



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119546626 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 28

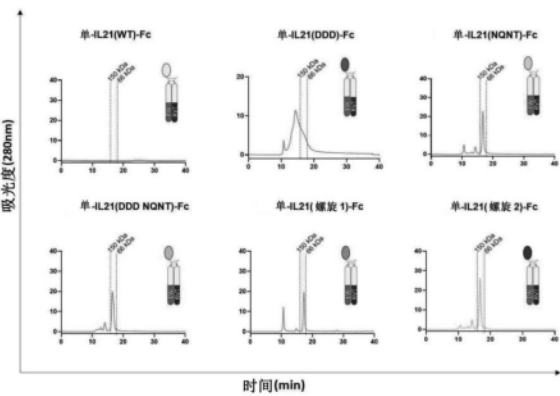
(21) 申请号 202380039123.3	(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
(22) 申请日 2023.05.10	专利代理师 陈桢
(30) 优先权数据 10-2022-0057356 2022.05.10 KR	(51) Int.Cl. C07K 14/54 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2024.11.07	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/KR2023/006343 2023.05.10	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02023/219414 K0 2023.11.16	
(71) 申请人 亚洲大学校产学协力团 地址 韩国京畿道 申请人 高丽大学校产学协力团	
(72) 发明人 金容星 金恩志 金准好 李景美 俞荣嫔	权利要求书3页 说明书25页 序列表(电子公布) 附图11页

(54) 发明名称

白介素21变体和包含该变体的融合蛋白及其用途

(57) 摘要

本发明涉及白介素-21变体、包含该白介素-21变体和抗体重链恒定区的融合蛋白及其用途,并且涉及:野生型白介素-21中的一些氨基酸被置换和/或缺失的白介素-21变体;白介素-21变体与包含第一Fc区和第二Fc区的抗体(免疫球蛋白)重链恒定区(Fc)对融合的融合蛋白;白介素-21变体或融合蛋白用于预防或治疗癌症的用途;以及使用白介素-21变体或融合蛋白培养免疫细胞的方法。



1. 一种白介素21 (IL21) 变体, 其中, 选自由在包括SEQ ID NO.4的氨基酸序列的白介素21 (IL21) 中从N末端起位置50、54、75至88和124处的氨基酸序列组成的组中的一个或多个被置换或缺失。

2. 根据权利要求1所述的白介素21 (IL21) 变体, 其中, 所述白介素21变体包含选自由在SEQ ID NO:4的氨基酸序列中以下氨基酸置换和缺失组成的组中的一个或多个:

- (1) K50N;
- (2) K54Q;
- (3) K75L;
- (4) P76D;
- (5) P77R;
- (6) S78N;
- (7) T79L;
- (8) R83N、R83D、R83L;
- (9) R84K、R84D、R84W;
- (10) Q85G、Q85S;
- (11) K86N、K86L;
- (12) H87A;
- (13) R88T、R88G、R88N;
- (14) R124Q、R124D;
- (15) 位置79至82处的氨基酸缺失; 以及
- (16) 位置81至84处的氨基酸缺失。

3. 根据权利要求1所述的白介素21 (IL21) 变体, 其中, 所述白介素-21变体包含选自由在SEQ ID NO:4的氨基酸序列中以下氨基酸置换和缺失组成的组的一个或多个:

- (1) R83N、R84K、R124Q;
- (2) R83D、R84D、R124D;
- (3) K50N、K54Q、K86N、R88T;
- (4) K50N、K54Q、R83D、R84D、K86N、R88T、R124D;
- (5) K75L、P76D、P77R、S78N和位置79至82处的氨基酸缺失、R83L、R84W、Q85G、K86L、H87A、R88G; 以及
- (6) K75L、P76D、P77R、S78N、T79L、位置81至84处的氨基酸缺失和Q85S、K86L、H87A、R88N。

4. 根据权利要求1所述的白介素21 (IL21) 变体, 其中, 所述白介素21变体包含选自由SEQ ID NO:5至10的序列组成的组的序列。

5. 一种融合蛋白, 包含根据权利要求1至4中任一项所述的白介素21变体。

6. 根据权利要求5所述的融合蛋白, 还包含抗体(免疫球蛋白)重链恒定区(Fc)对, 所述抗体(免疫球蛋白)重链恒定区(Fc)对包括第一Fc区和第二Fc区,

其中, 所述抗体(免疫球蛋白)重链恒定区(Fc)对在所述第一Fc区或所述第二Fc区的CH3结构域中具有突变。

7. 根据权利要求6所述的融合蛋白, 其中, 所述白介素21变体与所述第一Fc区或所述第

二Fc区的N末端结合。

8. 根据权利要求6所述的融合蛋白,其中,所述IL-21或其变体经由接头与所述第一Fc区或所述第二Fc区结合。

9. 根据权利要求8所述的融合蛋白,其中,所述接头包括(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n或(GnS)_m(其中n和m各自为1至10)。

10. 根据权利要求6所述的融合蛋白,其中,所述第一Fc区和所述第二Fc区中的每一个源自选自由人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD和IgE组成的组中的Fc区。

11. 根据权利要求6所述的融合蛋白,其中,所述第一Fc区或所述第二Fc区的CH3结构域的突变包含选自以下突变组成的组中的至少一种,其中突变位置按照EU指数确定:

(1) 所述第一Fc区的CH3结构域中位置K360处的氨基酸置换为K360E;

(2) 所述第一Fc区的CH3结构域中位置K409处的氨基酸置换为K409W;

(3) 所述第二Fc区的CH3结构域中位置E347处的氨基酸置换为E347R;以及

(4) 所述第二Fc区的CH3结构域中位置F405处的氨基酸置换为F405T,以及所述第二Fc区的CH3结构域中位置D399处的氨基酸置换为D399V。

12. 根据权利要求11所述的融合蛋白,其中,所述第一Fc区或所述第二Fc区的CH3结构域进一步包含以下置换的氨基酸,其中突变位置按照EU指数确定:

(i) 所述第一Fc区的CH3结构域中位置Y349处置换的半胱氨酸(C);或

(ii) 所述第二Fc区的CH3结构域中位置S354处置换的半胱氨酸(C)。

13. 根据权利要求6所述的融合蛋白,其中,所述第一Fc区和所述第二Fc区的CH3结构域突变包含以下突变,其中突变位置按照EU指数确定:

(1) 所述第一Fc区的CH3结构域中位置K360处的氨基酸置换为K360E,并且位置K409处的氨基酸置换为K409W;以及

(2) 所述第二Fc区的CH3结构域中位置E347处的氨基酸置换为E347R,位置F405处的氨基酸置换为F405T,并且位置D399处的氨基酸置换为D399V。

14. 根据权利要求6所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白包含:

所述白介素21变体,包括选自由SEQ ID NO:5至10的序列组成的组的序列;以及

所述抗体(免疫球蛋白)重链恒定区(Fc)对,包括第一Fc区和第二Fc区,所述第一Fc区包含SEQ ID NO:1的序列,所述第二Fc区包含SEQ ID NO:2的序列。

15. 一种编码根据权利要求1至4中任一项所述的白介素21变体的核酸。

16. 一种表达载体,包含根据权利要求14所述的核酸。

17. 一种转化重组细胞,包含根据权利要求15所述的表达载体。

18. 一种产生白介素21变体的方法,包括:

(a) 培养根据权利要求16所述的细胞;以及

(b) 从所培养的细胞中收获所述白介素21变体。

19. 一种编码根据权利要求5所述的融合蛋白的核酸。

20. 一种表达载体,包含根据权利要求19所述的核酸。

21. 一种转化重组细胞,包含根据权利要求20所述的表达载体。

22. 一种产生融合蛋白的方法,包括:

(a) 培养根据权利要求21所述的细胞;以及

(b) 从所培养的细胞中收获所述融合蛋白。

23. 一种用于预防或治疗癌症的组合物, 包含根据权利要求1至4中任一项所述的白介素21变体或根据权利要求5至13中任一项所述的融合蛋白作为活性成分。

24. 一种培养方法, 包括用根据权利要求1至4中任一项所述的白介素21变体或根据权利要求5至13中任一项所述的融合蛋白处理免疫细胞。

25. 根据权利要求24所述的培养方法, 其中, 所述免疫细胞包括选自由以下组成的组中的至少一种: T细胞、NK细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)、激活的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)和树突状细胞。

白介素21变体和包含该变体的融合蛋白及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及白介素21变体、包含该白介素21变体和抗体重链恒定区的融合蛋白及其用途,更具体地,涉及:从野生型白介素21中置换和/或缺失一个或多个氨基酸的白介素21变体、将包括第一Fc区和第二Fc区的抗体(免疫球蛋白)重链恒定区(Fc)对与白介素21变体融合的融合蛋白、白介素21变体或融合蛋白用于预防或治疗癌症的用途,以及使用该白介素21变体或融合蛋白培养免疫细胞的方法。

背景技术

[0002] 细胞因子是血液中所含有的相对较小的免疫蛋白。从细胞分泌的细胞因子影响其他细胞或分泌细胞因子的细胞,从而在细胞信号传导中起重要作用。

[0003] 细胞因子是生物调节、诱导细胞增殖和分化以及促进功能和活性变化所必需的蛋白质,并且与免疫系统疾病、过敏、特异性、炎症和各种类型的肿瘤有关。近年来,随着免疫疗法和免疫细胞疗法的发展,在为免疫细胞培养和细胞疗法开发的基础实验中使用的研究和医疗细胞因子蛋白的需求呈指数级增长。

