体,而且可包括其抗原结合部分、Fab分子或抗原结合片段作为抗原结合域。所述用语“Fab分子”是在重链及轻链中分别具有各一个恒定区与可变区的部位,可部分包括枢纽区或部分变形。本发明中使用的用语“Fab分子”包括Fab、Fab’、$F(ab')_2$、Fab’-SH等且定义为包括所有抗体可能的抗原结合部位的含义。

[0062] 在本发明中,抗体的“抗原结合部分”、“抗原识别部位”、“抗原结合域”、“抗原结合片段”、及“结合片段”指包括作为抗体与抗原之间特异性结合的原因的胺基酸的抗体分子的一部分。例如,于抗原大的情况下,抗原结合片段可仅结合至抗原的一部分。将成为与抗原分子的抗原结合片段特异性相互作用的原因的部分称为“抗原决定区”或“抗原决定位(antigenic determinant)”。在本发明中可使用的“抗原结合部分”、“抗原识别部位”、“抗原结合域”、“抗原结合片段”及“结合片段”的例子中存在Fab、Fab’、$F(ab')_2$、Fab’-SH、Fd、Fv、单链可变区片段(single chain variable fragment,scFv)、$(scFv)_2$、scFv-Fc、$(scFv)_2$-Fc、二硫键稳定性Fv片段(disulfide-stabilized Fv fragment,dsFv)、$(dsFv)_2$、dsFv-dsFv’、VL、VH、双抗体(diabody)、双链(double strands,ds)双抗体、三抗体(triabody)、四抗体(tetrabody)、微型抗体($(scFV\text{-}CH_3)_2$)、奈米抗体、域抗体、单域抗体(sdAb)、二价域抗体、IgG德尔塔CH2、飞诺莫(Fynomer)、与抗体融合的飞诺莫(fynomers fused to antibodies,FynomAbs)、双亲和再靶向(dual-affinity re-targeting,DART)、白蛋白结合域抗体(albumin-binding domain antibodies,AlbudAbs)、双特异性T细胞衔接器(bispecific T-cell engager,BiTE)、串联双功能抗体(tandem diabodies,TandAbs)、双重作用Fab(dual acting Fab,DAF)、二合一抗体(two-in-one antibodies)、小型模组化免疫药物(small modular immunopharmaceutical,SMIP)、抗钙素(anticalins)、FN3单体(monobody)、预设计锚蛋白重复蛋白(designed ankyrin repeat protein,DARPin)、亲和体(Affibodies)、Affilins、黏合素(Affimers)、Affitins、阿尔法抗体(Alphabodies)、Avimers、Im7、可变淋巴细胞受体(variable lymphocyte receptor,

VLR)、可变新抗原受体(variable new antigen receptor,VNAR)、Trimab、交叉单克隆抗体(Cross monoclonal antibody,CrossMab)、三叉戟(TRIDENT)、双奈米抗体(binanobodies)、双-sdFv、双可变域免疫球蛋白(dual variabledomain immunoglobulin,DVD-Ig)、CovX-bodies(肽修饰抗体(peptide modified antibodies))、杜欧抗体(Duobody)及triomAbs等,但不限定于此。

[0063] 虽然所述抗原结合片段可包括抗体轻链可变区(VL)及抗体重链可变区(VH),但并非必须包括两者全部。例如,虽然所谓Fd抗体片段仅由VH域形成,但仍然稍微保持完整的抗体的抗原结合功能。

[0064] 融合蛋白质

[0065] 本发明的融合蛋白质包括一个以上免疫细胞抗原结合域、由两个Fc链形成的Fc域及细胞激素作用域。在本发明中,一个以上免疫细胞抗原结合域是与具有抗肿瘤作用的如CD8+效应T细胞等期望的靶免疫细胞上的表面标记结合并使细胞激素区传递至靶细胞的融合蛋白质的构成成分。在本发明中,免疫细胞抗原结合域较佳为抗PD-1抗体或抗PD-1抗体的抗原结合片段。本发明的融合蛋白质因免疫细胞抗原结合域的存在,可使细胞激素选择性地传递至表达相应靶的肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrated lymphocyte),从而可将对末梢血液的NK细胞或T细胞的影响最小化。另外,所述免疫细胞抗原结合域可为与例如NKG2a、CD8a、FcRL6、CRTAM、LAG3、TIM3、CTLA4、TIGIT等选择性结合的成分、抗体或其抗原结合片段。

[0066] 本发明的融合蛋白质如图1a及图1b所示可具有一个或两个Fab臂。或者如图1c所示,两个Fab臂可针对彼此不同的靶。举例而言,于免疫细胞抗原结合域为一个抗PD-1抗体或抗PD-1抗体的抗原结合片段的情况,可更包括针对选自由NKG2a、CD8a、FcRL6、CRTAM、LAG3、TIM3、CTLA4及TIGIT组成的群组中的一种以上靶的Fab臂。或者本发明的融合蛋白质可更包括将肿瘤细胞作为靶的Fab臂作为抗原结合域。

[0067] 在本发明的一实例中,细胞激素作用域被设计成与T_{reg}细胞相比可优先使细胞毒性T_{eff}细胞活化。在本发明的一实例中,细胞激素作用域包括通过在耗竭的T_{eff}细胞中持久表达的IL-2Rβγ进行的讯号传递活化部分,例如IL-2多肽或IL-15多肽。在本发明的一实例中,细胞激素作用域亦包括IL-2Rα及IL-2,以阻碍由IL-2带来的在末梢血的免疫细胞或内皮细胞中表达的高亲和度IL-2受体(IL-2Rαβγ)结合。被IL-2Rα预先抢占的形态的IL-2无法与高亲和度IL-2受体结合。在本发明的一实例中,细胞激素作用域包括IL-2蛋白质与IL-2Rα蛋白质,且IL-2与IL-2Rα如图1a至图1c所示分别连接至两个Fc链且彼此间不进行共价键结。IL-2与IL-2Rα通过连接子连接至Fc链或直接连接至Fc链。在一实例中,连接子可为肽连接子,例如可为(GGGX)n、(XGGG)nXGG、(GGGGX)n、(GX)n(X=A或S,n=1,2,3或4)、SGGGSGGGSGGGSGG、GGGSGGGSGGGSGG等,但不限定于该些。在一实例中,连接子可为由大约5至20个胺基酸形成的肽连接子,但不限定于此,可使用合适地保持细胞激素作用域的抢占结构并保持将细胞激素作用域传递至靶细胞的功能的一个任意的结构及长度的连接子。在一实例中,所述肽连接子可由选自由G、S、A、P、E、T、D及K组成的群组中的一种以上的胺基酸组成。

[0068] 在本发明的一实例中,细胞激素作用域可包括IL-15与IL-15Rα。图2b是细胞激素作用域包括IL-15与IL-15Rα的复合体的情况的例子。在本发明的一实例中,细胞激素作用

域亦可包括共价键结的IL-2/IL-2α复合体(图2a)或共价键结的IL-15/IL-15α复合体(图2b)。

[0069] 在本发明的一实例中,细胞激素作用域可不包括IL-2及IL-15而仅包括IL-2Rα蛋白质或IL-15Rα蛋白质(图3a至图3d)。在该实例中,IL-2Rα蛋白质与内源性IL-2结合,将IL-2输送至表达靶向的细胞(例:表达PD-1的T细胞),但与始终表达IL-2Rα的T_{reg}细胞相比,优先使表达IL-2Rβ与γ的T_{eff}细胞增殖及活化。在该实例中,IL-2Rα或IL-15Rα可均与两个Fc链结合并形成同二聚体(homodimer),亦可仅与一个Fc链结合并形成异二聚体(heterodimer)。

[0070] 在本发明的一实例中,细胞激素作用域较佳为利用其自身无法进行充分的细胞激素讯号传递,但在与免疫细胞抗原结合域结合的融合蛋白质的形态下选择性地靶向期望的细胞(表达靶的细胞),从而使细胞活化。相比之下,不使表达细胞激素受体但不表达靶的细胞活化或使其活化程度变弱。举例而言,在本发明的一实例中,包括IL-2与IL-2Rα的细胞激素作用域在不表达PD-1的T细胞中与野生型IL-2相比,对IL-2Rβγ受体的结合力弱,且实质上不具有对IL-2Rα受体的结合力。但是,在与抗PD-1抗体结合的融合蛋白质的形态下,在对同时表达PD-1与IL-2Rβγ受体的细胞毒性CD8+T细胞靶向后,通过充分的讯号传递刺激细胞的增殖及活化,从而表现出优异的抗癌活性。但是,对于不表达PD-1的细胞而言,活性弱或几乎没有活性,从而可减少在末梢血液中由细胞激素的活性引起的副作用(例如毛细血管渗漏症候群)、由过度活化的NK细胞引起的全身毒性等。

[0071] IL-2蛋白质

[0072] 在本发明中,除非另有说明,否则“白血球介素-2”、“IL-2”、“IL-2蛋白质”、或“IL-2多肽”包括来自包含哺乳动物(例如灵长类(例:人类))及囓齿类(例:小鼠及大鼠)的脊椎动物的IL-2。此情形不仅包括未加工(unprocessed)的IL-2,而且包括在细胞中经加工的(processing)的任意形态的IL-2。此用语亦包括自然产生的变异体或以下定义的“IL-2突变体”。全长人类IL-2意指成熟的自然长度的人类IL-2,是具有SEQ ID NO:1的133个胺基酸的分子。未加工的人类IL-2更包括在成熟IL-2分子中不存在的20个N-末端胺基酸。

[0073] 用语“IL-2突变体”包括各种形态的IL-2分子的突变形态,所述IL-2分子的突变形态包括全长IL-2、截断形态的IL-2、或IL-2连接至其他分子的形态。IL-2突变体可包括对与IL-2Rα多肽的相互作用造成影响或增加对IL-2Rα多肽的结合的一种以上的胺基酸变形。该突变可包括野生型胺基酸残基的置换、缺失、截断或修饰。可列举以SEQ ID NO:1的胺基酸序列号为基准T37K的胺基酸置换作为增加对IL-2Rα多肽的结合的胺基酸修饰的例子。

[0074] 在本发明中,IL-2蛋白质可为全长人类IL-2(SEQ ID NO:1)。另外,举例而言,为了防止生成不准确的二硫键,可包括将SEQ ID NO:1的IL-2的125号位置的半胱胺酸换成丝胺酸的突变(C125S,SEQ ID NO:2)。另外,为了缩短连接子的长度,亦可为更换IL-2的N-末端与C-末端位置的循环置换的形式(circular permutated form)。

[0075] 在本发明中,“IL-2多肽”包括具有与SEQ ID NO:1的人类IL-2序列序列同一性为约90%以上、约91%以上、约92%以上、约93%以上、约94%以上、约95%以上、约96%以上、约97%以上、约98%以上、约99%以上的胺基酸序列的IL-2蛋白质。

[0076] IL-2Rα蛋白质

[0077] 在本发明中,除非另有说明,否则“IL-2Rα蛋白质”、“IL-2Rα多肽”、“IL-2Rα”、

“CD25”或“白血球介素-2受体α-次单元”意指来自包括哺乳动物(例如灵长类(例:人类))及嚙齿类(例:小鼠及大鼠)的脊椎动物的IL-2受体的α-次单元。该用语不仅包括未加工IL-2Rα,而且包括在细胞内经加工的任意形态的IL-2Rα。该用语亦包括自然产生的变异体或以下定义的“IL-2Rα的突变体”。在本发明中,作为基准的人类IL-2Rα多肽具有由272个胺基酸组成的蛋白质资料库(Universal Protein,UniProt)P01589的22号至272号胺基酸序列(SEQ ID NO:3)。在本发明中,“IL-2Rα多肽”可为具有SEQ ID NO:3的胺基酸序列的IL-2Rα多肽或IL-2Rα多肽的IL-2结合片段、对应于UniProt P01589的22号至240号位置的细胞外域(SEQ ID NO:4)或其一部分、或斯世(Sushi)域。本发明的用语“IL-2Rα多肽的IL-2结合片段”意指作为在IL-2Rα多肽的细胞外域中自C-末端向N-末端方向截断的(truncated)任意长度的片段,将对IL-2Rα多肽的结合配位体、即IL-2的结合活性与原本的完全结合活性相比保持至少90％以上的片段。

[0078] 在本发明中,“IL-2Rα突变体”意指在包括IL-2Rα的细胞外域(SEQ ID NO:4)、截断形态的IL-2Rα、或IL-2Rα连接至其他分子的形态在内的各种形态的IL-2Rα分子中在对与IL-2的相互作用造成影响的一个以上位置处包括突变的IL-2Rα蛋白质。该突变可包括野生型胺基酸残基的置换、缺失、截断或修饰。

[0079] 在本发明中,“IL-2Rα突变体”可将突变包含于IL-Rα的胺基酸序列中,以通过提高IL-Rα与IL-2的亲和度来稳定复合体。在本发明中,IL-2Rα的突变的位置以SEQ ID NO:4的序列为基准。举例而言,本发明的IL-2Rα突变体可在SEQ ID NO:4的IL-2Rα的细胞外域或其截断形态下在L2、M25、N27、S39、L42、L45、N57、I118、H120及K153中的一个以上位置处包括胺基酸置换。在本发明中,IL-2Rα突变体可包括L2D、L2E、L2Q、M25L、M25I、N27A、N27T、N27I、N27Y、S39K、L42F、L42I、L42A、L42V、L45R、N57E、I118R、H120A、H120D、H120K、H120Y、H120L、H120W、H120R及K153G中的一种以上的胺基酸置换。另外,本发明的IL-2Rα突变体可包括F121A、V122A及A114D中的一个以上的突变。

[0080] 在本发明中,例示性的IL-2Rα突变体可为在IL-2Rα的细胞外域的截断形态下具有L42I胺基酸置换的SEQ ID NO:5的突变体,但不限定于此。

[0081] IL-15/IL-15Rα

[0082] IL-15在感染病毒后由包括单核吞噬细胞在内的免疫细胞分泌。IL-15诱导NK细胞与免疫系统的其他细胞的增殖且参与杀死被病毒感染的细胞及癌细胞。IL-15亦与中等亲和度IL-2Rβγ受体结合,但以高得多的亲和度与IL-15Rα受体结合。IL-15Rα与IL-2βγ结合并形成功能性的高亲和度受体αβγ。

[0083] 在本发明中,除非另有说明,否则“白血球介素-15”、“IL-15”、“IL-15蛋白质”、或“IL-15多肽”包括来自包含哺乳动物(例如灵长类(例:人类))及嚙齿类(例:小鼠及大鼠)的脊椎动物的IL-15。在本发明中,IL-15多肽可为具有Uniprot P40933的49号至162号胺基酸序列的人类IL-15多肽(SEQ ID NO:6)或至少一部分保持IL-15的活性的IL-15多肽的变异体。另外,IL-15多肽可包括增加对IL-15Rα多肽的结合的一种以上的胺基酸修饰或进行循环置换(circular permutated)。

[0084] 在本发明中,除非另有说明,否则“IL-15Rα蛋白质”、“IL-15Rα多肽”、“IL-15Rα”、“CD215”或“白血球介素-15受体α”意指来自包括哺乳动物(例如灵长类(例:人类))及嚙齿类(例:小鼠及大鼠)的脊椎动物的IL-15受体的α-次单元。在本发明中,IL-15Rα蛋白质可为

至少一部分保持人类IL-15Rα或IL-15Rα的活性的截断形态或突变体。在本发明中,作为基准的人类IL-15Rα多肽具有UniProt Q13261的31号至267号胺基酸序列(SEQ ID NO:7)。在本发明中,IL-15Rα多肽可为具有SEQ ID NO:7的胺基酸序列的IL-15Rα多肽或IL-15Rα多肽的IL-15结合片段、细胞外(extracellular)域(SEQ ID NO:8)或斯世(Sushi)域,且可包括增加对结合配位体IL-15多肽的结合的一种以上的胺基酸修饰。本发明的用语"IL-15Rα多肽的IL-15结合片段"意指作为在IL-15Rα多肽的细胞外域中自C-末端向N-末端方向截断的(truncated)任意长度的片段,将对IL-15Rα多肽的结合配位体、即IL-15的结合活性与原本的完全结合活性相比保持至少90%以上的片段。

[0085] 抗PD-1抗体或其抗原结合片段

[0086] 在本发明中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段意指可与PD-1、特别是细胞表面表达的PD-1多肽结合的抗体或其抗原结合片段。在一部分实例中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段以KD值10^{-7}M以下结合至PD-1;在一部分实例中,以KD值10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M或10^{-11}M以下结合至PD-1。在一部分实例中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段即便于低pH环境下亦以KD值10^{-9}M以下,较佳为KD值10^{-10}M以下、更佳为KD值10^{-11}M以下结合至PD-1。在一部分实例中,本发明的抗PD-1抗体或其抗原结合片段于pH 6.0下以9×10^{-10}M以下的KD结合至PD-1。

[0087] 在本发明中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,较佳为重链可变区包括:重链互补性决定区1(heavy chain complementarity-determining region 1,HCDR1),包含SEQ ID NO:9的胺基酸序列;HCDR2,包含选自由SEQ ID NO:10至15组成的群组的任一胺基酸序列;以及HCDR3,包含选自由SEQ ID NO:16至31组成的群组的任一胺基酸序列,或者包括与该些序列相比具有保守胺基酸置换或三个以下的胺基酸突变的HCDR变异体;轻链可变区包括:轻链互补性决定区1(light chain complementarity-determining region 1,LCDR1),包含选自由SEQ ID NO:32至35组成的群组的任一胺基酸序列;LCDR2,包含SEQ ID NO:36的胺基酸序列;以及LCDR3,包含SEQ ID NO:37的胺基酸序列,或者包括与该些序列相比具有保守胺基酸置换或三个以下的胺基酸突变的LCDR变异体。

[0088] 在本发明中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,较佳为重链可变区包括包含SEQ ID NO:38、40、42或44的胺基酸序列的重链可变区的CDR1、CDR2及CDR3,或者轻链可变区包括包含SEQ ID NO:39、41、43或45的胺基酸序列的轻链可变区的CDR1、CDR2及CDR3。

[0089] 确定特定的VH区或VL区内的CDR序列的方法在相关领域是已知的,包括卡巴(Kabat)编号系统、柯西亚(Chothia)编号系统、马丁(Martin)编号系统、盖尔范德(Gelfand)编号系统及国际免疫遗传学资讯系统(international immunogenetics information system,IMGT)编号系统等(参照唐德林格(Dondelinger)等人,免疫学前沿(Front.Immunol.)(2018)9:2278等)。根据本发明的较佳实例的抗体或其功能性片段可包括根据卡巴编号系统的CDR序列,但不限定于此。SEQ ID NO:38至45的可变区序列中包括可根据已知的CDR确定方法定义的CDR序列的抗体或其功能性片段全部包括在本发明的范畴内。