[0004] 白介素-21(IL21)是一种细胞因子。IL21是IL2细胞因子家族的成员,该家族包括IL4、IL7、IL9、IL13和IL15。该家族中的蛋白质已被证明具有抗癌和抗病毒作用两者。

[0005] IL21由激活的辅助性T(CD4⁺辅助性T细胞,TH1)细胞和自然杀伤T(NK-T)细胞产生,并且被认为是免疫的重要调节剂。特别地,IL21激活CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞的增殖和细胞毒性效应功能,这两类淋巴细胞可消灭肿瘤感染的和病毒感染的细胞(Spolski et al.,Nat Rev Drug Discov.2014;13(5):379-95)。此外,IL21刺激一类选定的B细胞。因此,IL21作为诱导免疫细胞(尤其是NK细胞)增殖和活化的细胞因子,对于免疫疗法至关重要。然而,迄今为止,IL-2是唯一获准用于临床直接给药于患者的细胞因子。IL2增加了NK细胞的存活率和活性,且价格相对低廉,但其缺点是会通过激活调节性T细胞(其是一种免疫抑制细胞)来抑制抗癌免疫功能。因此,迫切需要将激活NK细胞而不激活调节性T细胞的细胞因子商业化。

[0006] 在这方面,IL21最近在抗癌免疫疗法中备受关注。IL21与IL2类似,促进了CD4-阳性T细胞和CD8-阳性T细胞的增殖和分化。另一方面,据报道IL21不会影响调节性T细胞的增殖,因此预计其将与抗癌免疫细胞疗法联合给药(Al-Chami et al.,Cytokine,2016;82:33-37)。此外,IL21促进了CD8⁺T细胞分化为记忆细胞(Li et al.,Journal of Immunology,2005),并且特别地,最近的研究报道称,IL21与HDAC抑制剂一起给药时诱导了分化的T细胞的遗传重编程并获得了稳定的记忆相关转录特征(增加的Lef1和Tcf7),从而能够去分化为记忆细胞(Wang et al.,Cancer Immunology Research,2020)。据报道,IL21对NK细胞具有以下影响:1)当存在FMS样酪氨酸激酶-3(FLT3-L)时,IL21与IL15一起促进源自人CD34-阳性造血祖细胞的NK细胞增殖(Parrish-Novak et al.Nature,2000;408(6808):57-63),2)当膜结合形式IL21在用作营养细胞系的K562细胞中表达时,它促进NK细胞的体外扩增并抑制衰老(Lee DA et al.PlosOne,2012;7(1):e30264),3)当培养犬NK细

胞时,促进通过IL2和IL15的增殖(Shin et al.,Vet Immunol Immunopathol.2015;165(1):1-13),4)通过激活人NK细胞中的STAT3促进NKG2D受体的表达(Zhu et al.,Blood,2014;124(3):403-411)等。

[0007] 重组人IL21在临床前和临床试验中表现出抗肿瘤活性。然而,当全身给药时,IL21的半衰期较短,并被难以靶向肿瘤位点的表达IL21受体的其他免疫细胞消耗,并且不可避免地以高浓度给药。此外,IL21的1期临床试验因多效功能同时作用于各种免疫细胞而导致的毒性而失败(Petrella et al.,Journal of Clinical Oncology,2013)。已经进行了若干次尝试来克服这些缺点。为了增加半衰期,提出了一种单-IL21-Fc融合蛋白,其中IL21以单体形式与抗体的异二聚重链恒定区(异二聚Fc)结合(韩国专利号10-1928981;美国专利号US10800825B2)。此外,还尝试开发IL21与靶向肿瘤的抗体融合的免疫细胞因子(抗体-细胞因子缀合物)(Shen et al.Front.Immunol.2020;11:832)。然而,IL21的蛋白质结构有许多带正电荷的氨基酸暴露在表面上,与IL2和IL4相比,存在稳定性降低的问题。问题是,当全身给药时,IL21会分布到体内的其他细胞和组织中,并容易分解,从而导致血清半衰期短,最终导致药代动力学不良,因此不适合用作治疗剂。为了解决这些问题,人们尝试在重组IL21中引入能够降低正电荷的突变并赋予其他结构稳定性(美国专利号US8,475,784B2;Bondensgaard et al.J.BioI.Chem.2007;282(32):23326-23336)。尽管如此,仍然需要开发能够改善IL21物理特性并提供长半衰期的突变体。

[0008] 自然界中存在的人抗体(免疫球蛋白G(IgG)、IgM、IgD、IgE、IgA)以两条具有相同氨基酸序列的重链和两条具有相同序列的轻链的组装形式存在。在这种情况下,两个相同的重链之间的同源二聚化是由抗体恒定区最后几个结构域(IgG、IgD和IgA的CH3结构域,IgM的CH4结构域,IgE的CH2和CH4结构域)之间的非共价相互作用以及铰链区之间的二硫键引起的。

[0009] 抗体源性的异二聚重链恒定区(异二聚Fc)是一种通过工程形成异二聚重链恒定区的技术,通过在恒定区最后几个结构域之间的相互作用表面形成特定的非共价键,赋予有利于异二聚化、不利于或拒绝同源二聚化的键,这对先前天然存在的抗体(IgG、IgM、IgA、IgD和IgE)的同源二聚化有很大贡献。更具体地,异二聚Fc技术通过基因工程在两个不同抗体重链的CH3结构域中诱导突变,以形成具有两条重链的异二聚体,类似于天然抗体,并且序列偏差最小。本文使用的EW-RVT异二聚Fc突变体,作为一种新型的策略性突变体,是通过以下促进了异二聚体的形成的突变体:通过对常规突变体相互作用的序列和结构分析,在CH3结构域相互作用表面(K360E CH3A-Q347R CH3B)处形成选择性静电键,以及形成互补的疏水键而不是常规的静电键(K409W CH3A-D399V CH3B/F405T CH3B)(美国专利号9,951,145;韩国专利号1,522,954;Choi HJ et al.Molecular Cancer Therapeutics,2013;12(12):2748-2759)。常规的单-IL21-Fc融合蛋白是基于在铰链-CH2-CH3区中引入人IgG1、IgG2和IgG4的序列的EW-RVT异二聚Fc(γ 1/2/4,EW-RVT)而产生的(韩国专利号10-1928981;美国专利号US 10800825B2)。由此产生的单-IL21-Fc融合蛋白与IL21与野生型Fc(γ 1/2/4)融合的双-IL21-Fc相比,能够表现出更优异的NK细胞增殖促进功能,并且通过以合理的频率向体内给药,能够诱导与可溶性IL21或双-IL21-Fc相比更优异的抗肿瘤作用(韩国专利号10-1928981;美国专利号US10800825B2)。

[0010] 对IL21的分子结构分析结果表明,与影响CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞和自然杀伤

(NK) 细胞增殖和激活调控的细胞因子 (IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IFN) 相比,带正电荷侧链的氨基酸相对丰富,最终IL21的等电点 (pI) 为9.42,因此在体内pH条件下带正电荷。此外,预测三级结构表面上带正电荷的氨基酸形成的离子斑块可能与体内各种受体和细胞发生非特异性相互作用,从而导致给药于该体内时有不利影响。

[0011] 在这些技术背景和限制下,本发明人开发了一种白介素21变体,其中在野生型白介素21中一个或多个氨基酸被置换和/或缺失,以及一种融合蛋白,该融合蛋白是含有白介素21变体的异二聚体,以及包括第一Fc区和第二Fc区的抗体(免疫球蛋白)重链恒定区 (Fc) 对,其中第一Fc区或第二Fc区的CH3结构域具有突变。基于此,完成了本发明。与常规的单-IL21-Fc融合蛋白相比,根据本发明开发的突变体被发现具有优异的生物活性和抗肿瘤活性。

发明内容

[0012] 因此,本发明正是鉴于上述问题而做出的,本发明的一个目的是提供一种白介素21变体,其中一个或多个氨基酸序列从野生型白介素21中被置换或缺失。

[0013] 本发明的另一个目的是提供一种含有所述白介素21变体和抗体(免疫球蛋白)重链恒定区 (Fc) 对的融合蛋白。

[0014] 本发明的另一个目的是提供一种编码所述白介素21变体或融合蛋白的核酸。

[0015] 本发明的另一个目的是提供一种含有所述核酸的表达载体。

[0016] 本发明的另一个目的是提供一种含有所述表达载体的转化重组细胞。

[0017] 本发明的另一个目的是提供一种产生所述白介素21变体或融合蛋白的方法。

[0018] 本发明的另一个目的是提供含有所述白介素21变体或融合蛋白作为活性成分的用于预防或治疗癌症的组合物。本发明的另一个目的是提供含有所述白介素21变体或融合蛋白作为活性成分的用于预防或治疗癌症的方法。本发明的另一个目的是提供所述白介素21变体或融合蛋白在制备用于预防或治疗癌症的组合物中的用途。

[0019] 本发明的另一个目的是提供一种预防或治疗癌症的方法,包括向患者给药所述白介素21变体或融合蛋白。

[0020] 本发明的另一个目的是提供一种培养方法,包括用所述白介素21变体或融合蛋白处理免疫细胞。

[0021] 根据本发明的一个方面,上述目的和其他目的可以通过提供白介素21 (IL21) 变体来实现,其中,其选自由在包括SEQ ID NO.4的氨基酸序列的白介素21 (IL21) 中从N末端起位置50、54、75至88和124处的氨基酸序列组成的组中的一个或多个被置换或缺失。

[0022] 根据本发明的另一个方面,提供了一种融合蛋白,其为异二聚体,含有所述白介素21变体以及包括第一Fc区和第二Fc区的抗体(免疫球蛋白)重链恒定区 (Fc) 对,其中,Fc对在第一Fc区或第二Fc区的CH3结构域中具有突变。

[0023] 根据本发明的另一个方面,提供了一种编码所述白介素21变体或融合蛋白的核酸。

[0024] 根据本发明的另一个方面,提供了一种含有所述核酸的表达载体。

[0025] 根据本发明的另一个方面,提供了一种含有所述表达载体的转化重组细胞。

[0026] 根据本发明的另一个方面,提供了一种产生白介素21变体或融合蛋白的方法,包

括:

[0027] (a) 培养细胞;以及 (b) 从所培养的细胞中收获所述白介素21变体或融合蛋白。

[0028] 根据本发明的另一个方面,提供了一种含有所述白介素21变体或融合蛋白作为活性成分的用于预防或治疗癌症的组合物。根据本发明的另一个方面,提供了一种用于预防或治疗癌症的方法,包括向患者给药所述白介素21变体或融合蛋白。根据本发明的另一个方面,提供了所述白介素21变体或融合蛋白在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途。

[0029] 根据本发明的另一个方面,提供了培养方法,包括用所述白介素21变体或融合蛋白处理免疫细胞。

附图说明

[0030] 图1A是示出通过将人IL21细胞因子以单价单体的形式引入EW-RVT异二聚Fc而构建的单-IL21-Fc融合蛋白(IL21单体-Fc融合蛋白)的示意图。本文使用的EW-RVT异二聚Fc是具有引入了EW-RVT突变的人IgG1的铰链区序列和人IgG4的CH2-CH3区的Fc($\gamma 1/4$)。“单”意指单体。

[0031] 图1B是示出通过将人IL21细胞因子以二价二聚体形式引入野生型Fc而构建的双-IL21-Fc融合蛋白(IL21二聚体-Fc融合蛋白)的示意图,作为图1A的比较例。本文使用的野生型Fc是具有人IgG1的铰链区序列和人IgG4的CH2-CH3区的Fc($\gamma 1/4$)。“双”意指二价二聚体。

[0032] 图2是示出用于在动物细胞中表达和纯化图1A的融合蛋白的Fc($\gamma 1/4$)表达载体的CH3A(EW)和CH3B(RVT)的示意图。

[0033] 图3示出了通过共转染在HEK293F细胞中瞬时表达并纯化指定的野生型Fc($\gamma 1/4$, WT)、异二聚重链恒定区Fc($\gamma 1/4$, EW-RVT)以及双-IL21-Fc和单-IL21-Fc(单-IL21-Fc融合蛋白中,用于动物细胞转化的表达载体CH3A(EW)与CH3B(RVT)的比=1:1、1.5:1、2:1)融合蛋白,在非还原和还原条件下在10%SDS-PAGE上分离5 μ g的蛋白,并通过考马斯亮蓝染色分析其大小和结合形式的结果。“非还原”意指非还原条件,“还原”意指还原条件,并且“M”意指蛋白标志物。

[0034] 图4示出了构建的单-IL21-Fc融合蛋白(用于动物细胞转化的表达载体CH3A(EW)与CH3B(RVT)的比=1:1、1.5:1、2:1)与野生型Fc($\gamma 1/4$, WT)及异二聚重链恒定区Fc($\gamma 1/4$, EW-RVT)的尺寸排阻色谱法(SEC)分析的结果。SEC分析中,运行缓冲液为1X PBS(pH 7.4, 12mM磷酸盐,137mM NaCl,2.7mM KCl),流速为0.75ml/min,以及蛋白注入量为30 μ g(以1mg/ml注入30 μ l)。

[0035] 图5示出了使用Chimera X程序可视化的人IL21野生型(PDB ID:3tgx)的结构,其中每个氨基酸侧链根据其特征用指定的颜色突出显示。蓝色代表具有带正电荷侧链的氨基酸,红色代表具有带负电荷侧链的氨基酸,灰色代表具有疏水侧链的氨基酸,以及绿色代表其他氨基酸。

[0036] 图6A示出了使用尺寸排阻色谱法分析构建的单-IL21-Fc融合蛋白的结果。在尺寸排阻色谱法中,运行缓冲液为1X PBS(pH 7.4,137mM NaCl),流速为0.75ml/min,以及蛋白注入量为30 μ g(以1mg/ml注入30 μ l)。

[0037] 图6B示出了使用尺寸排阻色谱法分析构建的单-IL21-Fc融合蛋白的结果。在尺寸

排阻色谱法中,运行缓冲液为高盐PBS (pH 7.4,12mM磷酸盐,2.7mM KCl,500mM NaCl),流速为0.75ml/min,以及蛋白注入量为30 μ g (以1mg/ml注入30 μ l)。

[0038] 图7示出了本发明中构建的IL21氨基酸置换变体的序列与人野生型IL21相比的变化序列,以及有关命名法和依据的图像。

[0039] 图8示出了通过共转染在HEK293F细胞中瞬时表达并纯化作为单-IL21-Fc融合蛋白氨基酸置换变体的单-IL21 (NKQ) -Fc和单-IL21 (DDD) -Fc,以及作为对照的单-IL21-Fc融合蛋白,在非还原和还原条件下在10%SDS-PAGE上分离5 μ g的蛋白,并通过考马斯亮蓝染色分析其大小和结合形式的结果。“非还原”意指非还原条件,“还原”意指还原条件,并且“M”意指蛋白标志物。

[0040] 图9示出了作为单-IL21-Fc融合蛋白氨基酸置换变体的单-IL21 (DDD) -Fc、单-IL21 (NKQ) -Fc和单-IL21 (NQNT) -Fc以及作为对照组的单-IL21-Fc融合蛋白的尺寸排阻色谱法 (SEC) 分析的结果。SEC分析中,运行缓冲液为1X PBS (pH 7.4,12mM磷酸盐,137mM NaCl,2.7mM KCl),流速为0.75ml/min,以及蛋白注入量为30 μ g (以1mg/ml注入30 μ l)。

[0041] 图10示出了本发明中构建的IL21直系同源序列移植变体的序列与人野生型IL21相比的变化序列,以及有关其命名法和依据的图像。

[0042] 图11示出了通过共转染在HEK293F细胞中瞬时表达并纯化作为单-IL21-Fc融合蛋白直系同源序列移植变体的单-IL21 (螺旋1) -Fc和单-IL21 (螺旋2) -Fc以及作为对照的单-IL21-Fc融合蛋白,然后在非还原和还原条件下在10%SDS-PAGE上分离5 μ g的蛋白,并通过考马斯亮蓝染色分析其大小和结合形式的结构。“非还原”意指非还原条件,“还原”意指还原条件,并且“M”意指蛋白质标志物。

[0043] 图12示出了作为单-IL21-Fc融合蛋白直系同源序列移植变体的单-IL21 (螺旋1) -Fc和单-IL21 (螺旋2) -Fc,以及作为对照的单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21 (DDD) -Fc、单-IL21 (NQNT) -Fc和单-IL21 (DDD NQNT) -Fc的尺寸排阻色谱法分析的结果。在SEC分析中,运行缓冲液为1X PBS,运行缓冲液的流速为0.75ml/min,以及蛋白注入量为30 μ g (以1mg/ml注入30 μ l)。

[0044] 图13示出了使用FACS分析的单-IL21-Fc融合蛋白和单-IL21-Fc融合蛋白变体的IL21与细胞表面上IL21受体的结合亲和力。将用40nM和200nM浓度的单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21 (NKQ) -Fc、单-IL21 (DDD) -Fc和野生型Fc处理表达人IL21受体的Jurkat细胞系 (人CD4+T-细胞系),用抗人IgG4抗体和与荧光物质FITC融合的抗体进行荧光标记,然后使用FACScalibur测量荧光强度。

[0045] 图14示出了单-IL21-Fc融合蛋白和单-IL21-Fc融合蛋白变体对NK细胞增殖的影响的鉴定结果。在100灰色 γ 辐照的Jurkat (KL-1) 细胞和EBV转化的LCL细胞的存在下,通过将IL-2 (30ng/ml的单体IL-2Fc) 添加到从正常血液中分离的PBMC来培养NK细胞。

[0046] 图14A: NK细胞培养方法和时间表的时间线。

[0047] 图14B: 示出第0、6和14天获得的NK细胞产量和百分比的表格。

[0048] 图14C: 示出第0、6和14天获得的NK细胞产量的线图。

[0049] 图14C: 示出第0、6和14天获得的NK细胞产量的条形图。

[0050] 图15示出了单-IL21-Fc融合蛋白和单-IL21-Fc融合蛋白变体对NK细胞增殖的影响的鉴定结果。在100灰色 γ 辐照的Jurkat (KL-1) 细胞和EBV转化的LCL细胞的存在下,通过

将IL-2 (30ng/ml的单体IL-2Fc)添加到从中去除CD4/CD8 T细胞的PBMC来培养NK细胞。

[0051] 图15A: NK细胞培养方法和时间表的时间线。

[0052] 图15B: 示出第0、6和14天获得的NK细胞产量和百分比的表格。

[0053] 图15C: 示出第0、6和14天获得的NK细胞产量的线图。

[0054] 图15C: 示出第0、6和14天获得的NK细胞产量的条形图。

具体实施方式

[0055] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员所理解的含义。一般而言,本文所用命名法是本领域熟知的并且是通常使用的。