[0090] 在本发明中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和/或轻链可变区,较佳为重链可变区包括如由SEQ ID NO:38、40、42或44表示的序列,或者包括与该些序列相比

具有1至10个以下胺基酸突变的变异体;轻链可变区包括如由SEQ ID NO:39、41、43或45表示的序列,或者包括与该些序列相比具有1至10个以下胺基酸突变的变异体。

[0091] 在本发明中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段的重链可变区可具有与SEQ ID NO:38、40、42或44的胺基酸序列序列同一性至少为75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%以上的胺基酸序列。

[0092] 在本发明中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段的轻链可变区可具有与SEQ ID NO:39、41、43或45的胺基酸序列序列同一性至少为75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%以上的胺基酸序列。

[0093] 所谓“保守胺基酸置换”是胺基酸残基被具有具有相似的化学特性(例:电荷或疏水性)的侧链(R基团)的又一胺基酸残基置换。一般而言,保守胺基酸置换实质上不会使蛋白质的功能特性变化。于两个以上的胺基酸序列因保守置换彼此不同的情况下,可向上调整相似率或相似度以对置换的保守性质进行修正。用于进行此种调整的手段为相关领域技术人员所熟知。例如,参照作为参照包含于本案的文献(参照:皮尔逊(Pearson)(1994)分子生物学方法(Methods Mol.Biol.)24:307-331)。具有具有相似的化学特性的侧链的胺基酸基团的例子包括:1)碱性侧链:离胺酸、精胺酸及组胺酸;2)酸性侧链:天冬胺酸及麸胺酸;3)非电荷极性侧链:天冬酰胺酸、麸酰胺酸、丝胺酸、苏胺酸、酪胺酸及半胱胺酸;4)非极性侧链:甘胺酸、丙胺酸、缬胺酸、白胺酸、异白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、色胺酸及甲硫胺酸;5)含硫侧链:半胱胺酸及甲硫胺酸;6)脂肪族侧链:甘胺酸、丙胺酸、缬胺酸、白胺酸、异白胺酸及脯胺酸;7)脂肪族-羟基侧链:丝胺酸及苏胺酸;8)含酰胺侧链:天冬酰胺酸及麸酰胺酸;及9)芳香族侧链:苯丙胺酸、酪胺酸、色胺酸及组胺酸。较佳的保守胺酸置换基团为缬胺酸-白胺酸-异白胺酸、苯丙胺酸-酪胺酸、离胺酸-精胺酸、丙胺酸-缬胺酸、麸胺酸-天冬胺酸及天冬酰胺酸-麸酰胺酸。作为代替方案,保守替代是在作为参照包含于本案的文献(参照:贡内特(Gonnet)等人(1992)科学(Science)256:1443 45)所揭示的可接受点突变(point accepted mutation,PAM)250对数可能性矩阵(log-likelihood matrix)中具有正值的任意变化。“中度(moderately)保守”替代是在PAM250对数可能性矩阵中具有非负的(nonnegative)值的任意变化。在本发明中,限定为特定序列的抗体或其抗原结合片段的范围定义为亦包括具有相应序列的保守置换的序列。

[0094] 在一部分实例中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段可为重组抗体,较佳为鼠类(murine)抗体、嵌合(chimeric)抗体、人源化(humanized)抗体或人类抗体。

[0095] 在一部分实例中,嵌合或人源化抗PD-1抗体的重链恒定区源自人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或该些的突变体序列,轻链恒定区可源自人类k、λ链或其突变体序列。举例而言,重链恒定区为包括S228P突变的人类IgG4重链恒定区(SEQ ID NO:46)且/或轻链恒定区可为人类免疫球蛋白k恒定区链(SEQ ID NO:47)。

[0096] 抗PD-1抗体或其抗原结合片段的一部分实例中,抗体为嵌合抗体,抗体的恒定区(constant region)源自人类抗体的恒定区或其突变体。

[0097] 在抗PD-1抗体或其抗原结合片段的一部分实例中,抗体为人源化抗体,抗体的轻链架构区(framework region,FR)及重链架构区分别源自人类生殖腺(germline)轻链及重链或其突变体序列。

[0098] 在抗PD-1抗体或其抗原结合片段的一部分实例中,抗体为人类抗体,整个序列源

自人类生殖腺轻链及重链或其突变体序列。

[0099] 在本发明中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段亦可源自与人类PD-1(SEQ ID NO:48)结合的已知的抗PD-1抗体。举例而言,可为帕博利珠单抗(pembrolizumab,可瑞达(Keytruda®))、纳武单抗(nivolumab,欧狄沃(Opdivo®))、替雷利珠单抗(tislelizumab)(百济神州及诺华(BeiGene and Novartis))、西米普利单抗(cemiplimab)(利比他欧(Libtayo®),再生元(Regeneron))、多斯利单抗(dostarlimab)(杰姆珀利(Jemperli®),葛兰素史克(Glaxo Smith Kline,GSK))、BCD-100、坎立珠单抗(camrelizumab)、杰诺珠单抗(genolimzumab)、MED10680(AMP-514)、萨善利单抗(sasanlimab)(PF-06801591)、辛替单抗(sintilimab)(IBI-308)、斯巴达珠单抗(spartalizumab)(PDR-001)或STI-A1110、或包括其重链及轻链或包括互补性决定区(CDR)的抗体或其抗原结合片段,或者可为可与和该些抗体相同的抗原决定区结合或和该些抗体竞争的抗体或其抗原结合片段。

[0100] 其他抗原结合域

[0101] 作为抗PD-1抗体之外的其他免疫细胞抗原结合域,可为与例如NKG2a、CD8a、FcRL6、CRTAM(CD355)、LAG3、TIM3、CTLA4、TIGIT等选择性结合的成分、抗体或其抗原结合片段。

[0102] 作为所述其他免疫细胞抗原结合域的例子,具有BMS-986315(抗NKG2a,WO 2020/102501)、莫纳利珠单抗(monalizumab)(抗NKG2a);mAbs OKT8或51.1(抗CD8a抗体,美国专利第10,428,155号,WO 2020/060924)、WO 2019/023148或美国专利第10,072,080号中揭示的抗CD8a抗体;在文献[施瑞德(Shreeder)等人,(2010)免疫学杂志(J.Immunol.)185:23]及[施瑞德(Shreeder)等人,(2008)欧洲免疫学杂志(Eur.J.Immunol.)38:3159]或WO 2019/094743中揭示的抗FcRL6抗体1D8或7B7;WO 2019/086878或WO 2009/029883中揭示的抗CRTAM抗体5A11;瑞拉利单抗(relatlimab)(BMS-986016,抗LAG-3)、US 2011/0150892及WO 2014/008218中揭示的抗LAG-3抗体25F7、26H10、25E3、8B7、11F2或17E5、或US2011/007023中揭示的抗LAG-3抗体IMP731;伊匹单抗(ipilimumab)或曲美木单抗(tremelimumab)(抗CTLA-4);TSR-022、MBG453或LY3321367(抗TIM3);韦博妥单抗(vibostolimab)或替拉格鲁单抗(tiragolumab)(抗TIGIT)等,但不限定于此。

[0103] 本发明的融合蛋白质在免疫细胞抗原结合域之外,更包括将肿瘤细胞作为靶的抗原结合域且可由双特异性作用蛋白质形成。

[0104] Fc区

[0105] 在本发明中,用语“Fc域”或“Fc区”意指在抗体的重链恒定区中包括CH2域及CH3域(或CH2域、CH3域及CH4域)的C-末端区,且以涵盖野生型(wild-type)Fc区及其变异体的含义使用。虽然IgG重链的Fc区的边界可能略有变化,但通常人类IgG重链Fc区可意指自Cys226或Pro230至重链的C-末端的区、或者在所述区中更包括枢纽的区。Fc区中胺基酸残基的编号根据定义人类免疫球蛋白重链内的残基编号的卡巴文献(卡巴等人,免疫学的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第五版,美国国家卫生研究院(National Institutes of Health,NIH)出版社,1991)的亦称为EU索引的EU编号系统。

[0106] 在本发明中,用语“野生型Fc区”包括与自然中发现的免疫球蛋白的Fc区的胺基酸序列一致的胺基酸序列。

[0107] 在本发明中,用语“Fc区的变异体”包括与野生型Fc区不同的一种以上的胺基酸残基,可简称为“Fc变异体”。

[0108] 在本发明中,所述Fc变异体可与作为亲本的野生型Fc区序列具有约80％以上、较佳为约90％以上的相同性。

[0109] 本发明的融合蛋白质包括由第一Fc链及第二Fc链两个链形成的免疫球蛋白的Fc区。举例而言,IgG的Fc域为由两个链形成的二聚体,且各链包括CH2及CH3 IgG重链恒定区。

[0110] 在本发明中,Fc区可为同二聚体(homodimer)或异二聚体(heterodimer)。在Fc区的第一链与第二链连接彼此不同的蛋白质分子(例:IL-2与IL-2Rα)的结构中,为了以高产率获得期望的融合蛋白质分子,重要的是设计成与相同的蛋白质分子连接的Fc链之间不形成键,而与不同的蛋白质分子连接的Fc链之间形成键。因此,较佳为使用将修饰引入Fc区的Fc异二聚体,以可提高同一链间的排斥力及不同链间的结合力。

[0111] 在本发明中,Fc异二聚体由彼此不同的第一Fc链与第二Fc链形成。所述第一Fc链及第二Fc链可形成三级结构,可通过如二硫键等共价键、或氢键、离子键、凡得瓦(Van der Waals)键、如疏水性相互作用等非共价相互作用而彼此相互作用。

[0112] 本发明中的Fc异二聚体为了促进不同的两个链间的结合亦可使用将变异引入CH3区的已知的技术。举例而言,存在使用杵入臼(knob-into-hole,KiH)方式的技术。在所述KiH方式中,在CH3域的疏水性相互作用区中在一侧的链处将分支大小大的胺基酸置换成分支大小小的胺基酸,且在另一侧的链处将小的胺基酸置换成大的胺基酸的变异。例如,如WO 96/27011或文献[瑞奇维(Ridgway),J.B.等人,蛋白质工程(Protein Eng)9(1996)617-621;麦钱特(Merchant),A.M.等人,国家生物科技(Nat Biotechnol)16(1998)677-681]等中记载所示可使用将一个链的T366(以EU编号为基准,以下相同)置换成Y、W的大的残基,且将相反链的Y407、T394、T366等置换成T、A、S等小的残基的形态的异聚多肽(heteromeric polypeptide)。在本发明的一实施态样中,Fc的CH3域可在各CH3的相应位置引入半胱胺酸(C)并进一步变形以可在两个CH3域之间形成二硫交联(KiHs-s)。

[0113] 举例而言,杵(knob)链的CH3域中可包括T366W突变,臼(hole)链的CH3域中可包括T366S、L368A、Y407V突变(以EU编号为基准)。另外,通过将E356C突变或S354C突变引入杵链的CH3域并将Y349C突变引入臼链的CH3域,可在CH3域之间额外形成二硫交联(麦钱特(Merchant),A.M.等人,自然生物技术(Nature Biotech)16(1998)677-681)。例如,本发明中使用的Fc异二聚体可使用KiHs-s。

[0114] 另外,在本发明中,所述杵链及臼链中的任一链更包括K360E的胺基酸置换,另一链更包括Q347R的胺基酸置换,或者任一链更包括K360E及Q347E的胺基酸置换,另一链可更包括Q347R的胺基酸置换或K360R及Q347R的胺基酸置换。

[0115] 本发明中使用的较佳的Fc异二聚体包括第一Fc链及第二Fc链,所述第一Fc链包括T366处的胺基酸置换,所述第二Fc链包括T366、L368及Y407中一个以上处的胺基酸置换,所述第一Fc链及第二Fc链中的一个链更包括K360处的胺基酸置换,另一链更包括Q347处的胺基酸置换。另外,所述第一Fc链及第二Fc链中包括K360处的胺基酸置换的链更包括Q347处的胺基酸置换且(或者)包括Q347处的胺基酸置换的另一链可更包括K360处的胺基酸置换。

[0116] 在本发明中,较佳为Fc异二聚体中,

[0117] (A1)所述第一Fc链包括T366W及K360E的胺基酸置换,所述第二Fc链包括T366S、

L368A、Y407V及Q347R的胺基酸置换,或者

[0118] (A2)所述第一Fc链包括T366W及Q347R的胺基酸置换,所述第二Fc链包括T366S、L368A、Y407V及K360E的胺基酸置换,或者

[0119] (A3)所述第一Fc链包括T366W、K360R及Q347R的胺基酸置换,所述第二Fc链包括T366S、L368A、Y407V、K360E及Q347E的胺基酸置换,或者

[0120] (A4)所述第一Fc链包括T366W、K360E及Q347E的胺基酸置换,所述第二Fc链可包括T366S、L368A、Y407V、K360R及Q347R的胺基酸置换。

[0121] 另外,在本发明中,Fc域可源自人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其突变体序列,且可更包括用于改变Fc域的结构稳定化或对Fc受体的结合亲和性的其他突变。举例而言,于Fc区源自IgG4的情况,可更包括S228P突变。S228P突变使在两个IgG4抗体之间在Fab区中发生交换的Fab臂交换减少。举例而言,于Fc区来自IgG的情况,为了减少效应器(effector)功能(以EU编号为基准),可在选自E233、L234、L235、G236、G237、N297、L328、P329及P331中的位置包括胺基酸置换。举例而言,Fc区可在选自由L234、L235及P329组成的群组的位置包括胺基酸置换。或者Fc区可包括L234A及L235A的胺基酸置换,或者包括L234A、L235A及P329G的胺基酸置换。另外,在本发明中,Fc区可能缺少CH2域。

[0122] 本发明中使用的例示性Fc链的胺基酸序列如SEQ ID NO:49及SEQ ID NO:50所示。

[0123] 融合蛋白质的制造方法

[0124] 本发明的融合蛋白质可通过使包括对融合蛋白质进行编码的多核苷酸序列的表达载体在宿主细胞中表达来获得。

[0125] 在本发明中,用语“多核苷酸”意指由单股或双股形态的脱氧核苷酸(deoxyribonucleotide)或核糖核苷酸(ribonucleotide)组成的分离的核酸分子或结构,例如讯息核糖核酸(messenger ribonucleic acid,mRNA)、质体(plasmid)脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid,DNA)、病毒衍生的RNA。所述多核苷酸可通过根据本发明的融合蛋白质构成或改变形成融合蛋白质的各域的野生型序列来生成,且可更包括本发明的融合蛋白质的表达所需的要素(例如,讯号肽)。另外,可通过聚合酶连锁反应(polymerase chain reaction,PCR)聚合反应合成对本发明的融合蛋白质的整个胺基酸序列进行编码的多核苷酸序列来使用。

[0126] 在本发明的一实例中,于本发明的融合蛋白质采取异二聚体结构的情况,所述表达载体可包括第一表达载体及第二表达载体,所述第一表达载体包括对连接IL-2的第一单体链的胺基酸序列进行编码的多核苷酸序列,所述第二表达载体包括对连接IL-2Rα的第二单体链的胺基酸序列进行编码的多核苷酸序列。在本发明的例示性实施态样中,所述第一表达载体包括对SEQ ID NO:51及SEQ ID NO:57的胺基酸序列进行编码的多核苷酸序列,第二表达载体包括对SEQ ID NO:51及SEQ ID NO:58的胺基酸序列进行编码的多核苷酸序列。

[0127] 在本发明的一实例中,本发明的融合蛋白质在使所述第一表达载体及所述第二表达载体分别各别地在宿主细胞中表达后混合获得的蛋白质来制造,或者使所述第一表达载体及所述第二表达载体在同一宿主细胞中同时表达而在单个细胞中制造。较佳为,本发明的融合蛋白质在单个细胞中制造。

[0128] 治疗性施药及剂型

[0129] 在一方面,本发明提供根据本发明的融合蛋白质及包括在药学上可允许的赋形

剂、载体的药学组成物。所述药学组成物可在例如肿瘤、癌症、转移性肿瘤或转移性癌症的治疗中用作免疫治疗剂。所述药学组成物亦可用于治疗感染性疾病。

[0130] 在一方面,本发明提供在所述药学组成物中更包括第二治疗剂的药学组成物。在一实施态样中,第二治疗剂为增强细胞对免疫调节剂、细胞生长抑制剂、细胞附着抑制剂、细胞毒性剂、细胞死亡活性剂或细胞死亡诱导剂的敏感性的作用剂。在特定的实施态样中,所述额外的治疗剂可为抗癌剂,例如微管崩解剂、代谢拮抗物质、拓扑异构酶(topoisomerase)抑制剂、DNA插入剂、烷基化剂、激素疗法、激酶抑制剂、受体拮抗物质、肿瘤细胞细胞死亡活性剂、或血管形成抑制剂。

[0131] 在本发明中,肿瘤、癌症、转移性肿瘤或转移性癌症可为非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、肾癌、肝癌、骨癌、皮肤癌、结肠癌、直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、间皮瘤、黑色素瘤、头颈癌、甲状腺癌、肉瘤、前列腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈状肉芽肿瘤、默克尔(Merkel)细胞癌及经典霍奇金淋巴瘤(classic hodgkin's lymphoma,CHL)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、T细胞/组织细胞丰富的B细胞淋巴瘤、人类疱疹病毒(Epstein-Barr virus,EBV)-阳性及-阴性移植后淋巴增生性疾病(post transplant lymphoproliferative disorder,PTLD)、或EBV-相关的弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma,DLBCL)、浆母细胞淋巴瘤、外源性NK/T细胞淋巴瘤、鼻咽癌、或人类疱疹病毒8(human herpes virus 8,HHV8)-相关的原发性渗出性淋巴瘤、包括霍奇金淋巴瘤的其他血癌、包括原发性中枢神经系统(central nervous system,CNS)淋巴瘤、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤的中枢神经系统的新生物,且不限定于此。

[0132] 在本发明中,感染性疾病可为选自包含如下的慢性病毒感染的疾病:B型肝炎、C型肝炎的病毒感染、疱疹病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、人类免疫缺乏病毒(human immunodeficiency virus,HIV)、巨细胞病毒(cytomegalovirus)、单纯疱疹病毒I型、单纯疱疹病毒2型、人乳头瘤病毒、腺病毒(adenovirus)、与疱疹病毒传染相关的卡波西氏(Kaposi)肉瘤、细环病毒(托克泰诺病毒(Torque teno virus))、JC病毒或BK病毒感染,且不限定于此。

[0133] 根据本发明的药学组成物可用于治疗癌症的早期阶段或后期阶段症状。在一态样中,根据本发明的药学组成物可用于治疗转移癌症。根据本发明的药学组成物在减少或抑制或收缩固体肿瘤及血癌(blood cancer)两者的肿瘤生长方面有用。在特定态样中,根据本发明的药学组成物的处理在受试者中引起减少肿瘤的50%以上、减少60%以上、减少70%以上、减少80%以上、减少90%以上。在特定态样中,所述药学组成物可用于预防肿瘤的复发。在特定态样中,所述药学组成物在患有癌症的受试者中在延长整体存活方面有用。在一部分态样中,所述药学性组成物在患有癌症的患者中在保持长时间存活并减少化学疗法或放射线疗法带来的毒性方面有用。

[0134] 在本发明的又一态样中,根据本发明的药学组成物可与在治疗癌症中有用的对相关领域技术人员而言已知的任意其他制剂或任意其他疗法一同用作辅助疗法。

[0135] 根据本发明的药学组成物可与包含于剂型内的其他制剂一同施用,以提供适合的载体、赋形剂、及经提高的搬运、传递、耐受性等。多个适当的剂型可在对所有制药化学家(pharmaceutical chemist)而言已知的处方集(参照:雷明顿制药科学(Remington'

sPharmaceutical Sciences),麦克出版公司(Mack Publishing Company),伊斯顿(Easton),宾夕法尼亚州(PA))中进行确认。该些剂型包括:例如,粉末、浆(paste)、软膏、凝胶、蜡、油、液体、含有囊泡(vesicle)的液体(阳离子或阴离子)(例:转染试剂(LIPOFECTIN™))、DNA偶联物、无水吸收浆、水包油及油包水乳液、乳液卡波蜡(多种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶、及含有卡波蜡的半固体混合物(参照:鲍威尔(Powell)等人"肠胃外制剂赋形剂纲要(Compendium of excipients for parenteral formulations)"PDA医药科技杂志(PDA J Pharm Sci Technol)(1998)52:238-311)。

[0136] 融合蛋白质的用量可根据要施用的受试者的年龄及体重、靶向疾病、病情、施用途径等是可变的。本发明的融合蛋白质经过一次或一系列的治疗以适合的方式施用给患者。融合蛋白质的初期预备施用量根据疾病的类型及重症度可为约1微克/千克至15毫克/千克(例如0.1毫克/千克至10毫克/千克),无论是一次以上的分开施用还是连续注入。典型的一日施用量根据所述提及的因数可为约1微克/千克至100毫克/千克或100毫克/千克以上的范围。经过数日以上重复施用,根据患者的状态,通常可持续至出现期望程度的疾病症状抑制为止。例示性的施用量可为约0.005毫克/千克至约10毫克/千克。在另一非限制性例子中,用量亦可包括每次施用约1微克/千克、约5微克/千克、约10微克/千克、约50微克/千克、约100微克/千克、约200微克/千克、约350微克/千克、约500微克/千克、约1毫克/千克、约5毫克/千克、约10毫克/千克、约50毫克/千克、约100毫克/千克、约200毫克/千克、约350毫克/千克、约500毫克/千克至约1000毫克/千克以上及所述中可推导出的任意范围。因此,可对所述患者施用约0.5毫克/千克、2.0毫克/千克、5.0毫克/千克或10毫克/千克(或该些的任意组合)的一次以上的用量。可间歇性地、例如每周或每三周施用如上所述的用量(例如使所述患者接受约2次至约20次、或例如约6次用量的所述融合蛋白质)。继初期的较高负荷用量之后,亦可施用一次以上的较低用量。

[0137] 本发明的药学组成物可利用多种传递系统例如脂质体内胶囊化、微粒、微胶囊、可表达突变病毒的重组细胞、受体传播的内吞作用(endocytosis)来施用(参照:例如,吴等人(1987)生物化学杂志(J.Biol.Chem.)262:4429-4432)。导入方法包括皮内、经皮、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻腔内、硬膜外及口服途径,但不限定于此。所述组成物可通过任意通常的途径、例如通过注入或单次快速(bolus)注射、通过上皮或黏膜皮肤内层(lining)(例:口腔黏膜、直肠及肠黏膜等)的吸收来施用,且可与其他生物学活性剂一同施用。施用可为全身施用或局部施用。

[0138] 本发明的药学组成物亦可通过囊泡、特别是脂质体传递(参照:例如,兰格(Langer)(1990)科学249:1527-1533)。亦可考虑使用传递本发明的融合蛋白质的奈米粒子。抗体偶联的奈米粒子可用于治疗及诊断用途两者全部。抗体偶联的奈米粒子及制备方法及用途详细记载于作为参照包括在本案中的文献(参照:阿鲁埃博(Arruebo,M.)等人2009,在奈米材料杂志(J.Nanomat)合订本(Volume)2009中的"用于生物医学应用的抗体偶联奈米粒子(Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications)",论文(Article)ID 439389,第24页,doi:10.1155/2009/439389)。开发奈米粒子并与药学组成物所含有的抗体偶联,从而可对肿瘤细胞或自身免疫组织细胞或病毒感染的细胞进行靶向化。用于药物传递的奈米粒子亦记载于例如各全文包含于本案的US 8257740或US 8246995中。

[0139] 在特定状况下,本发明的药学组成物可利用受控制的释放系统传递。在一态样中,可使用帮浦。在又一态样中,可使用聚合物性物质。在又一态样中,受控制的释放系统可配置于组成物的靶附近,且仅需要全身用量的一部分。可注射的制剂可包括用于进行静脉内、皮下、皮内、颅内、腹膜内及肌肉内注射、滴注(drip infusion)等的施用型。该些可注射的制剂可利用正式已知的方法来制备。可注射的制剂可通过例如使所述记载的抗体或其盐溶解或悬浮或乳化于灭菌水溶性培养基或通常用于注射的油性培养基中来制备。作为注射用水溶性培养基,具有可与适当的增溶剂等一同使用的例如生理盐水、含有葡萄糖的等张溶液及其他辅助剂等,所述增溶剂例如醇(例:乙醇)、多元醇(例:丙二醇、聚乙二醇)、非离子性界面活性剂[例:聚山梨醇酯80、氢化蓖麻油的HCO-50(聚氧乙烯(50摩尔)添加物)]。作为油性培养基,可利用可与例如苯甲酸苄酯、苯甲醇等增溶剂一同使用的例如芝麻油、大豆油等。因此,制备的注射液较佳为装入适当的安瓿中。

[0140] 本发明的药学组成物可通过标准针(standard needle)及注射器传递至皮下或静脉内。另外,对于皮下传递,笔传递装置(pen delivery device)容易用于传递本发明的药学组成物。此种笔传递装置可重复使用或可为一次性的。可重复使用的笔传递装置一般使用含有药学组成物的可替换药筒(cartridge)。若施用药筒内的所有药学组成物,使药筒变空,则空的药筒容易废弃并可替换为含有药学组成物的新的药筒。笔传递装置之后可重复使用。于一次性笔传递装置中,没有可替换的药筒。相反,一次性笔传递装置中预先填充有收容于所述装置内的存放处的药学组成物。若所述存放处中药学组成物耗尽,则将整个装置废弃。多个可重复使用的笔及自动注射器(autoinjector)传递装置用于本发明的药学组成物的皮下传递。

[0141] 有利地,用于所述记载的口服或非口服使用的药学组成物被制备成适于匹配活性成分的用量的单位用量的施用型。此种单位用量的施用型包括例如片剂、丸药、胶囊、注射液(安瓿)、栓剂等。含有的融合蛋白质的量一般每单位用量、特别是注射形态的施用型为约5毫克至约500毫克,且较佳为含有约5毫克至约100毫克的抗体及相对于其他施用型含有约10毫克至约250毫克的抗体。

[0142] 本发明亦提供在个体中预防、改善或治疗肿瘤、癌症、转移性肿瘤、转移性癌症或感染性疾病的方法,所述方法包括对需要预防、改善或治疗肿瘤、癌症、转移性肿瘤、转移性癌症或感染性疾病的所述个体施用本发明的融合蛋白质。

[0143] 实施例

[0144] 以下,通过实施例对本发明更详细地进行说明。该些实施例仅是为了更具体地对本发明进行说明作为例示提供的,本发明的权利范围并非限定于该些实施例。对相关领域技术人员不言而喻的是可在本发明的权利范围内对实施例进行各种变形。

[0145] 本案中使用的分子生物学试剂根据制造商的指示使用。重组DNA技术如文献[萨姆布鲁克(Sambrook)等人,分子克隆:实验室手册,美国冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),冷泉港(Cold Spring Harbor),纽约,1991]中记载所示,使用标准方法来实施。针对免疫球蛋白分子或抗体分子特定的胺基酸残基的编号表示为以由文献[卡巴等人,免疫学蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第五版,NIH出版社,1991]得出的EU索引为基准自N-末端开始的胺基酸位置。

[0146] 实施例1.细胞激素融合蛋白质的制造

[0147] 实施例1.1融合蛋白质的结构设计

[0148] 为了增加肿瘤特异性耗竭的效应T细胞(exhausted T_{eff})的特异性活性,重要的是将特异性地诱导T_{eff}细胞的增殖和/或活化的细胞激素选择性地传递至肿瘤内的T_{eff}细胞。为此,将细胞激素融合蛋白质的结构设计成将促进T_{eff}细胞的增殖和/或活化的细胞激素与T_{eff}细胞靶向域彼此连接,并以“顺式(in-cis)”在T_{eff}细胞中起作用。作为可诱导T_{eff}细胞的增殖和/或活化的细胞激素,考虑通过在T_{eff}细胞中表达的白血球介素-2受体的βγ-次单元(IL-2Rβγ)传递讯号的白血球介素-2(以下简称为IL-2或IL2)及白血球介素-15(以下简称为IL-15或IL15),且作为一实施态样选择IL-2。将IL-2作为T_{eff}细胞靶向域,使其连接至抗PD-1免疫抗癌抗体的Fc,从而构成双功能性融合蛋白质。

[0149] 已知存在于血液中的免疫蛋白质、即IL-2等细胞激素在包括免疫细胞在内的各种细胞中,对细胞内讯号传递起到重要的作用。因此,需要增加选择性的策略以减少由外源性细胞激素引起的毒性或副作用的问题同时仅对肿瘤内的T_{eff}细胞起特异性作用。

[0150] 本发明人通过将IL-2连接至抗PD-1抗体的第一Fc链的C-末端,另一方面将IL-2受体的α-次单元(IL-2Rα或CD25)连接至第二Fc链的C-末端,通过诱导分别连接至抗PD-1抗体的第一Fc链及第二Fc链末端的IL-2与IL-2Rα之间的相互作用,从而构成IL-2被IL-2Rα抢占的形态。所述IL-2蛋白质及IL-2Rα蛋白质分别仅与抗PD-1抗体的Fc末端连接,而在IL-2与IL-2Rα彼此间不以共价键连接(参照图1)。

[0151] 于图1至图3示出本发明的“顺式”融合蛋白质的例示性结构。如图2所示,在通过连接子将IL-2与IL-2Rα共价键结形成复合体后,亦可达成通过IL-2及IL-2Rα中的任一侧将所述细胞激素复合体连接至抗PD-1抗体的Fc的结构。另外,作为可解决由外源性细胞激素引起的毒性或副作用问题的方案,亦研究出仅将IL-2Rα或IL-15Rα作为细胞激素作用域连接至抗PD-1抗体以使得可使用内源性细胞激素的融合蛋白质的结构。

[0152] 在本发明人设计的结构中,由于IL-2被IL-2Rα抢占,因此对表达IL-2受体的α-次单元、β-次单元(IL-2Rβ或CD122)及γ-次单元(IL-2Rγ或CD132)均表达的高亲和度IL-2受体(或简称为IL-2Rαβγ)的调节T细胞(T_{reg})、Foxp3-负CD4 T细胞、一部分先天性淋巴细胞或其他内皮(endothelial)细胞的结合力弱化,相比之下,可与表达由IL-2Rβ及IL-2Rγ组成而不具有IL-2Rα的中等亲和度IL-2受体(或简称为IL-2Rβγ)的细胞毒性CD8+T细胞、记忆T细胞、NK-T细胞等T_{eff}细胞进一步特异性结合。

[0153] 实施例1.2融合蛋白质的序列构成及表达载体的制作

[0154] 抗PD-1结合域

[0155] 本发明人使用在之前研究中开发的人源化抗PD-1抗体1G1-h70的Fab域作为抗PD-1结合域。本研究中使用的抗PD-1 1G1-h70的Fab域胺基酸序列如下所示。

[0156] 轻链VL-CL(SEQ ID NO:51)

[0157] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSQGDTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(下划线部分表示轻链可变区。)

[0158] 重链VH-CH1(SEQ ID NO:52)

[0159] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRV

TMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV(下划线部分表示重链可变区。)

[0160] 连接子设计

[0161] 以连接至抗PD-1免疫抗癌抗体的二聚体Fc域的各链末端的形态保持IL-2/IL-2Rα之间的相互作用,同时,亦为了分析所述IL-2用于与细胞表面表达的IL-2Rβγ结合的结构,进行结晶结构分析,以在Fc域的C-末端与IL-2及IL-2Rα各自的N-末端之间的连接部位确定合适的长度。

[0162] 在人类PD-1(hPD-1)/1G1-h70的Fab域结晶结构迭加已知的抗PD-1抗体、即可瑞达(Keytruda)的整体结晶结构,以模拟抗PD-1抗体与hPD-1结合的方式。将抗PD-1抗体的Fc域的C-末端定位为最接近IL-2及IL-2Rα各自的N-末端而不与IL-2四级复合物碰撞,之后对自Fc域的C-末端至IL-2及IL-2Rα各自的N-末端的距离进行测定。因此,将Fc域的C-末端与IL-2及IL-2Rα各自的N-末端之间的连接部位的长度分别确定为59.2A及53.6A(图4)。通过基于此种结构的制模,设计适当长度的连接子以分别将IL-2及IL-2Rα连接至抗PD-1抗体的Fc末端。

[0163] 经改善的异二聚体(heterodimeric)Fc区

[0164] 为了提高本发明的融合蛋白质的制造产率,利用异二聚体Fc制作抗PD-1抗体的Fc区,以使IL-2连接的Fc链与IL-2Rα连接的Fc链之间的异二聚体结合与具有相同序列的Fc链间的同二聚体结合相比占优势。为此,将杵入臼(knob-into-hole,KiH)变异与电荷/疏水性胺基酸变异一同导入至Fc区。

[0165] 在第一Fc链(SEQ ID NO:49)中包括T366W及Q347R的胺基酸置换,且在第二Fc链(SEQ ID NO:50)中包括T366S、L368A、Y407V及K360E的胺基酸置换。该些异二聚体Fc变异体将异二聚体融合蛋白质的制造产率明显提高至约90%以上。

[0166] IL-2Rα的高亲和度变异体

[0167] 为了增强IL-2与IL-2Rα的结合力,使用高亲和度IL-2Rα变异体。将IL-2Rα蛋白质的42号位置的白胺酸胺基酸置换成异白胺酸的IL-2RαL42I变异体(SEQ ID NO:5)与野生型IL-2Rα相比可以进一步提高的亲和度(KD)值与IL-2结合。下表1示出使用对蛋白质间相互作用进行即时观察的表面电浆子共振(surface plasmon resonance,SPR)比亚科(Biacore)8K测定的结合亲和度与动力学(Kinetics)。

[0168] [表1]

[0169]

配位体	稳定状态亲和力K_D(M)	结合k_a(1/Ms)	k_d(1/s)	K_D(M)
野生型IL-2Rα	2.83E-8	1.95E+7	2.16E-1	1.11E-8
IL-2Rα L42I	1.98E-8	1.08E+7	4.70E-2	**4.36E-9**

[0170] 表达载体的制作

[0171] 基于表达人类IgG4恒定区(S228P)(SEQ ID NO:46及SEQ ID NO:47)的pTRIOZ_hIgG4(S228P)(因威沃根(InvivoGen))以使IL-2C125S(SEQ ID NO:2)或CD25 L42I(SEQ ID NO:5)基因进入Fc区的C-末端的方式制作表达载体。IL-2的C125S变异如在FDA批准的IL-2产品、即普留净(阿地白介素)中所示是为了防止大肠杆菌(Escherichia Coli,E.coli)中的半胱胺酸错误配对(mispairing)而引入的,不会影响生物学活性(参照王A等人,人类白

细胞介素-2基因的定点突变:半胱胺酸残基的结构功能分析(Site-specific mutagenesis of the human interleukin-2gene:structure-function analysis of the cysteine residues),科学(Science),224:1431-1433,1984)。本案中,用语"野生型IL-2"不仅包括天然或重组人类IL-2,而且包括以在使具有C125S变异的IL-2或阿地白介素、或天然人类IL-2的结合特性不变形的同时具有新的N-末端及C-末端的变形的循环置换形式的IL-2全部。作为循环置换IL-2的非限制性例子,具有利用连接子连接现有的N-末端部(Ser4)与C-末端部(Thr133),并进行截断以形成新的N-末端部(Ser75)与C-末端部(Gln74),IL-2螺旋(helix)以C-D-A-B的顺序连接等。

[0172] 在所述表达载体的重链恒定区与轻链恒定区前包括老鼠免疫球蛋白讯号肽来制作各自的可变区。基本上根据载体制造商的指示事项制作载体。利用交迭PCR(overlapping PCR)连接讯号肽与抗体的VH或VL序列并置于pTRIOZ_hIgG4(S228P)载体中。于VH序列的情况,使用Mlu I/Nhe I限制酶切断载体后插入,且于VL序列的情况,使用Asc I/BsiW I限制酶切断载体后插入。

[0173] 此时,第一链(杵(Knob))表达载体以在Fc区中诱发T366W及Q347R突变的方式改变核苷酸序列来制作,且第二链(臼(Hole))表达载体利用PCR技法制作在Fc区中诱发T366S、L368A、Y407V及K360E突变的核苷酸序列。

[0174] 第一链(杵(Knob))表达载体在利用Avr II限制酶切断C-末端部分后,利用PCR技法扩增IL-2C125S基因以包括15个长度的胺基酸连接子,之后利用NE建造师HiFi DNA组装试剂盒(NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit)来制作。第二链(臼(Hole))表达载体在利用Avr II限制酶切断C-末端部分后,利用PCR技法扩增CD25 L42I基因以包括20个胺基酸连接子,之后利用NE建造师HiFi DNA组装试剂盒来制作。此时使用的引体如下表所示。