[0056] 在一个方面,本发明涉及白介素21 (IL21) 变体,其中,选自由在包括SEQ ID NO.4的氨基酸序列的白介素21 (IL21) 中从N末端起位置50、54、75至88和124处的氨基酸序列组成的组中的一个或多个被置换或缺失。

[0057] 白介素21 (IL21) 变体可以包括SEQ ID NO:4的人IL21中的一个或多个氨基酸置换或缺失,其包括对应于人IL21细胞因子成熟形式序列的氨基酸残基1至131 (本文表示为“位置1-131”,不包括信号肽和前肽)。

[0058] 这通过包括以下的方法实现: (1) 通过IL21结构分析选择可能导致特性劣化的氨基酸序列和区; (2) 设计要置换的氨基酸以改善所选氨基酸位置和区中的特性; 以及 (3) 将所设计的IL21变体与异二聚重链恒定区Fc (γ 1/4, EW-RVT) 融合,随后表达/纯化,然后分析生物学特性。

[0059] 对治疗性蛋白质候选物的特性的鉴定和改善对于生产治疗性蛋白质非常重要。治疗性蛋白质的特性可能影响蛋白质的治疗功效、药效学和副作用。治疗性蛋白质的特性可能由于蛋白质在体内的净电荷、疏水性程度和折叠不当而降低。当体内净电荷为强正电荷或强负电荷或在体内具有强疏水性而不能溶解水性环境中,或蛋白质在体内不能保持适当的折叠状态时,特性可能会劣化。此问题可以通过选择和交替地使导致特性劣化的氨基酸突变同时保持蛋白质的结构和功能来克服。

[0060] 人IL21具有四螺旋(螺旋A、B、C至D) 结构,该结构按1类细胞因子的典型方式上-上-下-下排列,以及具有连接螺旋结构的环结构。从结构特点上看,人IL21成熟形式序列中,氨基酸4至23形成螺旋A,氨基酸41至56形成螺旋B,氨基酸62至74形成螺旋C,以及氨基酸102至120形成螺旋D。在与IL21受体结合时,14个IL21残基与16个IL21受体残基形成范德瓦尔斯键,其中IL21螺旋A序列中的精氨酸3、精氨酸7和谷氨酰胺10,以及螺旋C序列中的精氨酸74和赖氨酸71是已知最重要的氨基酸。在本发明中,为了在不影响野生型IL21结构和功能的情况下改善体内生物学特性,使用了氨基酸置换策略和直系同源序列移植策略。

[0061] 具体地,白介素-21变体可以包括选自由在SEQ ID NO:4的氨基酸序列中以下氨基酸置换和缺失组成的组的一个或多个氨基酸置换或缺失:

[0062] (1) K50N,

[0063] (2) K54Q,

[0064] (3) K75L,

[0065] (4) P76D,

[0066] (5) P77R,

[0067] (6) S78N,

[0068] (7) T79L,

[0069] (8) R83N、R83D、R83L,

[0070] (9) R84K、R84D、R84W,

[0071] (10) Q85G、Q85S,

[0072] (11) K86N、K86L,

[0073] (12) H87A,

[0074] (13) R88T、R88G、R88N,

[0075] (14) R124Q、R124D,

[0076] (15) 位置79至82处的氨基酸缺失,以及

[0077] (16) 位置81至84处的氨基酸缺失。

[0078] 具体地,白介素21变体可以包括选自由在SEQ ID NO:4的氨基酸序列中以下氨基酸置换和缺失组成的组的一个或多个氨基酸置换和/或缺失:

[0079] (1) R83N、R84K、R124Q;

[0080] (2) R83D、R84D、R124D;

[0081] (3) K50N、K54Q、K86N、R88T;以及

[0082] (4) K50N、K54Q、R83D、R84D、K86N、R88T、R124D。

[0083] 根据本发明,通过用互补人IL4序列和直系同源IL4序列替换包括IL21的非典型区的K75至R88序列,构建了单-IL21-Fc融合蛋白直系同源序列移植变体。基于此,白介素21变体可以包括选自由在SEQ ID NO:4的氨基酸序列中以下氨基酸置换和/或缺失组成的组的一个或多个氨基酸置换和/或缺失:

[0084] (1) K75L、P76D、P77R、S78N和位置79至82处的氨基酸缺失、R83L、R84W、Q85G、K86L、H87A、R88G;以及

[0085] (2) K75L、P76D、P77R、S78N、T79L、位置81至84处的氨基酸缺失和Q85S、K86L、H87A、R88N。

[0086] 在具体实施方式中,白介素21变体可以包括选自由SEQ ID NO:5至10的序列组成的组的序列。

[0087] 如本文所用,术语“突变(或变异)”是指对蛋白质的修饰,其包括用具有相似生化特性的氨基酸替换氨基酸,但不会导致蛋白质的结构和生物或生化功能的丧失。术语“氨基酸置换”是指用具有结构上保持氨基酸但具有不同化学特性的侧链的氨基酸替换氨基酸的置换。天然存在的氨基酸可以分为具有表现出相似特性的侧链的氨基酸,这是本领域所熟知的。这些类别包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸和谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸和色氨酸)、具有 β -支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸和异亮氨酸)以及具有芳香族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸)。本发明提供了通过人IL21的氨基酸置换构建的IL21变体,并显示该IL21变体保留了活性。

[0088] 本文所用的术语“直系同源序列移植”意指参照与IL21同属一个家族的细胞因子

(IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15)的特定序列区,在IL21的相同位置置换氨基酸。对IL21的结构分析结果显示,从螺旋C到螺旋D的CD环结构和C末端区是结构不确定的非典型区。虽然非典型区形成的原因有多种,但最大的原因是形成了不稳定的结构。因此,推测将预期形成最稳定结构的CD环的序列(参考与IL21同属一个家族的细胞因子序列)移植到该区中而构建的IL21突变体将具有比野生型改善的特性。

[0089] 本发明的人IL21变体不仅可以包括本文公开的IL21变体的序列,还可以包括其生物学等效物,只要其能够保持预期的功能即可。例如,可以对抗体的氨基酸序列进行额外的变异,以进一步改善IL21的物理特性或其他生物学特性。这种变异包括,例如,抗体的氨基酸序列残基的缺失、插入和/或置换。这样的氨基酸突变是基于氨基酸序列残基置换基的相对相似性,诸如其疏水性、亲水性、电荷和大小。通过分析置换基的大小、形状和类型可以看出,精氨酸、赖氨酸和组氨酸都是带正电荷的残基;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸具有相似的大小;以及苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸具有相似的形状。因此,基于这些考虑,精氨酸、赖氨酸和组氨酸;丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸;以及苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸被认为是生物功能等效物。

[0090] 在另一个方面,本发明涉及一种融合蛋白,其为异二聚体,含有白介素21变体以及包括第一Fc区和第二Fc区的抗体(免疫球蛋白)重链恒定区(Fc)对,其中,Fc对在第一Fc区或第二Fc区的CH3结构域中具有突变。

[0091] 本发明涉及白介素-21(IL21)细胞因子以单体形式与抗体异二聚重链恒定区Fc融合的融合蛋白(以下称为“IL21单体-Fc融合蛋白”、“异二聚Fc融合IL21单体蛋白”或“单-IL21-Fc融合蛋白”),或者白介素-21变体以单体形式与抗体异二聚重链恒定区Fc融合的融合蛋白(以下称为“IL21单体-Fc融合蛋白变体”、“异二聚Fc融合IL21变体单体蛋白”或“单-IL21-Fc融合蛋白变体”)。

[0092] 本发明还涉及白介素-21(IL21)细胞因子以二聚体形式与抗体异二聚重链恒定区Fc(异二聚Fc)融合的融合蛋白(称为“IL21二聚体-Fc融合蛋白变体”、“异二聚Fc融合IL21变体二聚蛋白”或“二聚体-IL21-Fc融合蛋白变体”)。

[0093] 作为白介素-21变体,突变体是通过野生型IL21进行氨基酸突变进行设计来降低IL21的非特异性反应性以及增加结构稳定性,使得当突变体以单-IL21-Fc融合蛋白变体形式表达时,融合蛋白的表达量增加,在生理条件下减少不良低聚物的形成,并改善生物学特性,使其可以以单体形式存在。

[0094] 具体地,本发明提供了一种开发与单-IL21-Fc融合蛋白相比具有改善的生物学特性的IL21变体的技术,所述单-IL21-Fc融合蛋白是野生型IL21的融合蛋白,但具有改善的特性以保留与细胞表面上表达的IL21受体的结合能力和免疫细胞的增殖能力。

[0095] 本发明提供了一种开发单-IL21-Fc融合蛋白变体的技术,该单-IL21-Fc融合蛋白变体包括IL21变体,该IL21变体可以:1)减少可能在体内发生的副作用,2)改善药代动力学,3)代替由于重组蛋白IL21细胞因子的半衰期短而需要的频繁生物给药,以及4)通过减少单-IL21-Fc融合蛋白在生理条件下的非特异性相互作用来解决成本高的缺点,该单-IL21-Fc融合蛋白是含有野生型IL21的融合蛋白。

[0096] 首先,构建单-IL21-Fc融合蛋白单体融合蛋白,其中将野生型IL21与基于具有人IgG1的铰链区序列和人IgG4的CH2-CH3区的Fc(γ 1/4)引入了EW-RVT突变的异二聚重链恒

定区EW-RVT异二聚Fc(γ 1/4,EW-RVT)融合。然后,分析野生型IL21的结构,选择可能影响蛋白质物理特性和特异性的序列,并设计突变体,其中氨基酸单元被置换或插入了同一系列细胞因子的序列。将该突变体以单-IL21-Fc融合蛋白的形式表达,以开发能够增加表达量、减少生理条件下不良低聚物的形成并以单体形式存在的单-IL21-Fc融合蛋白变体。