[0175]

	引体	序列	Tm
IL-2 C125S	正向	CCCTCTCCCCCGGCAAGTCAGGAGGTGGATCTGGTGGAG (序列 ID 编号 53)	53
	反向	GCCCGAATTCGGCGGCCGCTTTATCAGGTCAGCGTAGAGATG (序列 ID 编号 54)	54
CD25 L42I	正向	*Tctccctgtctccgggtaaaggaggtggaggttctggtggaggtggatctggt ggaggaggttctggtggaggtggatctGAGCTGTGTGATGATGATC* (序列 ID 编号 55)	59.9
	反向	gtcattggggaaacctgctcctaggTTTAGCCGGTACAGATCAG (序列 ID 编号 56)	60.9

[0176] 各表达载体编码的胺基酸序列如下所示。

[0177] 轻链:VL-CL(SEQ ID NO:51)

[0178] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSQGDTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0179] 重链1_杵_具有_IL2C125S:VH-CH1-枢纽(Hinge)-CH2-CH3-连接子(Linker)-IL2C125S(SEQ ID NO:57)

[0180] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSD TTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV*ESKYGPPCPPCP*APEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPPSQEEMTKNQV SL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*SGGGSGGGSGGGSGG***APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ** **MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFH LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF*S*QSIISTLT**

[0181] 重链2_臼_具有_CD25L42I:VH-CH1-枢纽(Hinge)-CH2-CH3-连接子(Linker)-CD25L42I(SEQ ID NO:58)

[0182] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSD TTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV*ESKYGPPCPPCP*APEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT**E**NQV

[0183] SL**S**CA**V**KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL**V**SRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS***ELCDDDPPEIPHATFKA** **MAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGS*I*YMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVT PQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQ CVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG**

[0184] 实施例1.3融合蛋白质的表达及纯化(融合蛋白质A)

[0185] 将实施例1.2中记载的第一链(杵)表达载体(连接IL2C125S的第一重链及轻链表达)与第二链(臼)表达载体(连接CD25L42I的第二重链及轻链表达)一同在艾斯匹科(ExpiCHO™)细胞进行转染(Transfection),以暂时表达各蛋白质。

[0186] 所述转染在初期细胞密度为6×10^6细胞/毫升及表达载体浓度为0.8微克DNA/毫升的条件下进行,在此过程中根据制造商指南使用艾斯匹科(ExpiCHO™)表达媒介(Expression Medium)、OptiPRO™SFM及艾斯匹弗他明(ExpiFectamine™)转染试剂盒(吉比科(Gibco))。

[0187] 在将经过转染过程的细胞在二氧化碳培养箱中培养至细胞生存率75%后,通过离心分离分离成含有各蛋白质的细胞培养液与细胞。

[0188] 为了将目标蛋白质自包含各个重组蛋白质的培养液分离,实施使用海莱普(HiTrap)MabselectXtra(思拓凡(Cytiva))柱的亲和层析法(affinity chromatography)。

[0189] 具体而言,在利用AKTA先锋(avant)25快速蛋白液相层析(fast protein liquid chromatography,FPLC)进行纯化,利用磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline,PBS)(3毫摩尔/升Na_2HPO_4,1.1毫摩尔/升KH_2PO_4,0.16摩尔/升NaCl,pH 7.2)使海莱普MabselectXtra柱平衡后,利用0.22微米过滤器对通过离心分离获得的培养液进行过滤并加入。在与培养液反应结束后,利用PBS(5CV~10CV),50毫摩尔/升NaOAc pH 5.2(5CV~10CV)依序对柱进行清洗,之后利用洗脱缓冲液(0.1摩尔/升甘胺酸pH 3.0)洗脱蛋白质。向

洗脱的蛋白质添加3摩尔/升NaOAc pH 5.2缓冲液以使最终浓度达到50毫摩尔/升～100毫摩尔/升后,通过离心分离一起去除提取的色素。在去除色素后,利用阿米康管(Amicon tube)(截留分子量(molecular weight cut off,MWCO):50K)进行浓缩并利用丙烯腈-丁二烯-苯乙烯(acrylonitrile butadiene styrene,ABS)(0.1摩尔/升NaOAc,0.15摩尔/升NaCl,pH 5.2)或PBS进行缓冲液替换。

[0190] 为了确认生成融合蛋白质,分别在6%及10%丙烯酰胺-双丙烯酰胺(29:1)凝胶中执行非还原及还原条件的SDS-PAGE,并利用考马斯蓝(瞬蓝(InstantBlue)考马斯蛋白质染色剂(艾博抗(Abcam),ab119211))进行染色。图5是确认经纯化的融合蛋白质(融合蛋白质A)的SDS-PAGE结果。确认融合蛋白质A为IL-2与IL-2Rα分别连接至抗PD-1抗体的Fc区且具有两个抗PD-1Fab臂的形态(图1a)的异二聚体结构且可以高产率制造。

[0191] 实施例2.各种融合蛋白质设计及制造

[0192] 实施例2.1具有一个抗PD-1Fab臂的融合蛋白质的制造(融合蛋白质B,图1b)

[0193] 利用与实施例1中相同的方法进行结构设计及载体的制作,使用实施例1的表达载体作为一级载体,此时使用PCR自重链第一链(杵)载体去除VH-CH1部分来使用。融合蛋白质B中重链第一链(杵)载体编码的胺基酸序列如下所示。

[0194] Fc_杵_具有_IL2C125S:枢纽-CH2-CH3-连接子-IL2C125S(SEQ ID NO:59)

*KYGPPCPPCP*APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREP**R**VYTLPPSQEEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD

[0195] GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*SGGGSGGGSGGGSGG*
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF
LNRWITF*S*QSIISTLT

[0196] 作为最终表达载体,使用以自pcDNA3.1包括三个多克隆位点(multiple cloning sites,MCS)的方式构成的自身制作载体、即pG3.1。各MCS均具有相同的启动子(巨细胞病毒(cytomegalovirus,CMV))、增强子(CMV)及加尾讯号(polyadenylation signal,Poly A signal)(牛生长激素(bovine growth hormone,BGH))。在三个MCS中分别放入一级载体中克隆的轻链、重链第一链(杵)及重链第二链(臼)基因来制作表达载体。在艾斯匹科(ExpiCHO™)细胞中将所述表达载体转染,利用与实施例1中相同的方法表达各蛋白质,并利用与实施例1相同的方法对目标蛋白质进行分离、纯化。

[0197] 实施例2.2不包括IL-2而包括一个IL-2Rα蛋白质的异二聚体融合蛋白质的制造(融合蛋白质C,图3c)

[0198] 利用与实施例2.1中相同的方法进行结构设计、载体的制作以及蛋白质的表达及纯化,但使用未将IL-2C125S基因连接至重链第一链(杵)载体的C-末端者。轻链及重链第二链(臼)与实施例1中相同,重链第一链(杵)的胺基酸序列如下所示。

[0199] 重链1_杵_不具有_IL2C125S:VH-CH1-枢纽-CH2-CH3(SEQ ID NO:60)

[0200] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSD TTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV*ESKYGPPCPPCP*APEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPPSQEEMTKNQV SL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0201] 实施例2.3不包括IL-2而包括两个IL-2Rα蛋白质的同二聚体融合蛋白质的制造(融合蛋白质D,图3a)

[0202] 利用与实施例1中相同的方法进行结构设计、表达载体的制作及蛋白质的表达及纯化,但利用实施例1的表达载体制作仅将CD25 L42I(SEQ ID NO:5)基因连接至Fc区的C-末端而不具有用于提高异二聚体制造产率的Fc区的变异的同二聚体形态的融合蛋白质D。融合蛋白质D的轻链胺基酸序列与实施例1中相同(SEQ ID NO:51),重链胺基酸序列如下所示。

[0203] 重链_具有_CD25L42I:VH-CH1-枢纽-CH2-CH3-连接子-CD25L42I(SEQ ID NO:61)

[0204] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSD TTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV*ESKYGPPCPPCP*APEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS***ELCDDDPPEIPHATFKA** **MAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGS/YMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVT** **PQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQ** **CVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG**

[0205] 为了确认在实施例2.1至实施例2.3中制造、纯化的融合蛋白质,在4%～15% TGX预制胶(伯乐(Biorad),BR4561086)中执行SDS-PAGE,将其结果示出于图6。

[0206] 实施例3.对IL-2受体蛋白质的结合选择性分析

[0207] 为了确认由本发明的融合蛋白质的IL-2/IL-2Rα异二聚体Fc区引起的与IL-2受体的结合选择性,执行分别对IL-2Rα及IL-2Rβγ的结合ELISA。向96孔板(赛默飞世尔科技(ThermoFisher scientific))分别注入100微升/孔的IL-2Rα-His(百普赛斯(Acrobiosystems))及IL-2Rβγ-His(百普赛斯),密封后在4℃下彻夜涂布。在阻断及清洗后,将融合蛋白质A与对照组抗体(Fc-IL2,自身制作)稀释至0至1000奈摩尔/升浓度并分别注入100微升/孔,在室温下孵化两小时。在清洗后,添加二级抗体(辣根过氧化物酶(Horse Radish Peroxidase,HRP)-结合抗-His抗体),在室温下避光孵化30分钟。在清洗后,添加四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine,TMB)基质溶液(艾博抗),利用终止液(艾博抗)终止显色反应。使用微盘读取仪(microplate reader)(赛默飞世尔(ThermoFisher))测定于450奈米下的吸亮度。

[0208] 将结果分别示出于图7a及图7b。融合蛋白质A未显示出对IL-2Rα蛋白质的结合力

(图7a),相比之下,对于IL-2Rβγ蛋白质,展示出与野生型IL-2相比略弱但优异的结合力(图7b)。该情形表现出本发明的融合蛋白质因IL-2被IL-2Rα抢占的独特结构而表现出与IL-2Rα相比对IL-2Rβγ的出色的选择性。

[0209] 实施例4.对PD-1表达的IL-2受体表达细胞的结合选择性分析

[0210] 由于本发明的融合蛋白质具有与抗PD-1结合域融合的IL-2/IL-2Rα复合体结构,因此通过所述抗PD-1结合域对存在于肿瘤微环境(tumor microenvironment,TME)的耗竭PD-1^{+}T$_{eff}$细胞中的IL-2Rβγ讯号传递是否发生变化进行分析。利用海克蓝(HEK-Blue™)报告基因检测系统(因威沃根)来执行分析。

[0211] 首先,分别在表达IL-2Rβγ的海克蓝(HEK-Blue™)CD122/CD132细胞(因威沃根)与表达IL-2Rαβγ全部的海克蓝(HEK-Blue™)IL-2细胞(因威沃根)中将pCMV3-hPD1(HG10377-CF)载体转染来制作PD-1表达细胞。作为对照组,在所述两个细胞中分别将pCMV3-Empty载体(对照组DNA)转染来使用。将所述经转染的细胞以50,000细胞/孔的浓度分别注入至96孔板并在37℃、5% CO_2腔室中培养。接着,在去除细胞培养上清液后,向100微升杜皮克氏改进爱哥尔氏媒介(Dulbecco's Modified Eagle Medium,DMEM)培养基添加0至20奈摩尔/升浓度的融合蛋白质A、重组人类IL-2(rIL2,西格玛(Sigma))、异二聚体Fc-IL2(Fc-IL2,自身制作)及异二聚体Fc-IL2/IL2Rα(IL-2及IL-2Rα分别连接至异二聚体Fc的结构,Fc-IL2/IL2Rα;自身制作),分别注入至细胞并在37℃下培养8小时。在向新的96孔板添加20微升/孔所述细胞培养上清液后,利用180微升/孔的比色计分析法试剂、即匡蒂蓝(QUANTI-Blue™)溶液(因威沃根)进行处理并在37℃培养箱中避光孵化约1小时以上。利用微盘读取仪在620奈米至655奈米下对分泌的碱性磷酸酶(分泌型胚胎碱性磷酸酶(secreted embryonic alkaline phosphatase,SEAP))活性测定光密度(optical density,OD)。将结果示出于图8。

[0212] 将以上程序重复两次并求出平均值。将根据是否表达PD-1及IL-2R表达类型的本发明的融合蛋白质的EC_{50}值记载于下表2。

[0213] [表2]

[0214]

EC_{50} (nM)		PD-1表达	
		PD-1 (+)	PD-1 (-)
IL-2Rβγ	一级	0.01774	7.274
	二级	0.0392	12.16
	平均±标准差	0.028±0.015	9.72±3.45
IL-2Rαβγ	一级	0.0348	0.9630
	二级	0.0578	3.075
	平均±标准差	0.046±0.016	2.02±1.49

[0215] 如表2所示,令人惊讶的是,本发明的融合蛋白质在表达PD-1的IL-2Rβγ细胞中表现出较不表达PD-1的细胞高约340倍以上的IL-2反应性(参照表2及示出二级结果的图8a及图8b)。另一方面,本发明的融合蛋白质对不表达PD-1的IL-2Rβγ细胞表现出弱的IL-2反应性(图8b),此被认为源于本发明的融合蛋白质具有不具有α但具有减弱的βγ亲和力的特性,亦如实施例3中对IL-2Rβγ蛋白的结合力试验(图7b)中确认所示。虽然不受理论约束,但看出利用此种减弱的βγ亲和力在不表达PD-1的IL-2Rβγ表达细胞中不能实现充足的细胞内讯息传递(intracellular signaling)。然而,应理解,在PD-1同时表达的细胞(例如TME的PD-1^{+}T$_{eff}$细胞)中,本发明的融合蛋白质的IL-2在抗PD-1结合域的帮助下以"顺式"结

构黏附在一起且可与IL-2Rβγ强力地结合(“接通(switch-on)”效应),从而可以显着的水准引起细胞内讯息传递。

[0216] 本发明的融合蛋白质具有的不具有α但具有减弱的βγ亲和力的特性暗示,虽然永久表达IL-2Rβγ,但不会很好地与PD-1表达率低的末梢血的NK细胞等结合,因此在减少先前IL-2蛋白质所具有的NK细胞过度活性引起的全身毒性乃至副作用的方面具有非常有利的优势。

[0217] 另外,本发明的融合蛋白质对于IL-2Rαβγ表达细胞,即使在PD-1表达存在的情况下,对IL-2的反应性差异与IL-2Rβγ表达细胞相比亦为甚微的水准(340倍vs 44倍;参照表2及示出二级结果的图8c及图8d)。于如IL-2Rαβγ般以表达各种受体次单元的方式制作的细胞的情况,考虑到次单元的表达形式可为多样的且亦可部分接受一定程度IL-2Rβγ受体的表达,IL-2Rαβγ表达细胞与IL-2Rβγ表达细胞之间对IL-2的实际反应性差异更加显着。该情形意味着本发明的融合蛋白质对永久表达IL-2Rαβγ的T_{reg}细胞或引起毛细血管渗漏症候群(vascular leak syndrome)的嗜伊红白血球(eosinophil)及其他内皮细胞的IL-2反应性相当低,因此可解决因外源性IL-2蛋白质的出现而可能发生的全身毒性乃至严重副作用的问题,同时表现出与存在于TME的耗竭的T_{eff}细胞特异性结合来诱导突出的免疫抗癌反应。

[0218] 实施例5.小鼠肿瘤模型中的体内(in vivo)抗癌功效评估

[0219] 实施例5.1单独施用抗PD-1或Fc-IL2/IL2Rα对比抗癌功效试验

[0220] 为了评估本发明的融合蛋白质将IL-2选择性地传递至肿瘤内表达PD-1的T_{eff}细胞以及使其活化来抑制肿瘤生长的能力,利用MC38大肠癌同基因小鼠肿瘤模型实施本发明的融合蛋白质的抗癌功效评估试验。在图9中简要概括实验程序。

[0221] 使用DMEM(+10%胎牛血清(foetal bovine serum,FBS),1%链霉素-青霉素(streptomycin-penicillin),1%非必需胺基酸(non-essential amino acid,NEAA))培养基在37℃、5% CO_2腔室中培养MC38癌细胞。将达到通道9的MC38癌细胞移植用于小鼠。在8周龄C57BL/6雌性小鼠的中背与右肋之间(右背部分)利用1毫升胰岛素注射器进行皮下注射注入1×10^6MC38癌细胞。此时,小鼠使用异氟醚(isoflurane)保持麻醉状态。对皮下注射MC38癌细胞的小鼠经过7天观察。所有小鼠均购自东方生物(Orient Bio),并在无特异病原条件动物设施(无特异病原(specific-pathogen-free,SPF)设施)中饲养。

[0222] 7日后,测定肿瘤大小并将达到100立方毫米大小(±30)的小鼠单独分类用于实验。获得总共28只移植有MC38癌细胞的小鼠,并分为四组。各组包括本发明的融合蛋白质A处理组、具有与融合蛋白质A相同的抗PD-1结合域的抗体处理组、异二聚体Fc-IL2/IL2Rα处理组以及作为对照组的PBS处理组。将各试验物质以相同用量(140皮摩尔)混合于100微升杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline,DPBS)中,自到第7天开始,每周两次(BIW),共向小鼠尾静脉注射四次(PBS处理组仅静脉注射100微升DPBS)。自到第7天开始每周两次测定并记录肿瘤大小及体重。于肿瘤大小达到2000立方毫米的情况进行安乐死。

[0223] 图10测定并示出各组随时间的肿瘤大小变化(图10a)、小鼠存活期(图10b)及小鼠体重变化(图10c)。如图10a及图10b所示,本发明的融合蛋白质表现出与单独使用抗PD-1结合抗体或单独使用Fc-IL-2/IL-R2α相比明显优异的肿瘤生长抑制活性及延长小鼠存活期。

确认本发明的融合蛋白质达成高达98％的肿瘤生长抑制率(TGI),在总共7只小鼠中,6只保持无肿瘤的(tumor-free)状态。另一方面,未观察到由于施用本发明的融合蛋白质而导致的小鼠体重下降(图10c)。

[0224] 实施例5.2抗PD-1及Fc-IL2/IL2Rα联合施用对比抗癌功效试验

[0225] 使用所述实施例5.1中使用的同一小鼠肿瘤模型来评估本发明的融合蛋白质是否因其独特的融合结构而表现出改善的抗癌功效。根据所述实施例5.1中记载的程序实施实验,获得共21只移植有MC38癌细胞的小鼠,分为本发明的融合蛋白质A处理组、联合施用具有与融合蛋白A相同的抗PD-1结合域的抗体及异二聚体Fc-IL2/IL2Rα的联合处理组、以及作为对照组的PBS处理组的三个组来执行。将结果示出于图11。