[0097] 本文使用了EW-RVT异二聚Fc(γ 1/4,EW-RVT),其基于具有IgG1铰链区序列和人IgG4的CH2-CH3区的Fc(γ 1/4)引入了EW-RVT突变。此外,使用具有人IgG1的铰链区序列和人IgG4的CH2-CH3区的野生型Fc(γ 1/4,WT)构建双-IL21-Fc融合蛋白(IL21二聚体-Fc融合蛋白)作为比较例并进行比较。

[0098] 基于此,本发明提供了单-IL21-Fc融合蛋白变体,其中单-IL21-Fc融合蛋白的野生型IL21氨基酸序列被替换或移植了直系同源物的细胞因子序列。更具体地,构建IL21以开发单-IL21-Fc融合蛋白变体的机制是:1)通过降低IL21蛋白的表面正电荷,产生在体内具有更长半衰期的融合蛋白,其改善了物质的稳定性,减少了体内的非特异性相互作用,并且在体内具有更长的半衰期;2)通过将可能导致IL21结构不稳定的序列移植到与IL21同属一个家族的细胞因子IL-2和IL-4的序列中,并比较IL-2和IL-4的序列,确认融合蛋白模拟了IL-2和IL-4在体内更好的稳定性;以及3)确认了与单-IL21-Fc融合蛋白相比时,在表达人IL21受体的细胞系中保持了受体结合能力。基于此机制,完成了本发明。

[0099] 根据本发明的含有白介素21变体的异二聚Fc融合蛋白变体通过维持其结构,提供了能够维持常规单-IL21-Fc融合蛋白的功能和活性的蛋白质。

[0100] 本文所用的“Fc区”是指包括源自抗体的CH2结构域、CH3结构域和铰链结构域的区域。本文所用的“第一Fc区和第二Fc区突变以促进异二聚重链恒定区(异二聚Fc)形成”意指天然体系中存在的抗体具有同二聚重链恒定区(同二聚Fc)形式,其中两个Fc区具有相同序列,通过诱导该Fc区的一部分序列的突变,则通过第一Fc区和第二Fc区之间的特定的非共价键促进了异二聚重链恒定区(异二聚Fc)的形成,并且减少或优选几乎不形成同二聚体。

[0101] 优选地,促进根据本发明的第一Fc区和第二Fc区的异二聚重链恒定区(异二聚Fc)形成的突变可以包括促进源自抗体的第一Fc区和第二Fc区中所包括的CH3结构域中的每一个的异二聚重链恒定区(异二聚Fc)形成的突变。

[0102] 本发明中,异二聚重链恒定区包括第一Fc区和第二Fc区,并且第一Fc区和第二Fc区的特征在于,CH3结构域发生突变以促进形成异二聚重链恒定区。

[0103] 第一Fc区或第二Fc区的CH3结构域突变包括选自以下突变中的至少一种突变,并且突变位置按照EU指数(EU index)确定:

[0104] (1) 第一Fc区的CH3结构域中位置K370处的置换为K370E、K370R、K370M、K370D或K370H;

[0105] (2) 第一Fc区的CH3结构域中位置K409处置换为K409W;

[0106] (3) 第二Fc区的CH3结构域中位置E357处置换为E357N、E357D、E357A、E357I、E357G或E357M,位置S364处置换为S364T或S364W;以及

[0107] (4) 第二Fc区的CH3结构域中位置F405处置换为F405T,位置D399处置换为D399V。

[0108] 第一Fc区或第二Fc区的CH3结构域可以进一步包括以下置换的氨基酸,并且突变位置按照EU指数确定:

[0109] (i) 第一Fc区的CH3结构域中位置Y349处置换的半胱氨酸(C);或

[0110] (ii) 第二Fc区的CH3结构域中位置S354处置换的半胱氨酸(C)。

[0111] 具体地,第一Fc区或第二Fc区的CH3结构域的突变可以包括选自以下突变中的一种或多种突变(前提是突变位置按照EU指数确定):

[0112] (1) 将第一Fc区的CH3结构域中位置K360处的氨基酸残基置换为K360E;

[0113] (2) 将第二Fc区的CH3结构域中位置E347处的氨基酸残基置换为E347R;

[0114] (3) 将第一Fc区的CH3结构域中位置K409处的氨基酸残基置换为K409W;以及

[0115] (4) 将第二Fc区的CH3结构域中位置F405处的氨基酸残基置换为F405T,位置D399处的氨基酸残基置换为D399V。

[0116] 第一Fc区或第二Fc区的CH3结构域可以进一步包括以下置换的氨基酸,并且突变位置可按照EU指数确定:

[0117] (i) 第一Fc区的CH3结构域中位置Y349处置换的半胱氨酸(C);或

[0118] (ii) 第二Fc区的CH3结构域中位置S354处置换的半胱氨酸(C)。

[0119] 根据本发明的具体实施方式中,第一Fc区和所述第二Fc区的CH3结构域突变包括:(1)所述第一Fc区的CH3结构域中位置K360处置换为K360E,所述第一Fc区的CH3结构域中位置K409处置换为K409W;以及(2)所述第二Fc区的CH3结构域中位置E347处置换为E347R,位置F405处置换为F405T,位置D399处置换为D399V,并且突变位置按照EU指数确定(以下称为“EW-RVT”)。

[0120] 本文所用的术语“EW-RVT异二聚Fc”意指基于具有人IgG1的铰链区序列和人IgG4的CH2-CH3区的Fc($\gamma 1/4$)将EW-RVT突变引入其中的EW-RVT异二聚Fc($\gamma 1/4$,EW-RVT)。

[0121] 优选地,在根据本发明的抗体源性的第一Fc区和第二Fc区所包括的CH3结构域可具有选自由SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所表示的氨基酸序列组成的组中的序列。

[0122] 第一Fc区和第二Fc区可源自选自由人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD和IgE组成的组的Fc区,优选地,第一Fc区和第二Fc区可源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4,并且第一Fc区和第二Fc区可源自同种型抗体。

[0123] 特别地,根据本发明的抗体源性的第一Fc区和第二Fc区优选具有表1中所述的源自IgG4的CH3结构域的序列。

[0124] 本文所用的术语“ $\gamma 1/4$ ”意指其中铰链区使用由于其稳定性高而在商业治疗性抗体中广泛采用的IgG1同种型,CH2和CH3区使用防止发生抗体特异性功能诸如不需要的ADCC(抗体依赖性细胞毒性)/CDC(补体依赖性细胞毒性)的IgG4同种型的抗体重链恒定区结构域,并且与其融合的Fc称为“Fc($\gamma 1/4$)”。

[0125] [表1]

	CH3A	CH3B
构型	第一Fc区的CH3序列	第二Fc区的CH3序列
	(EU 号 341-447)	(EU 号 341-447)
[0126] IgG4-EW/RVT	GQPREPQVYTLPPSQEEMTENQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS WLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 1)	GQPREPRVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFTLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 2)
IgG4	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEAL	-
WT	HNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 3)	

[0127] 具体地,根据本发明的融合蛋白可以包括白介素21变体,该变体包括选自SEQ ID NOS:5至10的序列组成的组的序列,以及包括包含第一Fc区和第二Fc区的抗体(免疫球蛋白)重链恒定区(Fc)对,该第一Fc区包括SEQ ID NO:1的序列,该第二Fc区包括SEQ ID NO:2的序列。

[0128] 在另一个方面,本发明涉及编码白介素21变体或融合蛋白的核酸。可以分离编码本发明的白介素21变体或融合蛋白的核酸以重组产生白介素21变体或融合蛋白。

[0129] 本文所用的术语“核酸”旨在涵盖DNA(gDNA和cDNA)和RNA分子两者,并且作为核酸基本组成单位的核苷酸包括天然来源的核苷酸以及具有经修饰的糖或碱基部分的类似物。编码根据本发明的IL21变体的核酸的序列可以发生变异。这种变异包括核苷酸的添加、缺失或非保守或保守置换。

[0130] 可以使用常规分子生物学技术(例如,通过使用可以与CH3A(EW)和CH3B(RVT)DNA特异性结合的寡核苷酸探针)容易地分离或合成编码白介素21变体或融合蛋白的DNA,并且分离该核酸,插入可复制的载体中,进一步克隆(用DNA扩增)或进一步表达。基于此,在另一个方面,本发明涉及含有该核酸的重组表达载体。

[0131] 本文所用的术语“表达载体”是指在宿主细胞中表达靶基因的工具,并且包括质粒载体、黏粒载体以及病毒载体诸如噬菌体载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体和腺相关病毒载体。载体组分通常包括但不限于一种或多种以下组成部分:信号序列、复制起点、一种或多种抗生素抗性标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。白介素21变体或编码抗体的核酸与启动子、转录终止序列等可操作地连接。

[0132] 术语“可操作地连接”意指核酸表达调控序列(例如,启动子、信号序列或转录调控子的结合位点的阵列)和另一核酸序列之间的功能性连接,并使调控序列能够调控另一核酸序列的转录和/或翻译。

[0133] 当原核细胞作为宿主时,它通常包括能够进行转录的有效启动子(诸如tac启动子、lac启动子、lacUV5启动子、lpp启动子、pLλ启动子、pRλ启动子、rac5启动子、amp启动子、recA启动子、SP6启动子、trp启动子或T7启动子)、起始翻译的核糖体结合位点以及转录/翻译终止序列。此外,例如,当真核细胞用作宿主时,它包括衍生自哺乳动物细胞的基因组的

启动子(例如,金属硫蛋白启动子、 β -肌动蛋白启动子、人血红蛋白启动子或人肌肉肌酸启动子),或衍生自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子、牛痘病毒7.5K启动子、SV40启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、HSV tk启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、HIV LTR启动子、莫洛尼病毒启动子、爱泼斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒(EBV)启动子或劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子),并且通常具有作为转录终止序列的多腺苷酸化序列。

[0134] 在另一个方面,本发明涉及用重组表达载体转化的宿主细胞。用于产生本发明的抗体的宿主细胞可以是原核生物、酵母或高等真核细胞,但不限于此。

[0135] 可以使用原核宿主细胞诸如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)属的菌株(诸如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*))、链霉菌属(*Streptomyces* spp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.) (例如,恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*))、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.) (例如,肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*))。

[0136] 对动物细胞的兴趣是最大的,有用的宿主细胞系的实例包括但不限于COS-7、BHK、CHO、CHOK1、DXB-11、DG-44、CHO/-DHFR、CV1、COS-7、HEK293、BHK、TM4、VERO、HELA、MDCK、BRL 3A、W138、Hep G2、SK-Hep、MMT、TRI、MRC 5、FS4、3T3、RIN、A549、PC12、K562、PER.C6、SP2/0、NS-0、U2OS和HT1080。

[0137] 本文所用的术语“融合”意指整合两个具有不同或相同功能或结构的分子,可通过任何物理、化学或生物方法进行,所述方法可将包括第一Fc区和第二Fc区的抗体(免疫球蛋白)重链恒定区(Fc)对与白介素21变体结合。融合优选通过接头肽进行,并且接头肽可介导本发明的白介素21变体的各个位置处的生物活性分子与包括第一Fc区和第二Fc区的抗体(免疫球蛋白)重链恒定区(Fc)对的融合。

[0138] 白介素-21变体可与第一Fc区或第二Fc区的N末端结合。白介素-21变体可以以单体形式融合到第一Fc区或第二Fc区的N末端。通过对野生型IL21进行氨基酸突变,设计了降低IL21非特异性反应性以及增加结构稳定性的突变体,并且当该突变体以单体IL21-Fc融合蛋白变体形式表达时,融合蛋白的表达量增加,在生理条件下不良低聚物的形成减少,并生物学特性得以改善,使其可以以单体形式存在。

[0139] IL-21或其变体可通过接头与第一Fc区或第二Fc区连接。接头可以是肽接头并且可以具有约10-25aa的长度。例如,接头可以包含亲水性氨基酸,诸如甘氨酸和/或丝氨酸,但不限于此。

[0140] 具体地,接头可以包括例如(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n或(GnS)_m(其中n和m分别为1至10),但接头可以是例如(GnS)_m(其中n和m分别为1至10)。

[0141] 在另一个方面,本发明涉及一种用于预防或治疗癌症的组合物,其含有白介素21变体或融合蛋白作为活性成分。

[0142] 在另一个方面,本发明涉及一种预防或治疗癌症的方法,包括向患者给药白介素21变体或融合蛋白。

[0143] 特别地,根据本发明的单-IL21-Fc融合蛋白变体激活T细胞和/或NK细胞的增殖并增加毒性,从而表现出抗肿瘤或抗癌作用。根据本发明的单-IL21-Fc融合蛋白变体用于治疗与癌症相关的疾病。

[0144] 例如,癌症可以选自由以下组成的组:结肠癌、黑素瘤、乳腺癌、胰腺癌、肾癌、前列

腺癌、卵巢癌、小肠癌、食道癌、宫颈癌、肺癌、淋巴瘤和血癌。

[0145] 在另一个方面,本发明涉及一种用于培养免疫细胞的组合物,其含有根据本发明的白介素21变体或融合蛋白。在另一个方面,本发明涉及一种培养方法,包括用根据本发明的白介素21变体或融合蛋白处理免疫细胞。

[0146] 在某些情况下,所述组合物可以进一步含有选自由培养基、血清、补充剂及其组合组成的组中的一种。所述培养基可以包括选自由氨基酸、糖、无机盐和和维生素组成的组中的一种。优选地,所述细胞培养基可以包括氨基酸、糖、无机盐和和维生素中的全部。

[0147] 所述组合物含有用于培养细胞的培养基,并且具体地包括用于培养NK细胞的培养基,更具体为CD3-CD56+细胞。所述组合物含有细胞体外生长和存活所需的成分,或促进细胞生长和存活的成分。具体地,这些成分可以包括维生素、必需或非必需氨基酸和微量元素。

[0148] 培养基含有氨基酸组分、维生素组分、无机盐组分、其他组分和纯化水,

[0149] a) 氨基酸成分包括选自由以下组成的组中的至少一种氨基酸或其组合:甘氨酸、L-丙氨酸、L-缬氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-苏氨酸、L-丝氨酸、L-半胱氨酸、L-甲硫氨酸、L-天冬氨酸、L-天冬酰胺、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-赖氨酸、L-精氨酸、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-酪氨酸、L-色氨酸、L-脯氨酸、 β -丙氨酸、 γ -氨基丁酸、鸟氨酸、瓜氨酸、高丝氨酸、三碘酪氨酸、甲状腺素和脱氧苯丙氨酸,优选地包括选自由以下组成的组中的至少一种氨基酸或其组合:甘氨酸、L-丙氨酸、L-精氨酸、L-半胱氨酸、L-谷氨酰胺、L-组氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸和L-缬氨酸,以及

[0150] b) 维生素组分可包括选自由以下组成的组中的至少一种维生素或其组合:生物素、D-泛酸钙、叶酸、烟酰胺、盐酸吡哆醇、核黄素、盐酸硫胺素、维生素B12、氯化胆碱、i-肌醇和抗坏血酸,并且优选包括选自由以下组成的组中的至少一种维生素或其组合:i-肌醇、盐酸硫胺素、烟酰胺和盐酸吡哆醇,

[0151] c) 无机盐成分包括选自由以下组成的组中的至少一种无机盐或其组合:氯化钙(CaCl_2) (无水)、五水硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、七水硫酸铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、氯化镁(无水)、硫酸镁(MgSO_4) (无水)、氯化钾(KCl)、氯化钠(NaCl)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、一水磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、七水硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、九水硝酸铁($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)和碳酸氢钠(NaHCO_3),优选包括选自由以下组成的组中的至少一种无机盐或其组合:氯化钠(NaCl)、碳酸氢钠(NaHCO_3)、氯化钾(KCl)、氯化钙(CaCl_2) (无水)和一水磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$),以及

[0152] d) 其他成分包括选自由以下组成的组中的至少一种或其组合:D-葡萄糖(右旋糖)、丙酮酸钠、次黄嘌呤Na、胸苷、亚油酸、硫辛酸、腺苷、胞苷、鸟苷、尿苷、2'-脱氧腺苷、2'-脱氧胞苷HCl和2'-脱氧鸟苷,优选丙酮酸钠。

[0153] e) 纯化水用于溶解氨基酸、维生素、无机盐等成分,可通过一次或多次蒸馏获得,或通过过滤器纯化。

[0154] 此外,该组合物可以进一步含有生长因子或细胞因子。生长因子可以是单独的IGF、bFGF、TGF、HGF、EGF、VEGF或PDGF或其组合,但并不特别限于此。细胞因子可以是单独的IL-1、IL-4、IL-6、IFN- γ 、IL-10、IL-15、IL-17或IL-21或其组合,但并不特别限于此。

[0155] 此外,该组合物可以进一步含有激活自然杀伤细胞的抗体。激活自然杀伤细胞的

抗体可以是单独的抗CD3抗体、抗CD2抗体、抗CD335抗体等或其组合,但并不特别限于此。此外,该组合物可以含有珠粒,激活自然杀伤细胞的抗体与该珠粒结合。

[0156] 特别地,用于培养NK的培养基组合物可以进一步含有选自由IL-15、IL-21及其组合组成的组中的一种。

[0157] IL-15和IL-21是白介素(IL)的类型,是指由免疫细胞诸如淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞产生的蛋白质类生物活性物质。IL-15和IL-21促进自然杀伤细胞的增殖,并且可以在使用单核细胞作为原料细胞培养自然杀伤细胞时使用。然而,当IL-15和IL-21单独使用或其组合使用时,存在增殖率和纯度低的问题(Biossel L.et al.,Biology of Blood and Marrow Transplantation,14,1031-1038,2008)。

[0158] 具体地,培养基可以是动物细胞培养基诸如DMEM(Dulbecco改良的Eagle培养基)、EDM(内皮分化培养基)、MEM(基本必需培养基)、BME(Eagle基础培养基)、RPMI 1640、F-10、F-12、a-MEM(a-基本必需培养基)、G-MEM(Glasgow基本必需培养基)、Iscove改良Dulbecco培养基、AIM-V培养基、X-vivo™15培养基或NK MACS培养基。在本发明的一种实施方式中,培养基可以是AIM-V培养基、X-vivo™15培养基或NK MACS培养基。

[0159] 本文所用的术语“血清”是指血液完全凝固后从血液中分离出的透明上清液。此外,在用于培养动物细胞的合成培养基中应加入血清,通常是来自牛、马或人的血清。牛血清根据血液收集时间可以选自胎牛血清(FBS)、新生牛血清、小牛血清或母牛血清。人血清可以是来自具有AB型血的供体的人血清,并且可以是能够最小化由于缺乏针对A型血和B型血抗原的抗体而引起的免疫反应的人AB血清。此外,可以使用CTS免疫细胞SR等作为“血清”的替代品。在本发明的一种实施方式中,使用了人AB血清或CTS免疫细胞SR。