[0226] 令人惊讶的是确认,与将包括相同抗PD-1结合域的抗PD-1抗体和Fc-IL2/IL2Rα联合施用的组相比,本发明的融合蛋白质发挥出明显优异的肿瘤生长抑制及去除效果(图11a),且显着延长小鼠存活期(图11b)。此种结果表明,本发明的融合蛋白质可将IL-2有效地传递至肿瘤内表达PD-1的T_{eff}细胞,从而诱导T_{eff}细胞的增殖及活化,因此发挥出优异的抗癌功效。

[0227] 实施例5.3长期记忆免疫反应试验

[0228] 为了确认本发明的融合蛋白质是否形成长期记忆免疫从而在中断施用后亦表现出长期效果,在MC38癌细胞移植(第一次移植)后,通过施用本发明的融合蛋白质确保处于无肿瘤状态(tumor-free)的C57BL/6小鼠,实施长期记忆免疫反应试验。为此,根据实施例5.1中记载的程序,以每周一次(QW)或每周两次(BIW)的频率将75皮摩尔至280皮摩尔的融合蛋白质A施用共一次至四次后,将共26只至第一次移植后第60天为止保持无肿瘤的状态的小鼠(tumor-free mouse)用于实验(75皮摩尔BIW四次:6只,140皮摩尔BIW四次:6只,150皮摩尔BIW四次:5只,280皮摩尔BIW四次:4只,150皮摩尔QW一次:2只,150皮摩尔QW两次:3只)。

[0229] 在MC38第一次移植后第67天,将所述26只小鼠分为两组,利用皮下注射将1×10^6个MC38癌细胞(14只)或B16F10黑色素瘤细胞(12只)移植至右背部(第二次移植,第二个挑战),并观察肿瘤生长。作为对照组,将14只未进行MC38第一次移植与融合蛋白质施用的小鼠(原始态(naïve))分成两组,利用与以上相同的方法移植MC38或B16F10癌细胞。至第一次移植后第85天为止观察肿瘤大小变化。实验程序在图12简要概括。

[0230] 在MC38第一次移植及施用融合蛋白质A后,第二次移植MC38癌细胞的14只小鼠至观察结束时为止全部保持无肿瘤的状态,反之,在其他组的小鼠中观察到肿瘤生长(图13及图14)。其中于第二次移植B16F10黑色素瘤细胞的小鼠的情况,尽管没有额外施用融合蛋白质A,但与原始态小鼠相比,观察到肿瘤生长受到抑制(图13)。此种结果意味着本发明的融合蛋白质诱导肿瘤特异性长期免疫反应,即使在中断施用后亦长期保持对同一癌种的抑制效果(后天性免疫反应),且一部分亦保持对其他癌种的(肿瘤非特异性)抗癌效果(先天性免疫反应)。

[0231] 实施例5.4由单次施用带来的用量依赖性抗癌效果评估

[0232] 为了确认本发明的融合蛋白质的抗癌效果是否发生用量依赖性变化,使用MC38大肠癌同基因小鼠肿瘤模型进行实验。

[0233] 利用与实施例5.1中相同的方法进行实验,以移植后第7天肿瘤大小100立方毫米

±30为基准,将小鼠分为共7个组(每组5只或6只),以0(PBS)、50皮摩尔、150皮摩尔、300皮摩尔、600皮摩尔、1200皮摩尔及3000皮摩尔的用量对各组单次施用融合蛋白质A。一周测定两次肿瘤大小及体重并记录,于肿瘤大小达到2000立方毫米的情况进行安乐死。实验程序在图15中简要概括。

[0234] 如图16a所示,本发明的融合蛋白质A在0至150皮摩尔区间内与用量成正比地增加肿瘤抑制功效,在300皮摩尔以上的用量下,所有用量中TGI为99%至100%。因此,在单次施用时,对MC38产生抗癌效果饱和的用量判断为150皮摩尔至300皮摩尔。在体重变化方面,在3000皮摩尔下施用后第10天出现体重下降的现象但重新恢复,除此之外的所有用量均未观察到体重下降(图16b)(图中*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001;使用图基(Tukey)事后检验进行与PBS对照组对比的多种比较(各组对比),二元方差分析(二因数变异数分析(two-way analysis of variance,two-way ANOVA))。

[0235] 实施例5.5B16F10黑色素瘤同基因模型中的抗癌效果评估

[0236] 利用与实施例5.1中相同的方法进行实验,对在移植7.5×10^5B16F10细胞而非MC38癌细胞的9周龄C57BL/6J小鼠中融合蛋白质的功效进行评估。

[0237] 移植第7天,当肿瘤大小达到平均96立方毫米时,将小鼠分为三组,对各组单次施用PBS(10只)、融合蛋白质A 300皮摩尔(5只)、融合蛋白质A 600皮摩尔(5只)。一周测定两次肿瘤大小及体重并记录。

[0238] 图17示出各组随时间的肿瘤大小变化(图17a)及肿瘤生长抑制率(TGI%)(图17b)。如图17a及图17b所示,融合蛋白质A处理组与PBS处理对照组相比,在统计学上表现出有意义的肿瘤生长抑制效果(以施药后第13天为基准,与PBS处理组相比,TGI为70.2%(300皮摩尔)及89.2%(600皮摩尔);图中*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001,使用图基事后检验的二元方差分析)。

[0239] 实施例5.6Pan02胰腺癌同基因模型中的抗癌效果评估

[0240] 利用与实施例5.1中相同的方法进行实验,对在移植3×10^6Pan02癌细胞而非MC38癌细胞的小鼠中融合蛋白质的功效进行评估。

[0241] 移植第7天,当肿瘤大小达到平均71立方毫米时,将小鼠分为本发明的融合蛋白质A处理组(5只)与PBS处理组(5只)两组进行施用。将融合蛋白质A混合于100微升DPBS中,以每只小鼠75皮摩尔一周两次(BIW)的频率对小鼠尾静脉注射共四次(PBS处理组仅静脉注射100微升DPBS)。自移植的第7天开始至第40天为止一周测定两次肿瘤大小及体重并记录。

[0242] 图18对各组随时间的肿瘤大小变化(图18a)、小鼠存活期(图18b)及小鼠体重变化(图18c)进行测定并示出。融合蛋白质A自第三次施用时开始至观察结束日为止表现出5只小鼠全部保持无肿瘤状态(tumor-free)的优异的抗肿瘤活性(图18a;TGI 100%,施药后第17日***p<0.001,施药后第21日~第28日****p<0.0001;使用图基事后检验进行与PBS对照组对比的二元方差分析),至观察结束日为止小鼠全部存活(图18b)。在体重变化方面,在施用一次融合蛋白质A时暂时观察到体重降低,但此后重新恢复,未观察到进一步的体重降低(图18c)。

[0243] 实施例5.7根据抗PD-1Fab臂个数的抗癌效果的比较评估

[0244] 为了确认本发明的融合蛋白质如何根据抗PD-1Fab臂的个数改变抗癌效果,使用MC38大肠癌同基因小鼠肿瘤模型进行实验。利用与实施例5.1相同的方法进行实验,移植

MC38癌细胞第7天,以450皮摩尔的用量施用一次融合蛋白质A(2个PD-1Fab臂)与融合蛋白质B(1个PD-1Fab臂)(每组5只),作为对照组,对7只小鼠施用PBS。

[0245] 直至施药后第17日,每周两次测定并记录肿瘤大小与体重。图19示出各组随时间的肿瘤大小变化(图19a)及肿瘤生长抑制率(TGI%)(图19b)。如图19a及图19b所示,融合蛋白质A处理组及融合蛋白质B处理组与PBS处理对照组相比,在统计学上表现出有意义的肿瘤生长抑制效果(以施药后第17天为基准,与PBS处理组相比,TGI为100%(融合蛋白质A)及76%(融合蛋白质B);图中*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001,使用邓尼特(Dunnett)事后检验的二元方差分析)。

[0246] 实施例6根据pH的抗原结合力比较评估

[0247] 已知血液(大约pH 7.4)与肿瘤微环境(tumor microenvironment)(大约pH 5.6~6.8)存在pH差异。因此,在肿瘤微环境的弱酸性pH下的抗体结合力对免疫抗癌抗体的治疗功效具有重要影响。在本发明人之前的研究中确认,本发明的融合蛋白质中用作抗PD-1结合域的1G1-h70在肿瘤微环境的低pH值(6.0)下与代表性的抗PD-1抗体药物、即可瑞达及欧狄沃相比,对人类PD-1表现出更强的结合亲和度(PCT/KR2022/001714)。因此,为了确认本发明的融合蛋白质A是否在肿瘤微环境中保持优异的结合亲和度,通过SPR(比亚科8K,思拓凡)分析对与人类PD-1的结合动力学(Kinetics)进行测定。作为用于比较的对照组,自新元药品购入并使用抗人类PD-1抗体可瑞达(Keytruda,MSD)与欧狄沃(Opdivo,BMS)作为人体用医药品。

[0248] 根据制造商的指南使用胺基偶联试剂盒(思拓凡)在CM5芯片(思拓凡)中使1微克/毫升浓度的人类PD-1(百普赛斯,猫#PD1-H5221)固定。将7个浓度(0~100奈摩尔/升)的对照抗体(可瑞达、欧狄沃)与1G1-h70以及融合蛋白质A以30微升/分的流速汇合(association)180秒并解离(dissociation)1200秒,流至CM5芯片。在每个浓度循环中,在各个实验后,利用pH 1.5的甘胺酸(glycine)将芯片再生。此时,电泳缓冲液(running buffer)使用pH 7.4或pH 6.0的HBS-EP+缓冲液(0.1摩尔/升的羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES),1.5摩尔/升NaCl,0.03摩尔/升的乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid,EDTA)及0.5%v/v表面活性剂(Surfactant)P20),实验蛋白质在电泳缓冲液中被稀释。

[0249] 比亚科评估软体3.0版中使用1:1结合模型来执行分析,将其结果的动力学常数(ka及kd)及亲和度(KD)值记载于下表3中。

[0250] [表3]

[0251]

	pH 7.4			pH 6.0		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
可瑞达	7.43E+5	3.61E-4	4.86E-10	1.04E+6	7.75E-4	7.42E-10
欧狄沃	5.63E+5	3.65E-4	6.48E-10	6.60E+5	5.12E-4	7.75E-10
1G1-h70	1.48E+5	3.51E-5	2.37E-10	2.86E+5	1.38E-5	**4.81E-11**
融合蛋白质A	1.37E+5	7.27E-5	5.30E-10	4.86E+5	2.31E-5	**4.76E-11**

[0252] 如表3所示,本发明的融合蛋白质A及1G1-h70抗体在pH 7.4(血液)下表现出与可瑞达及欧狄沃相似水准的结合亲和度(KD),但在pH 6.0(肿瘤微环境)下,与可瑞达及欧狄沃相比表现出约15倍至16倍更强的结合亲和度。因此,确认,本发明的融合蛋白质在抗PD-1抗体1G1-h70具有的肿瘤微环境的低pH下保持优异的结合亲和度。

[0253] 实施例7.PD-1介导的IL-2讯号传递确认分析

[0254] 为了验证本发明的融合蛋白质是否表现出PD-1介导的IL-2讯号传递,使用海克蓝(HEK-Blue™)报告基因检测系统(因威沃根(Invivogen))分析根据有无利用抗PD-1抗体进行预先处理的IL-2讯号传递活性。

[0255] 在表达IL-2Rβγ的海克蓝(HEK-Blue™)CD122/CD132细胞(因威沃根(Invivogen))将pCMV3-hPD1载体或pCMV3-Empty载体(对照组)转染。以大约50,000细胞/孔的浓度将所述经转染的细胞分别注入至96孔板并在37℃、5% CO_2腔室中培养。接着,在去除细胞培养上清液后,每孔每20微升添加1微摩尔/升的抗PD-1抗体(所述实施例6中使用的1G1-h70抗体)或对照组同型(人类IgG4)抗体,并孵化40分钟。之后,对1奈摩尔/升浓度的重组人类IL-2(rhIL-2)或融合蛋白质A进行处理并在37℃下培养8小时。在将20微升/孔的所述细胞培养上清液添加至新的96孔板中后,利用180微升/孔的比色计分析法试剂、即匡蒂蓝(QUANTI-Blue™)溶液(因威沃根(Invivogen))进行处理,并在37℃的培养箱中避光孵化约1小时以上。在反应开始后,以30分钟间隔使用微盘读取仪并在620奈米下测定OD。将结果示出于图20。

[0256] 如图20所示,本发明的融合蛋白质在不表达PD-1的细胞(PD-1$^-$CD122$^+$CD132$^+$细胞)中表现出与IL-2相比更弱的讯号传递反应性(减弱的IL-2Rβγ结合特性),相比之下,在表达PD-1的细胞(PD-1$^+$CD122$^+$CD132$^+$细胞)中表现出与IL-2相比明显突出的反应性,由此可知本发明的融合蛋白质对PD-1表达细胞是特异性的且选择性地起作用。另外,在处理本发明的融合蛋白质之前利用抗PD-1抗体进行预先处理以预先阻断细胞的PD-1的情况下,确认本发明的融合蛋白质的IL-2反应性完全中和。该情形暗示本发明的融合蛋白质表示的IL-2讯号传递是由PD-1介导的。

[0257] 以上为了明确理解本发明详细记述了例示性的特定实施态样,但所述说明及实施例不应解释为限制本发明的范围。本发明的权利范围由所附申请范围及其均等物定义。本案引用的所有专利及科学文献的揭示内容明确地整体引用作为参考。

[0258] 序列列表

[0259] [表4]

[0260]

序列编号	说明	序列
1	人类IL-2（UniProt P60568位置21-153）	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
2	人类IL-2（C125S）	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
3	人类IL-2Rα（UniProt P01589位置22-272）	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAVAGCVFLLISVLLLSGLTWQRRQRKSRRTI
4	人类IL-2Rα细胞外域（UniProt P01589位置22-240）	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQ
5	人类IL-2Rα突变体（UniProt P01589 位置22-186，L42I）	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSIYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG
6	人类IL-15（UniProt P40933 位置49-162）	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
7	人类IL-15Rα（UniProt Q13261 位置31-267）	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL
8	人类IL-15Rα细胞外域（UniProt Q13261位置31-205）	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTT
9	HCDR1胺基酸	GYWMH
10	HCDR2胺基酸	MIHPNSDTTTYNEKFKN
11	HCDR2胺基酸	MIHPNSDTTVYNEKFKN
12	HCDR2胺基酸	MIHPNSDTTIYNEKFKN
13	HCDR2胺基酸	MIHPNSDTTTYNWKFKN
14	HCDR2胺基酸	MIHPNSDTTVYNWKFKN
15	HCDR2胺基酸	MIHPNSDTTIYNWKFKN
16	HCDR3胺基酸	TDQAAWFAF
17	HCDR3胺基酸	TDQEAWFAF
18	HCDR3胺基酸	TDQAAWAAF
19	HCDR3胺基酸	TDQAAWMAF
20	HCDR3胺基酸	TDQAAWHAF
21	HCDR3胺基酸	TDQAAWFGF
22	HCDR3胺基酸	TDQEAWAAF
23	HCDR3胺基酸	TDQEAWMAF
24	HCDR3胺基酸	TDQEAWHAF
25	HCDR3胺基酸	TDQEAWFGF
26	HCDR3胺基酸	TDQAAWAGF

[0261]

27	HCDR3胺基酸	TDQAAWMGF
28	HCDR3胺基酸	TDQAAWHGF
29	HCDR3胺基酸	TDQEAWAGF
30	HCDR3胺基酸	TDQEAWMGF
31	HCDR3胺基酸	TDQEAWHGF
32	LCDR1胺基酸	RSSQNIVHSNGDTYLE
33	LCDR1胺基酸	RSSQNIVHSQGDTYLE
34	LCDR1胺基酸	RSSQNIVRSNGDTYLE
35	LCDR1胺基酸	RSSQNIVRSQGDTYLE
36	LCDR2胺基酸	KVSKRFS
37	LCDR3胺基酸	FQGSHVPWT
38	HCVR胺基酸	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTGYWMH WVKQRPGQGLEWIGMIHPNSDTTTYNEKFKNRATLTVDKSSGTAYMQLSSLTSEDSA VYYCTGTDQAAWFAFWGQGTLVTVSA
39	LCVR胺基酸	DIVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSKR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKLEIK
40	人源化抗体，1G1-h61 VH胺基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWMGMIHPN SDTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQ GTTVTVSS
41	人源化抗体，1G1-h61 VL胺基酸	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSKR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKVEIK
42	人源化抗体，1G1-h68 VH胺基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNS DTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTGTDQAAWFAFWGQG TTVTVSS
43	人源化抗体，1G1-h68 VL胺基酸	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSKR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKVEIK
44	人源化抗体，1G1-h70 VH胺基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNS DTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQG TTVTVSS
45	人源化抗体，1G1-h70 VL胺基酸	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSQGDTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSKR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKVEIK
46	人类IgG4（S228P） 恒定区，重链胺基酸	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
47	人类IgG4恒定区，卡帕链胺基酸	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
48	人类PD-1蛋白质，全胺基酸	*MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGW*FLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN TSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGV VGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQW REKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL （斜體部分表示訊號序列。 下划線部分表示細胞外域部分。）
49	Fc突变体链1 IgG4 216~447 S228P/Q347R/ T366W	ESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREP**R**VYTLPPSQEEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
50	Fc突变体链2 IgG4 216~447 S228P/ K360E/ T366S/ L368A/ Y407V	ESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT**E**NQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFL**V**SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
51	人源化抗-PD-1，VL-CL胺基酸	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQNIVHSQGDTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSKR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（下划線部分表示可变区。）
52	人源化抗-PD-1，VH-CH1胺基酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNS DTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV（下划線部分表示可变区。）

[0262]

53	正向引体	CCCTCTCCCCCGGCAAGTCAGGAGGTGGATCTGGTGGAG
54	反向引体	GCCCGAATTCGGCGGCCGCTTTATCAGGTCAGCGTAGAGATG
55	正向引体	*TctccctgtctccgggtaaaggaggtggaggttctggtggaggtggatctggtggaggaggttctggtggaggtggatctGAGC TGTGTGATGATGATC*
56	反向引体	gtcattggggaaacctgctcctaggTTTAGCCGGTACAGATCAG
57	人源化抗-PD-1，IgG4重链1，具有IL-2 C125S的杵Fc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNS DTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV*ESKYGPPCPPCP*A PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP **R**VYTLPPSQEEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*SGGGSGGGSGGGS GG***APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE LKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITF*S*QSIISTLT
58	人源化抗-PD-1，IgG4重链2，具有CD25 L42I的臼Fc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNS DTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV*ESKYGPPCPPCP*A PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMT**E**NQVSL**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFL**V**SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGG GGSGGGGS***ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGS*I*YMLC TGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQAS LPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTH GKTRWTQPQLICTG
59	Fc_杵_具有_IL-2C125S	*KYGPPCPPCP*APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREP**R**VYTLPPSQEEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*S GGGSGGGSGGGSGG***APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF*S*QSIISTLT
60	人源化抗-PD-1，IgG4重链1，不具有IL-2 C125S的杵Fc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNS DTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV*ESKYGPPCPPCP*A PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP **R**VYTLPPSQEEMTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
61	人源化抗-PD-1，具有CD25 L42I的IgG4重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNS DTTTYNEKFKNRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGTDQAAWFAFWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV*ESKYGPPCPPCP*A PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG GSGGGGS***ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGS*I*YMLCT GNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASL PGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHG KTRWTQPQLICTG