[0160] 补充剂可以是GlutaMAX(Gibco™),一种L-谷氨酰胺替代品,用于提高细胞培养期间的稳定性和细胞活性。此外,补充剂可以是NK MACS补充剂(Miltenyi Biotec,130-113-102)。

[0161] 免疫细胞可包括选自由以下组成的组中的至少一种:T细胞、NK细胞、细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)、激活的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)和树突状细胞。

[0162] 提供了通过上述方法产生的免疫细胞,特别是NK细胞。提供了含有NK细胞的用于预防或治疗癌症的药物组合物。药物组合物的剂量可根据多种因素进行调整,该因素包括:疾病的类型,疾病的严重程度,组合物中包括的活性成分和其他成分的类型和含量,制剂的类型,以及患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食,给药时间,组合物的给药途径和分泌速率,治疗周期和同时使用的药物。

[0163] 基于活性成分NK细胞,药物组合物的剂量可为 1×10^2 个细胞/kg至 1.0×10^{13} 个细胞/kg,或 1×10^7 个细胞/kg至 1.5×10^{11} 个细胞/kg。此时,给药可每天一次,或分若干次给药。

[0164] 在下文中,将参考实施例更详细地描述本发明。然而,对于本领域技术人员来说,显然这些实施例仅用于说明本发明而不应被解释为限制本发明的范围。

[0165] 实施例1.单-IL21-Fc融合蛋白的构建

[0166] 本文所用的用于构建融合蛋白的Fc变体是基于IgG4,其中引入EW-RVT突变以形成异二聚体的异二聚重链恒定区Fc($\gamma 1/4$,EW-RVT)。根据先前的报道,在构建作为抗体和细胞因子的融合形式的免疫细胞因子中,IgG1的抗体特异性功能,诸如ADCC/CDC,反而促进体

内清除。与IgG1相比,几乎没有ADCC/CDC功能的IgG4异构体被用于构建本文中指定的所有融合蛋白(Gillies SD et al.,1999)。特别地,人IL21使用铰链区连接到重链恒定区,而无需额外的肽接头,以促进与IL21受体的相互作用。此处使用的铰链区是广泛使用的IgG1源性的铰链,并且上部铰链区中的半胱氨酸残基(核心铰链区中用于形成双链体的半胱氨酸残基除外)被丝氨酸残基置换,以防止在蛋白质融合过程中形成不需要的二硫键(突变铰链,图2)。

[0167] 在预期保持与先前报道的基于IgG1的EW-RVT变体类似的异二聚体形成能力的同种型特异性变体中,使用基于IgG4的变体(IgG4-EW-RVT,Choi et al,2013;韩国专利号10-1522954)构建了人IL21(白介素21,表2,SEQ ID NO:5)融合蛋白。IL21存在于自然界中,是一种作为单体起作用的细胞因子,当一个IL21与一个IL21受体(IL21R)和一个 γ c链结合时才有活性。因此,使用异二聚体重链恒定区Fc(γ 1/4,EW-RVT)仅将一个IL21连接到不同的Fc变体(CH3A或CH3B)之一,以保持自然界中存在的IL21单体形式。

[0168] 图1A是示出引入了CH3突变对的单-IL21-Fc融合蛋白的示意图。使用NotI/HindIII将引入了CH3突变对的编码IL21-Fc(γ 1/4,EW)的DNA框内克隆(cloned in-frame)到具有CMV启动子的动物细胞表达载体pcDNA3.1(+)(Invitrogen,美国)中,以形成信号序列-IL21成熟形式-突变铰链-CH2-CH3A。这里使用的IL21是人IL21(Uniprot条目名称,Q9HBE4;序列号4),并且仅使用编码成熟形式(不包括信号序列)的DNA序列。

[0169] 作为单-IL21-Fc融合蛋白的比较例,构建了与野生型Fc融合的双-IL21-Fc。按照上述类似的方式,使用NotI/HindIII限制性酶将编码人IL21成熟形式的DNA序列框内克隆到含有野生型IgG4 CH3的动物细胞表达载体pcDNA3.1(+)(Invitrogen,美国)中,以形成信号序列-IL21成熟形式-突变铰链-CH2-CH3的结构。表2示出了用于构建单-IL21-Fc融合蛋白和双-IL21-Fc融合蛋白的人IL21的氨基酸序列。将氨基酸序列构建为131个氨基酸肽的成熟形式的IL21(人IL21的氨基酸号32至氨基酸号162)(Parrish-Novak et al.Nature,2000;408(6808):57-63),其编号与先前研究的单-IL21-Fc(韩国专利号10-1928981;美国专利登记号US10800825B2)相同。即本文将IL21成熟形式的残基32至1称为残基1-131(见表2和表4)。

[0170] [表2]

构型	氨基酸序列 (a.a 3-133)
[0171]	QDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSAN 人 IL21 TGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMI 成熟形式 HQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO: 4)

[0172] 实施例2.Fc和单-IL21-Fc融合蛋白的构建和表达/纯化

[0173] 野生型Fc (γ 1/4, WT) 和异二聚重链恒定区Fc (γ 1/4, EW-RVT)、双-IL21-Fc融合蛋白和单-IL21-Fc融合蛋白(单-IL21-Fc融合蛋白的与人IL21融合的CH3A(EW)和CH3B(RVT)表达载体的比为1:1、1.5:1、2:1)的表达通过将编码每种蛋白质的质粒和聚乙烯亚胺(PEI)(Polyscinece)的混合物瞬时转染到HEK293-F(Invitrogen)细胞中,并在含有无血清FreeStyle™293表达培养基(Invitrogen)的摇瓶中来孵育进行。该方法的细节如下:

[0174] 100mL对于瞬时转染,将HEK293-F细胞以 1.0×10^6 个细胞/ml的密度接种于摇瓶(康宁(Corning))的90ml培养基中,并在8%CO₂下以135rpm孵育。24小时后,为了产生包括各自的异二聚重链恒定区的融合蛋白,将相应的CH3A和CH3B质粒在4ml FreeStyle® 293表达培养基(Invitrogen)中稀释,总共125μg (1.25μg/ml),更具体地,对于Fc (γ 1/4, WT) 为125μg,对于异二聚重链恒定区Fc (γ 1/4, EW-RVT) 为62.5μg CH3A和62.5μg CH3B,对于双-IL21-Fc为125μg,对于单-IL21-Fc融合蛋白CH3A(EW):CH3B(RVT)=1:1为62.5μg CH3A和62.5μg CH3B,对于CH3A(EW):CH3B(RVT)=1.5:1为75μg CH3A和50μg CH3B,对于CH3A(EW):CH3B(RVT)=2:1为83.3μg CH3A和41.7μg CH3B,过滤后与其中稀释了375μg的PEI的6ml培养基(3.75μg/ml)混合,室温下反应10分钟。然后将反应的混合培养基加入到先前接种的90ml中的细胞中,最短培养5天,最长培养7天。结果,细胞产生的蛋白质分泌到细胞外,并积累在培养基中。因此,使用蛋白A琼脂糖凝胶柱(GE healthcare)从在细胞培养后以3800rpm离心25分钟收集的细胞培养上清液中纯化蛋白质。此时,按照蛋白A柱公司提供的标准方案进行纯化,将缓冲液更换为1X PBS后,使用Vivaspin 30,000MWC0(Satorius)离心浓缩器对洗脱下来的蛋白进行浓缩。使用BCA蛋白测定试剂盒(Thermo)中的溶液在562nm波长处测量纯化蛋白的吸光度,并按照绘制的标准曲线进行测定。表3示出了表达的野生型Fc (γ 1/4, WT)、异二聚重链恒定区Fc (γ 1/4, EW-RVT)、单-IL21-Fc融合蛋白(转染时使用的CH3A(EW):CH3B(RVT)表达载体的比=1:1、1.5:1、2:1)和双-IL21-Fc的纯化产量。实验独立进行三次,结果以平均值的标准误差(平均值±SD)表示。产量验证结果表明,与双-IL21-Fc融合蛋白相比,单-IL21-Fc融合蛋白具有量显著更高的产量。

[0175] [表3]

克隆名称	纯化产量 (mg/L)
Fc(γ 1/4, WT)	160 $\pm$ 13
Fc(γ 1/4, EW-RVT)	191 $\pm$ 45
Bi-IL21-Fc	13.1 $\pm$ 7.9
单-IL21-Fc (EW:RVT =1:1)	51.3
单-IL21-Fc (EW:RVT =2:1)	70.7 $\pm$ 15.4
单-IL21-Fc (EW:RVT =1.5:1)	18.2