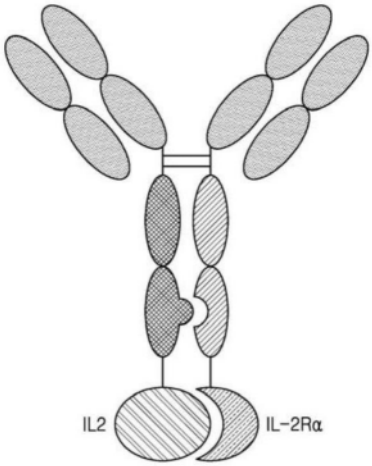


图1a

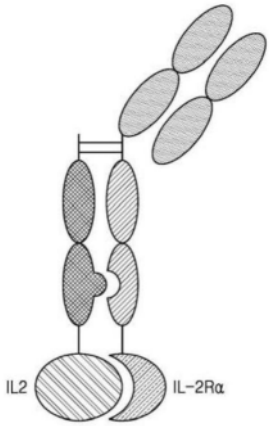


图1b

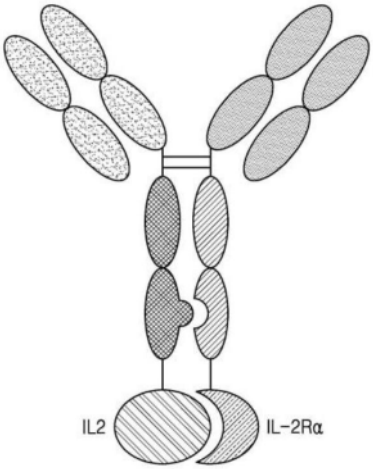


图1c

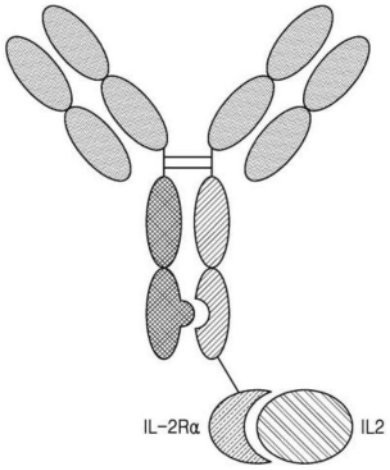


图2a

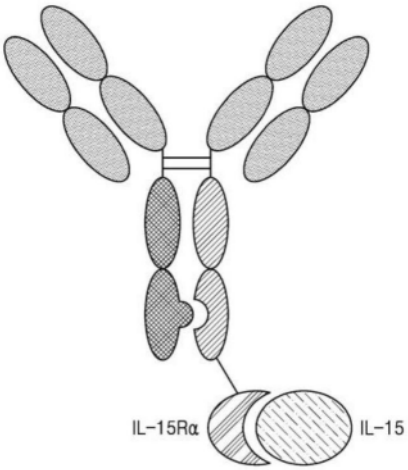


图2b

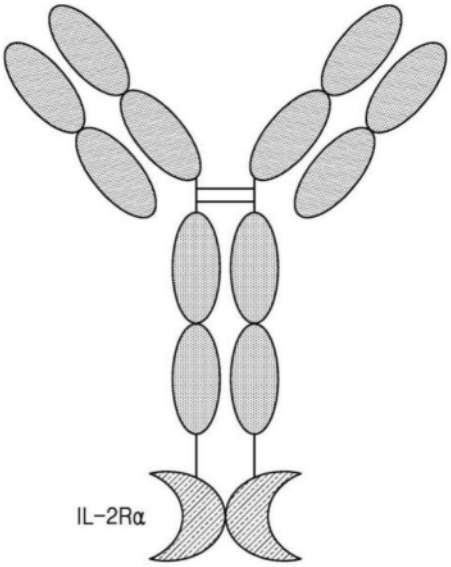


图3a

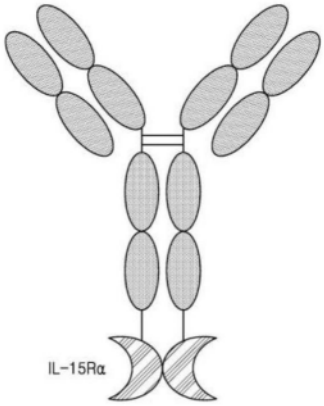


图3b

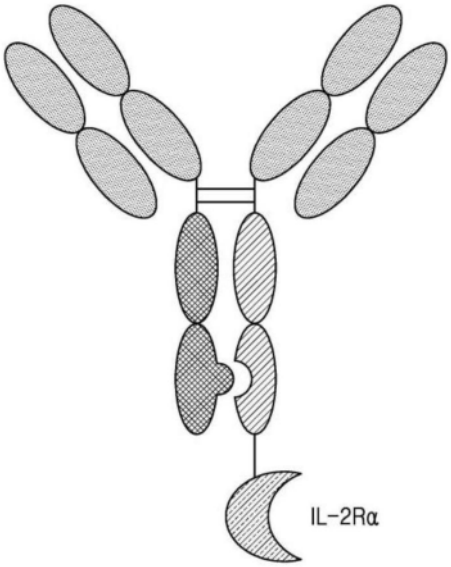


图3c

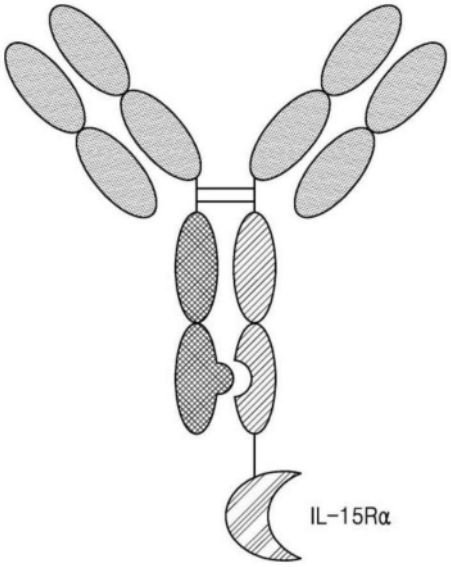


图3d

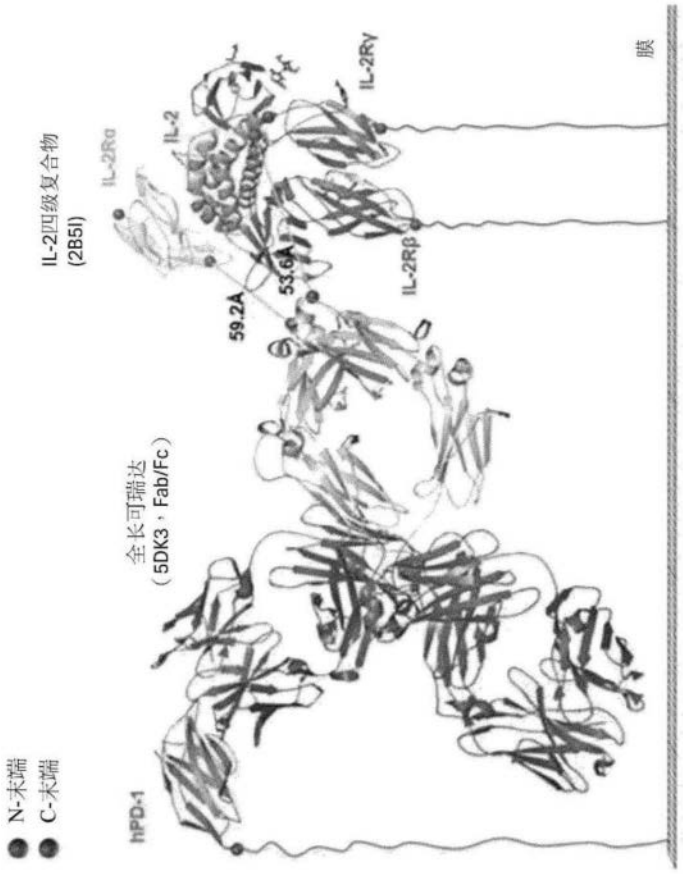

膜
IL-2Rγ
IL-2
IL-2Rα
IL-2四级复合物
(2B5I)
IL-2Rβ
53.6A
59.2A
全长可瑞达
(5DK3，Fab/Fc)
hPD-1
N-末端
C-末端

图4

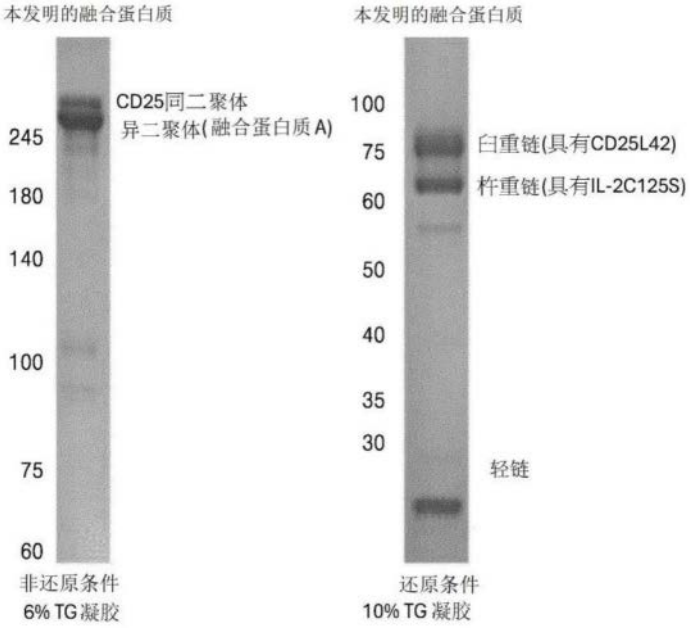

本发明的融合蛋白质
CD25同二聚体
异二聚体(融合蛋白质A)
245
180
140
100
75
60
非还原条件
6% TG凝胶
本发明的融合蛋白质
100
75
60
50
40
35
30
臼重链(具有CD25L42)
杵重链(具有IL-2C125S)
轻链
还原条件
10% TG凝胶

图5

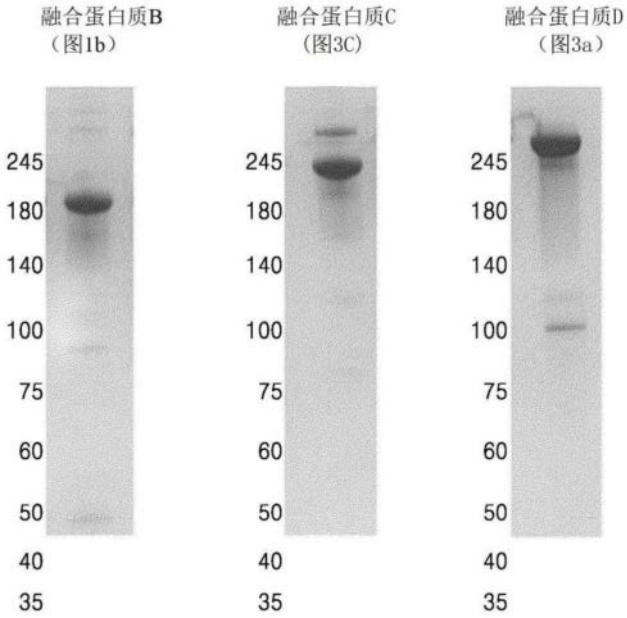


图6a

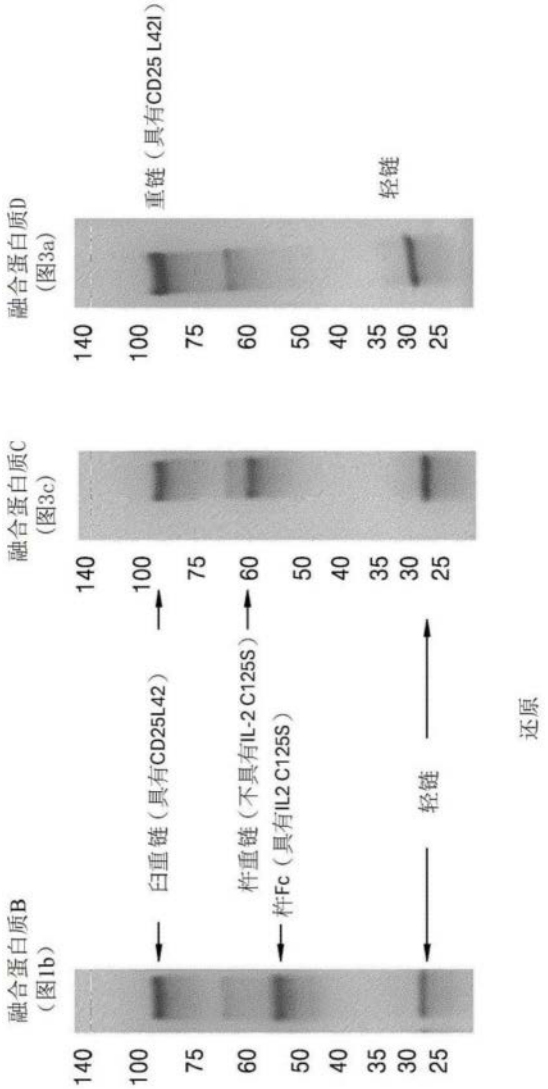

融合蛋白质D
(图3a)
重链（具有CD25 L42I）
轻链
140
100
75
60
50
40
35
30
25
融合蛋白质C
(图3c)
融合蛋白质B
(图1b)
白重链（具有CD25L42）
杵重链（不具有IL-2 C125S）
杵Fc（具有IL2 C125S）
轻链
还原

图6b

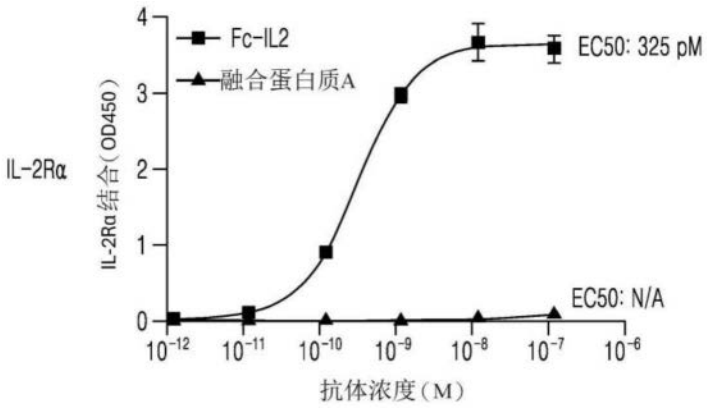

Fc-IL2
融合蛋白质A
EC50: 325 pM
EC50: N/A
IL-2Rα结合(OD450)
IL-2Rα
抗体浓度(M)
0
1
2
3
4
10^{-12}
10^{-11}
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}
10^{-6}

图7a

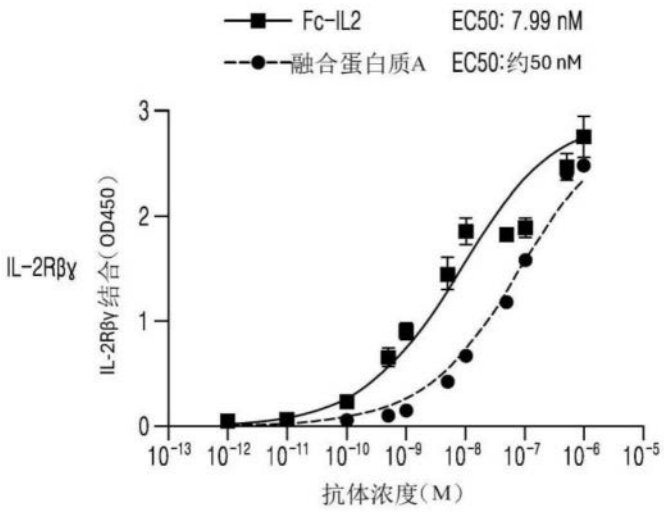

Fc-IL2 EC50: 7.99 nM
融合蛋白质A EC50:约50 nM
IL-2Rβγ
IL-2Rβγ结合(OD450)
抗体浓度(M)

图7b

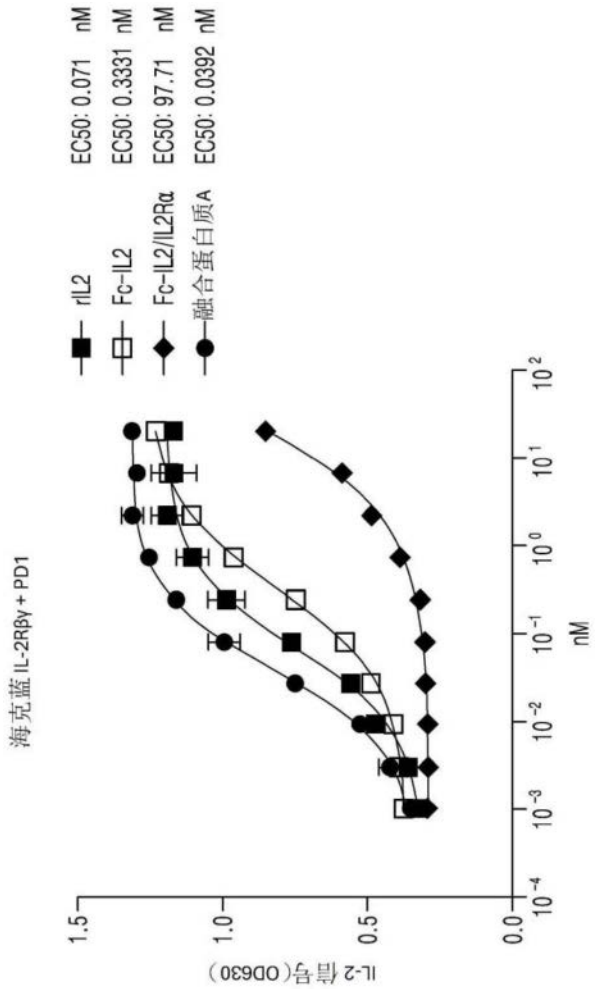

rIL2 EC50: 0.071 nM
Fc-IL2 EC50: 0.3331 nM
Fc-IL2/IL2Rα EC50: 97.71 nM
融合蛋白质A EC50: 0.0392 nM
海克蓝 IL-2Rβγ + PD1
IL-2 信号(OD630)
nM

图8a

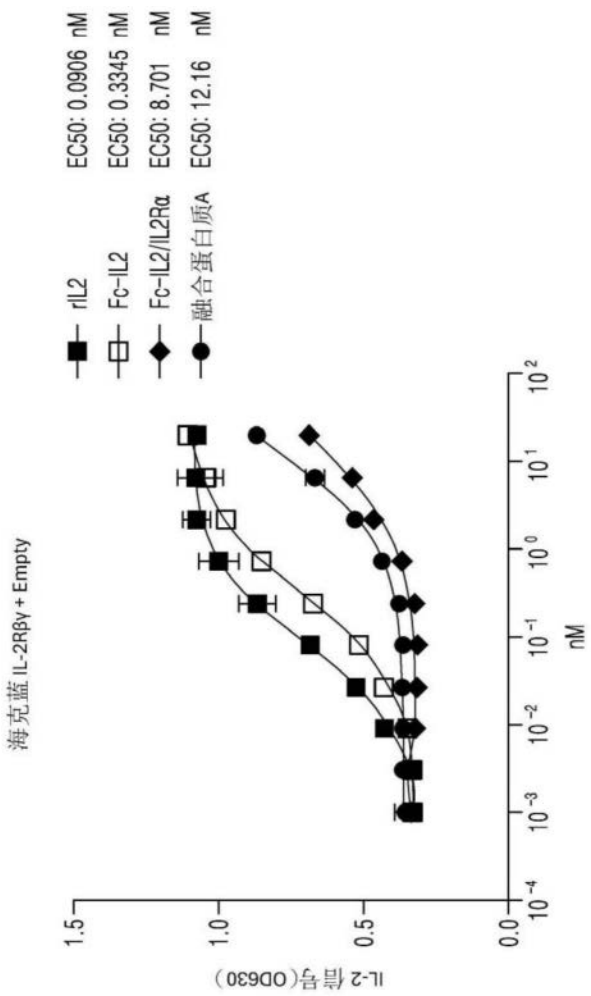

rIL2 EC50: 0.0906 nM
Fc-IL2 EC50: 0.3345 nM
Fc-IL2/IL2Rα EC50: 8.701 nM
融合蛋白质A EC50: 12.16 nM
海克蓝 IL-2Rβγ + Empty
IL-2 信号(OD630)
1.5
1.0
0.5
0.0
10^-4
10^-3
10^-2
10^-1
10^0
10^1
10^2
nM

图8b

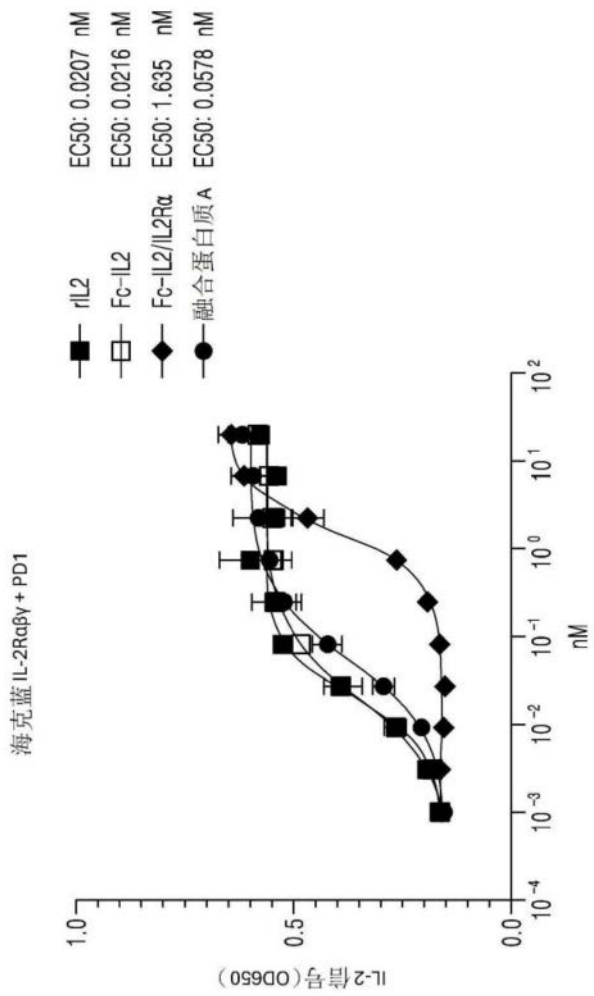

rIL2 EC50: 0.0207 nM
Fc-IL2 EC50: 0.0216 nM
Fc-IL2/IL2Rα EC50: 1.635 nM
融合蛋白质 A EC50: 0.0578 nM
海克蓝 IL-2Rαβγ + PD1
IL-2 信号（OD650）
1.0
0.5
0.0
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
nM

图8c

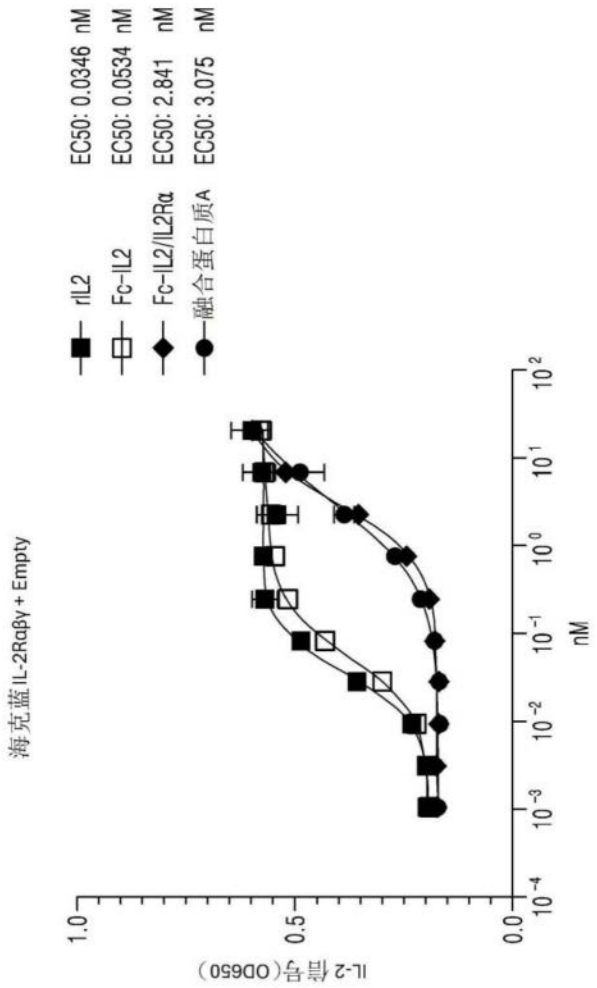

rIL2 EC50: 0.0346 nM
Fc-IL2 EC50: 0.0534 nM
Fc-IL2/IL2Rα EC50: 2.841 nM
融合蛋白质A EC50: 3.075 nM
海克蓝IL-2Rαβγ + Empty
IL-2 信号(OD650)
1.0
0.5
0.0
nM

图8d

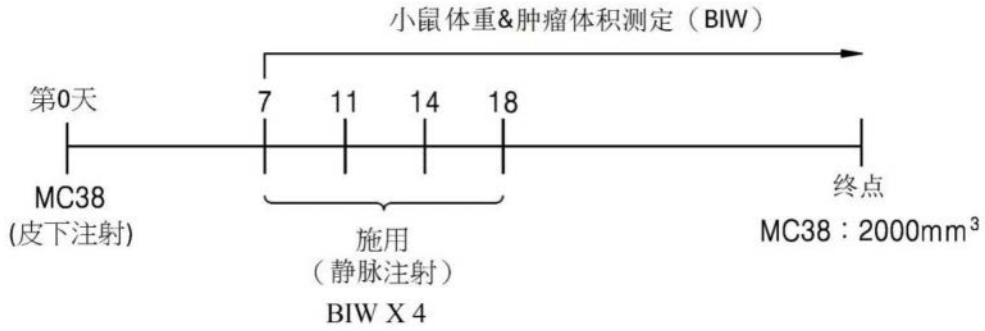

小鼠体重&肿瘤体积测定（BIW）
第0天
7
11
14
18
MC38
(皮下注射)
施用
（静脉注射）
BIW X 4
终点
MC38：2000mm3

图9

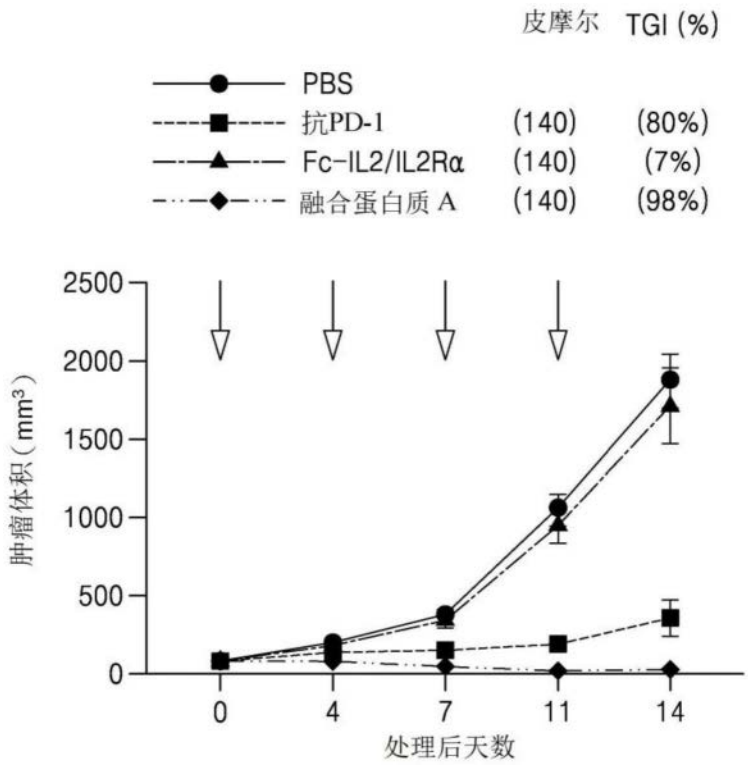

皮摩尔 TGI (%)
PBS
抗PD-1 (140) (80%)
Fc-IL2/IL2Rα (140) (7%)
融合蛋白质 A (140) (98%)
肿瘤体积(mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 4 7 11 14
处理后天数

图10a

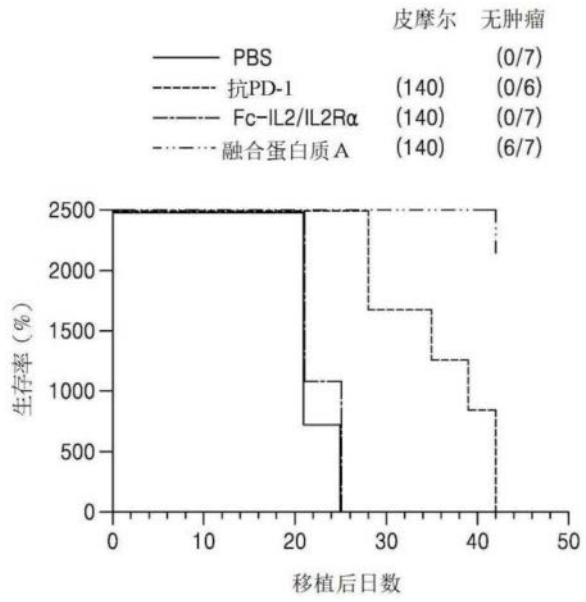

皮摩尔 无肿瘤
PBS (0/7)
抗PD-1 (140) (0/6)
Fc-IL2/IL2Rα (140) (0/7)
融合蛋白质A (140) (6/7)
生存率(%)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 10 20 30 40 50
移植后日数

图10b

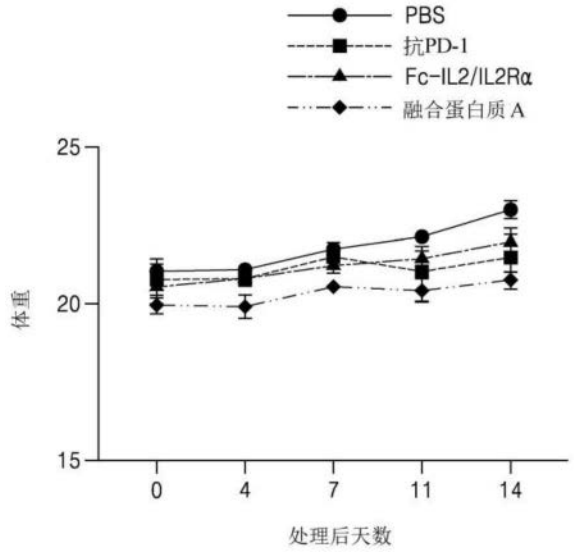

PBS
抗PD-1
Fc-IL2/IL2Rα
融合蛋白质A
25
20
15
体重
0
4
7
11
14
处理后天数

图10c

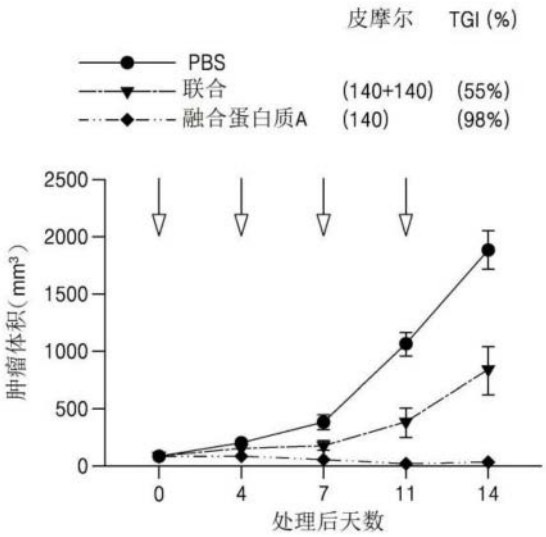

皮摩尔 TGI (%)
PBS
联合 (140+140) (55%)
融合蛋白质A (140) (98%)
2500
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积(mm³)
0
4
7
11
14
处理后天数

图11a

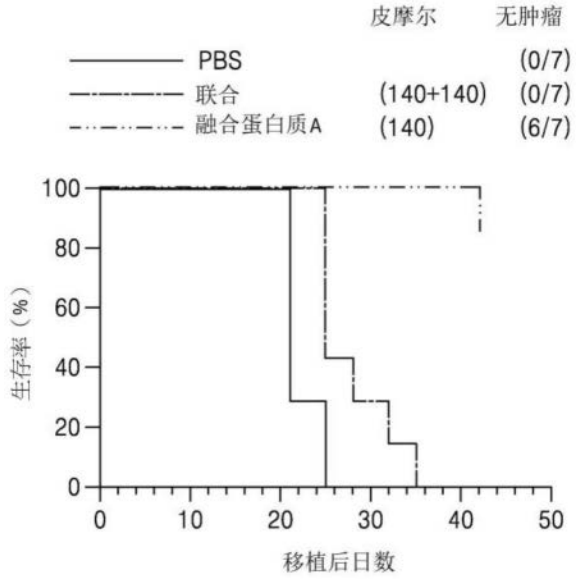


图11b

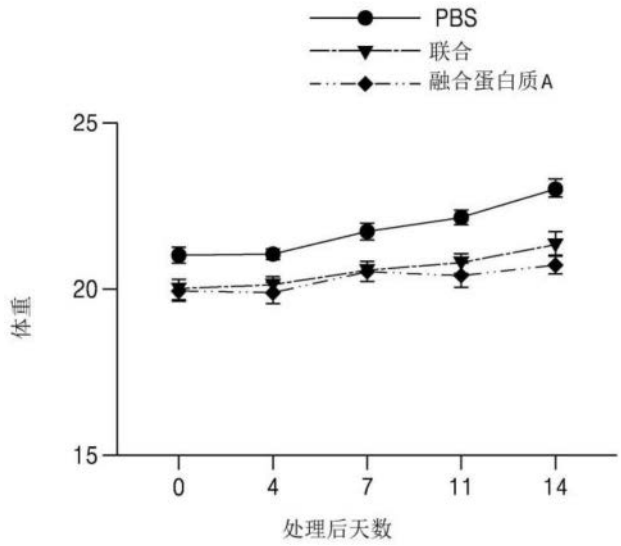


图11c

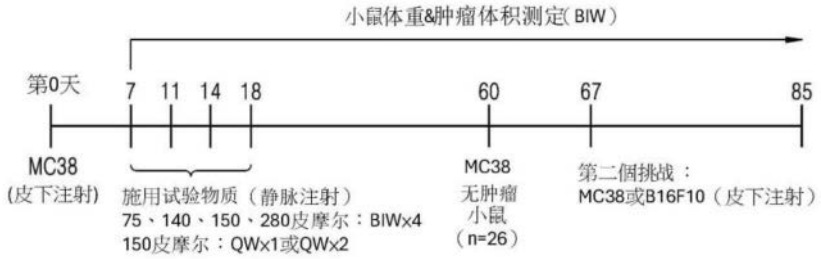


图12

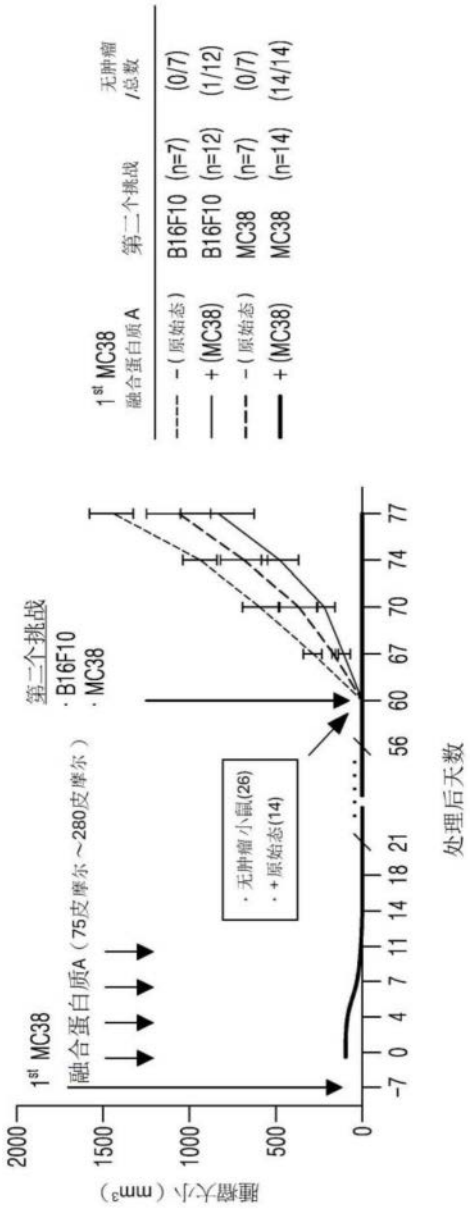

1st MC38
融合蛋白质A
第二个挑战
无肿瘤/总数
- (原始态) B16F10 (n=7) (0/7)
+ (MC38) B16F10 (n=12) (1/12)
- (原始态) MC38 (n=7) (0/7)
+ (MC38) MC38 (n=14) (14/14)
肿瘤大小（mm³）
2000
1500
1000
500
0
1st MC38
融合蛋白质A（75皮摩尔～280皮摩尔）
第二个挑战
· B16F10
· MC38
· 无肿瘤小鼠(26)
· + 原始态(14)
-7 0 4 7 11 14 18 21 56 60 67 70 74 77
处理后天数

图13

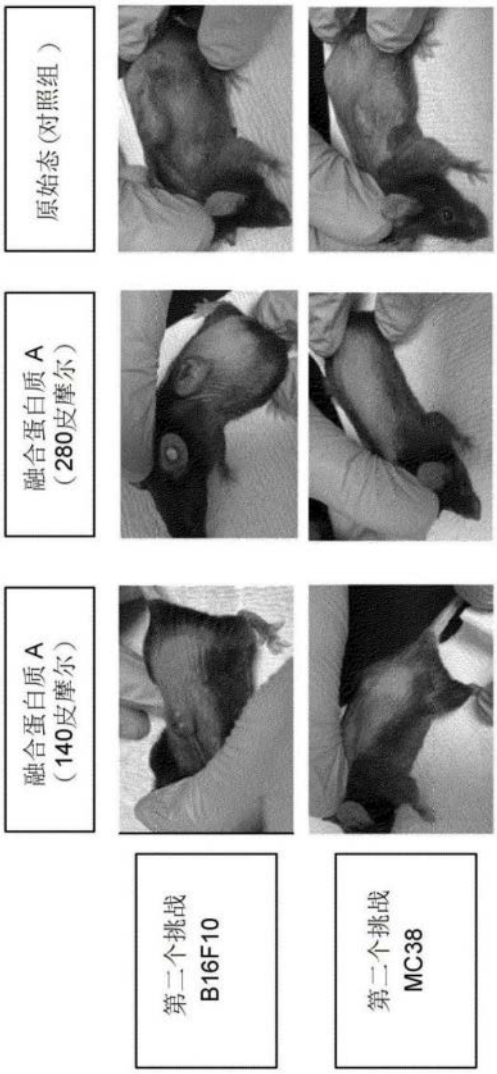

原始态(对照组)
融合蛋白质A
(280皮摩尔)
融合蛋白质A
(140皮摩尔)
第二个挑战
B16F10
第二个挑战
MC38

图14

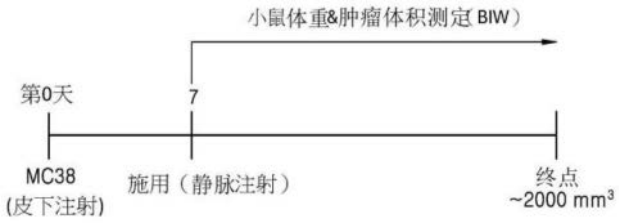

小鼠体重&肿瘤体积测定(BIW)
第0天
7
MC38
(皮下注射)
施用(静脉注射)
终点
~2000 mm3

图15

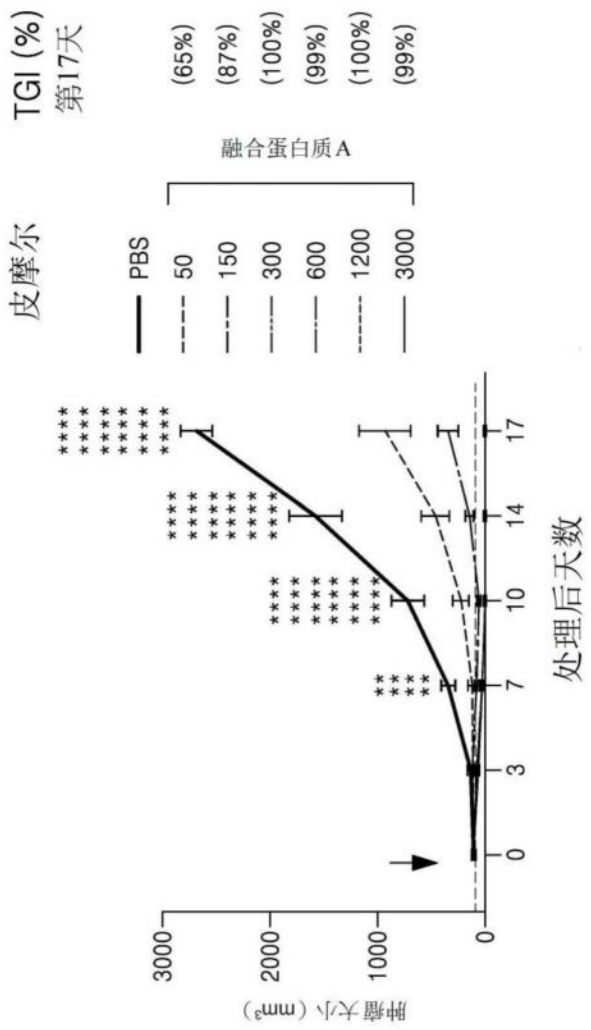

TGI (%)
第17天
(65%)
(87%)
(100%)
(99%)
(100%)
(99%)
融合蛋白质A
皮摩尔
PBS
50
150
300
600
1200
3000
肿瘤大小（mm³）
处理后天数

图16a

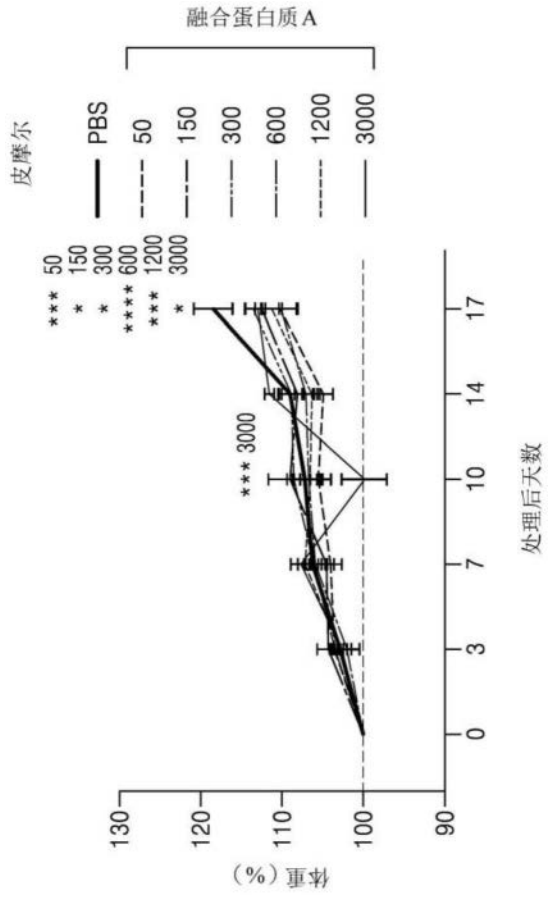

融合蛋白质A
皮摩尔
PBS
50
150
300
600
1200
3000
处理后天数
体重（%）

图16b

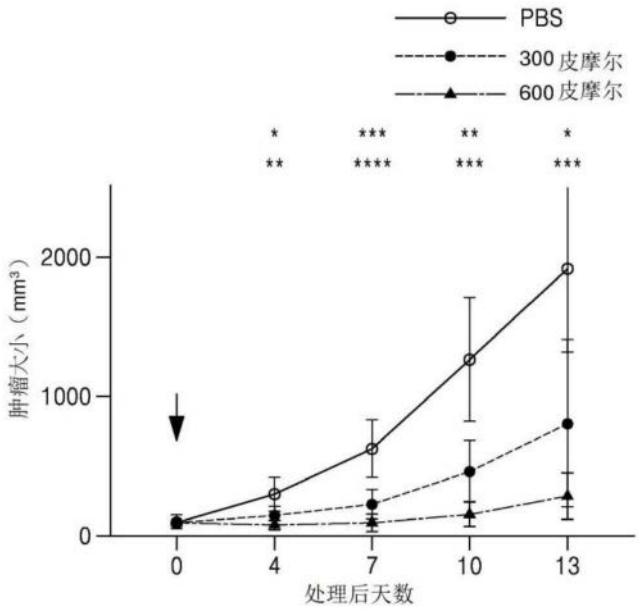

PBS
300皮摩尔
600皮摩尔
肿瘤大小（mm³）
处理后天数

图17a

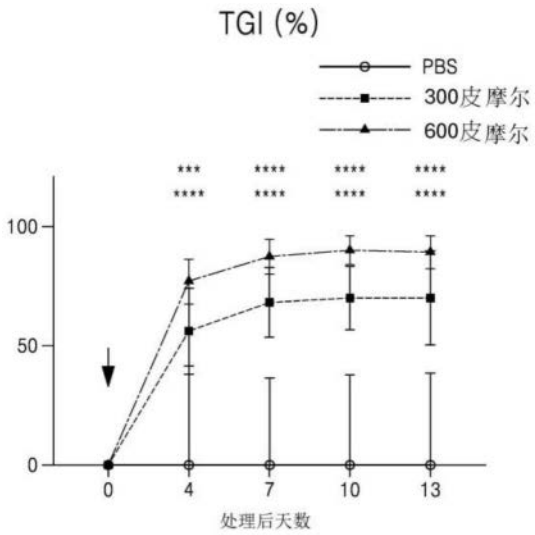

TGI (%)
PBS
300皮摩尔
600皮摩尔
100
50
0
0
4
7
10
13
处理后天数

图17b

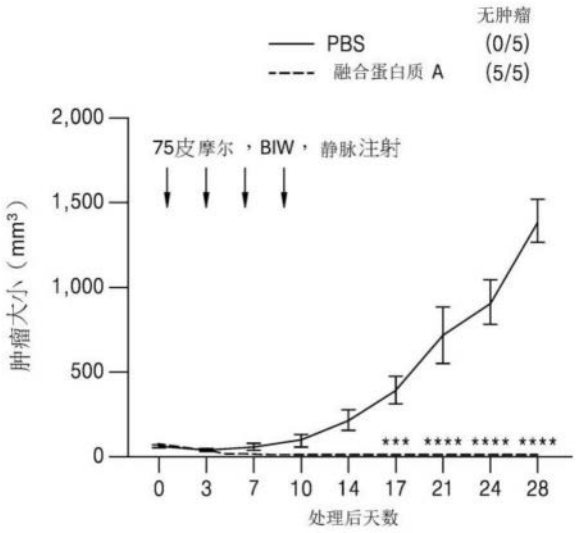

无肿瘤
PBS (0/5)
融合蛋白质 A (5/5)
75皮摩尔，BIW，静脉注射
肿瘤大小（mm³）
2,000
1,500
1,000
500
0
0
3
7
10
14
17
21
24
28
处理后天数

图18a

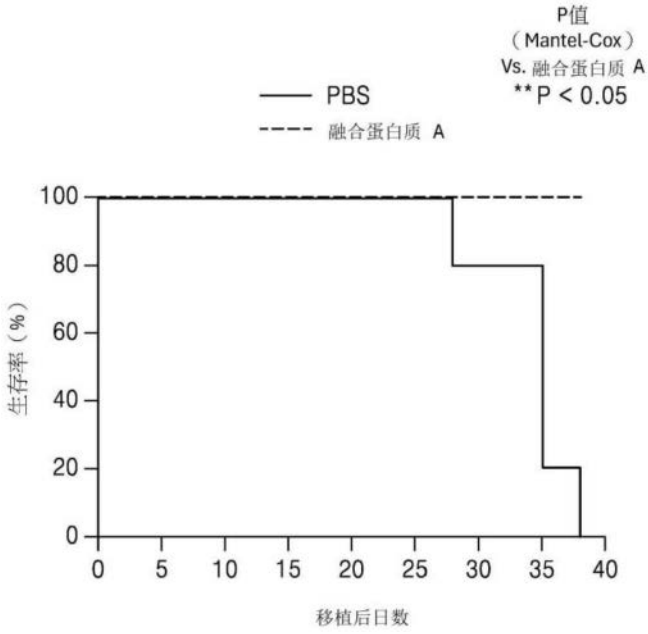

P值
（Mantel-Cox）
Vs. 融合蛋白质 A
**P < 0.05
PBS
融合蛋白质 A
100
80
60
40
20
0
生存率（%）
0
5
10
15
20
25
30
35
40
移植后日数

图18b

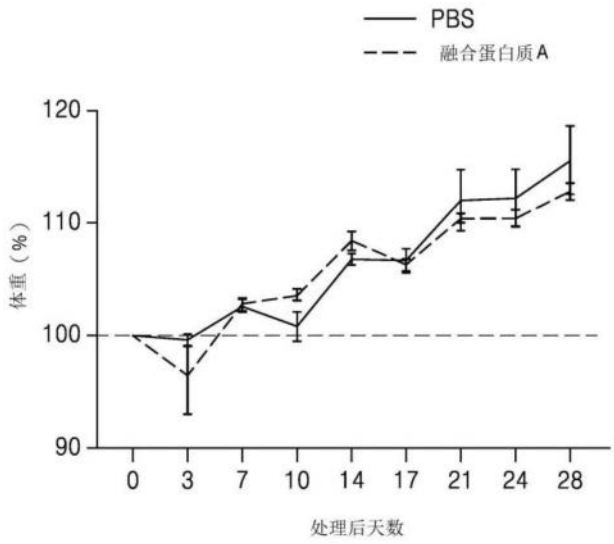

PBS
融合蛋白质A
120
110
100
90
体重（%）
0
3
7
10
14
17
21
24
28
处理后天数

图18c

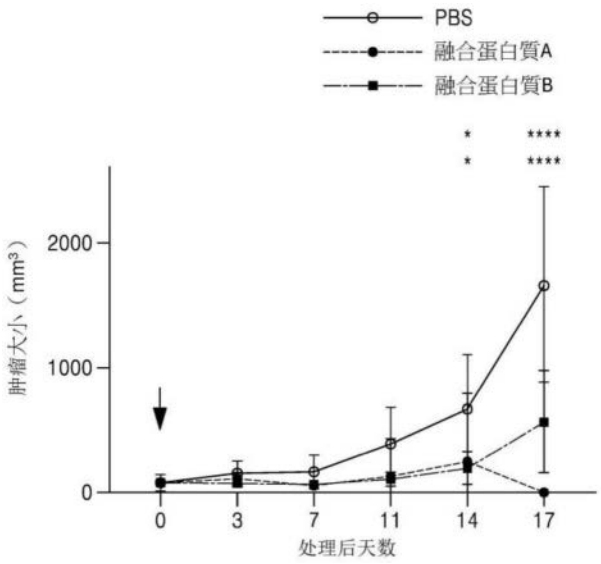

PBS
融合蛋白質A
融合蛋白質B
肿瘤大小（mm³）
2000
1000
0
0
3
7
11
14
17
处理后天数

图19a

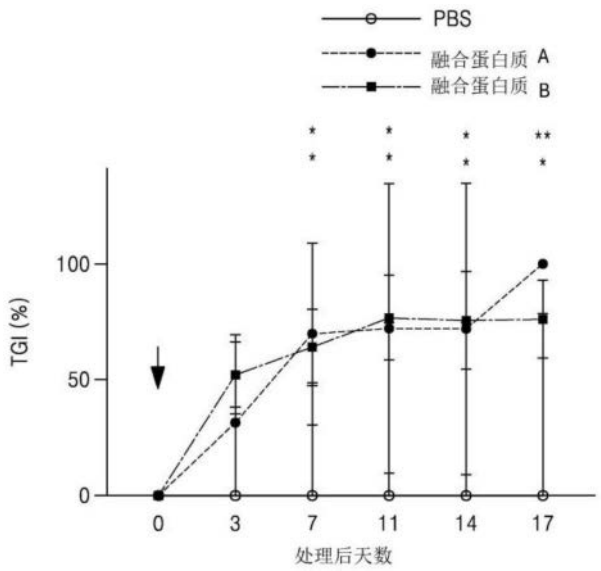

PBS
融合蛋白质 A
融合蛋白质 B
TGI (%)
100
50
0
0
3
7
11
14
17
处理后天数

图19b

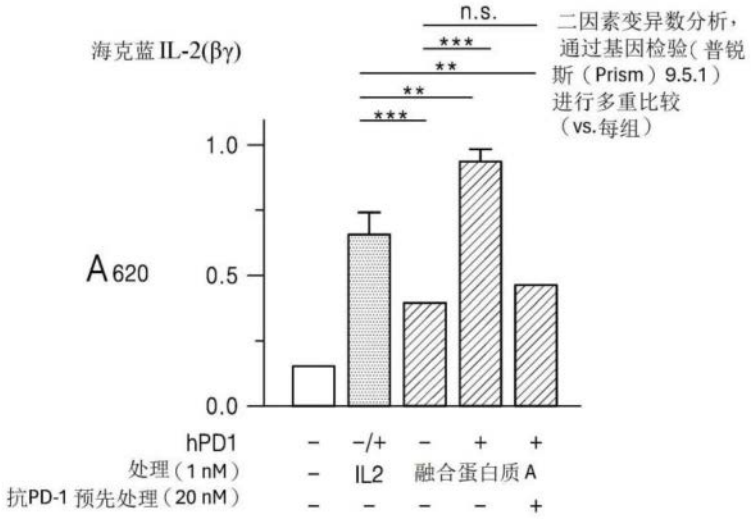

海克蓝 IL-2(βγ)
n.s.
***
**
**
***
二因素变异数分析，
通过基因检验（普锐
斯（Prism）9.5.1）
进行多重比较
（vs.每组）
A620
1.0
0.5
0.0
hPD1 - -/+ - + +
处理（1 nM） - IL2 融合蛋白质 A
抗PD-1 预先处理（20 nM） - - - - +

图20