[0177] 将纯化的野生型Fc(γ 1/4,WT)和异二聚重链恒定区Fc(γ 1/4,EW-RVT)、单-IL21-Fc融合蛋白(转染时CH3A(EW)和CH3B(RVT)的表达载体比=1:1、1.5:1、2:1)和双-IL21-Fc融合蛋白(5 μ g)通过10%非还原和还原条件下的SDS-PAGE进行分析(图3)。在非还原条件下,在71kDa处观察到单-IL21-Fc融合蛋白,在86kDa处观察到双-IL21-Fc融合蛋白。在还原条件下,双-IL21-Fc具有在43kDa处的一个条带,包括包含IL21融合的异二聚重链恒定区CH3A(EW)和异二聚重链恒定区CH3B(RVT)的两种质粒的单-IL21-Fc融合蛋白具有在43和28kDa处的两个条带。异二聚重链恒定区CH3A和CH3B各自预计蛋白大小为约25kDa,并且人IL21预计蛋白大小为15kDa,但由于人IL21和Fc的N-糖基化,在还原和非还原条件下均观察到大于预期蛋白大小的条带。单-IL21-Fc融合蛋白在非还原条件下的SDS-PAGE结果根据质粒比而变化。在EW:RVT=1:1和1.5:1时,未形成异二聚重链恒定区CH3A(EW)和CH3B(RVT)以1:1的比混合的单-IL21-Fc融合蛋白,观察到看起来是由异二聚重链恒定区CH3B(RVT)的两个单体形成的二聚体的条带,而在EW:RVT=2:1时未观察到这种条带。因此,下文所述的单-IL21-Fc融合蛋白和单-IL21-Fc融合蛋白变体均以EW:RVT=2:1的质粒比构建。

[0178] 实施例3. 单-IL21-Fc融合蛋白的特性评估

[0179] 图4是SEC(尺寸排阻色谱法)后280nm处的mAU随时间(分钟)变化的色谱图,以分析表达的野生型Fc(γ 1/4,WT)、异二聚重链恒定区Fc(γ 1/4,EW-RVT)和单-IL21-Fc融合蛋白的物理特性(转化后异二聚重链恒定区CH3A(EW):CH3B(RVT)的表达载体比=1:1、1.5:1、2:1)。根据以下具体方案,使用HPLC(Agilent Technologies,美国)仪器和Superdex200 10/300GL柱(Cytiva,美国)进行测量。

[0180] 制备已经受过滤和脱气的三级水和1X PBS(pH 7.4、12mM磷酸盐、137mM NaCl、2.7mM KCl)。通过稀释以1 μ g/ml浓度制备野生型Fc(γ 1/4,WT)、异二聚重链恒定区Fc(γ 1/4,EW-RVT)、双-IL21-Fc和单-IL21-Fc融合蛋白(质粒比CH3A(EW):CH3B(RVT)=1:1、1.5:1、2:1),并将所得稀释液中的每一种的45 μ l加入250 μ l带有Polymer Feet 100/PK(Agilent

Technologies,美国)的插入物中,并注入自动进样器小瓶中以制备待分析的最终样品。此外,在相同浓度条件下制备了能够被区分的未知蛋白质样品大小的标志物。对应于150kDa的标志物是醇脱氢酶,以及对应于66kDa的标志物是BSA。

[0181] 首先,以0.5ml/min流过相当于柱体积2至3倍的量的三级水,以从柱中去除初始储存缓冲液(20%乙醇),同时进行标准化。该过程完成后,以0.75ml/min流过相当于1X PBS (pH7.4,137mM NaCl)体积2至3倍的量的生理运行缓冲液,以完成标准化过程,然后开始分析。将制备好的分析样品放入装置中,以设定为0.75ml/min的流速进行分析,注入量为30 μ g (仅注入制备好的45 μ l样品中的30 μ l),分析进行40分钟,后时间设定为10分钟。当用样品注入器注入确定的注入量的样品时,它流入缓冲液流过的管中并注入柱中。当含有样品的缓冲液通过用多孔树脂压缩的柱时,样品中的蛋白质从柱中洗脱出来所需的时间根据蛋白质的分子量(即,大小)而变化,并通过测量280nm处的吸光度变化获得的色谱图来分析其物理特性。此时,可以基于以下原理解释色谱图:随着蛋白质大小的减小,穿过多孔树脂内部的蛋白质的量增加,蛋白质洗脱较晚;随着蛋白质尺寸的增大,蛋白质从多孔树脂外部穿过柱,因此蛋白质洗脱更快。

[0182] 野生型Fc(γ 1/4,WT)、异二聚重链恒定区Fc(γ 1/4,EW-RVT)和单-IL21-Fc融合蛋白(转化时CH3A(EW):CH3B(RVT)=1:1、1.5:1、2:1)的SEC分析结果显示,与标志物相比,单-IL21-Fc融合蛋白的峰与预期峰不匹配,而是观察到对应于较小蛋白质的峰。这意味着单-IL21-Fc融合蛋白在生理条件下的储存缓冲液1X PBS中的生物学特性不佳,原因将在后面描述。不稳定的生物学特性意味着单-IL21-Fc融合蛋白在体内不能发挥所需的功能,并且可能具有副作用和免疫原性,这表明需要改进单-IL21-Fc融合蛋白的生物学特性。

[0183] 实施例4.单-IL21-Fc融合蛋白的SEC结果根据分析缓冲液组成而变化的分析

[0184] 实施例3中进行的SEC分析结果表明单-IL21-Fc融合蛋白的特性较差。为确定原因,对人IL21的结构进行了分析,结果如图5所示。IL21表面上有22个带正侧链的氨基酸。在带正侧链的氨基酸中,10个精氨酸的影响最大。IL21的等电点为9.42,在pH7.4条件下IL21带正电荷。基于此,推测IL21表面上的正侧链与用于SEC分析的柱发生了非特异性相互作用。因此,使用高盐PBS(12mM磷酸盐,500mM NaCl,2.7mM KCl,pH 7.4),即含有高浓度盐的运行缓冲液,其产生了能够抵消IL21正表面电荷的环境,按照与实施例4中所述的SEC分析方法相同的方式进行SEC分析。结果表明,观察到具有与单-IL21-Fc融合蛋白相对应水平的峰。结果示出在图6B中。作为对照,使用1X PBS(其提供生物环境作为运行缓冲液)分析单-IL21-Fc融合蛋白,结果示出在图6A中。结果分析显示,观察到对应于单-IL21-Fc融合蛋白的蛋白质的峰,这表明人IL21在生理条件缓冲液中带强正电荷,因此在SEC分析过程中与柱非特异性相互作用,并且在1X PBS条件下未观察到峰。除了SEC分析之外,IL21的正表面电荷在注射到活体中时会由于与IL21受体以外的细胞和组织非特异性结合而引起副作用,并且导致不良的药代动力学,因此难以作为治疗剂发挥作用。因此,在以下实施例中,构建了具有降低正表面电荷的IL21变体。

[0185] 实施例5.单-IL21-Fc融合蛋白的IL21变体的构建和表达/纯化

[0186] 为了降低IL21的表面正电荷,构建了单-IL21(NKQ)-Fc、单-IL21(DDD)-Fc、单L21(NQNT)-Fc和单-IL21(DDD NQNT)-Fc作为具有正侧链的经置换的氨基酸的变体(序列信息在表4中提供)。具体地,首先,为了获得关于IL21表面上暴露的氨基酸的信息,使用Chimera

X程序以先前阐明的蛋白质结构(PDB ID:3TGX)作为样品分析结构。结构分析结果显示,有22个氨基酸具有正表面电荷,其中10个是精氨酸,其具有高水溶液pKa (~13.8)。此外,当通过Chimera X程序检查结构时,可以观察到结构无法准确识别的非典型区。通过置换非典型区中的氨基酸或置换已识别结构区中的氨基酸,构建单-IL21-Fc融合蛋白氨基酸置换变体。

[0187] 非典型区极大地促进了不稳定结构的形成。IL21的非特异性增加,形成低聚物的可能性增加,并且由于非典型区中存在三个精氨酸(83R、84R、124R)而使物理特性恶化。特别地,IL21与SEC柱具有非特异性相互作用,从而诱导结果,如图4所示。因此,参考中心(兔、猪)序列(R83N、R84K、R124Q),将非典型区中的精氨酸置换为不带电的极性氨基酸或正电荷比精氨酸弱的赖氨酸,构建了新的克隆,其被称为“单-IL21(NKQ)-Fc”(SEQ ID NO:5)。

[0188] 通过将非典型区中的精氨酸(R83、R84、R124)置换为氨基酸中负侧链最强的天冬氨酸(R83D、R84D、R124D),构建了新的克隆,其被称为“单-IL21(DDD)-Fc”(SEQ ID NO:6)。

[0189] 此外,当使用Chimera X程序(PDB ID:3TGX)分析IL21结构时,选择了位于L21受体结合区或不与周围残基形成显著键且其侧链朝向表面的氨基酸(K50、K54、K86、R88),并参考直系同源序列通过置换不带电的极性氨基酸(K50N、K54Q、K86N、R88T)构建了新的克隆,其被称为“单-IL21(NQNT)-Fc”(SEQ ID NO:7)。

[0190] 通过置换氨基酸(K50N、K54Q、R83D、R84D、K86N、R88T、R124D)构建了新的克隆,包括单-IL21(DDD)-Fc和单-IL21(NQNT)-Fc的置换策略,其被称为“单-IL21(DDD NQNT)-Fc”(SEQ ID NO:8)。

[0191] 本实施例中构建克隆的基础及置换策略示于图7中。

[0192] 为构建单-IL21(NKQ)-Fc、单-IL21(DDD)-Fc、单-IL21(NQNT)-Fc和单-IL21(DDD NQNT)-Fc克隆,使用NotI/HindIII进行框内克隆到动物细胞表达载体pcDNA3.1(+)(Invitrogen,美国)中,以形成信号序列-IL21(变体)成熟形式-突变铰链-CH2-CH3A(IgG4, EW)。

[0193] 通过用聚乙烯亚胺(PEI)(Polysciences)与融合有人IL21野生型和突变体(NKQ或DDD或NQNT或DDD NQNT)的比为2:1的IgG4 CH3A(EW)和IgG4 CH3B(RVT)的表达载体的混合物瞬时转染HEK293-F(Invitrogen)细胞,并在含有无血清FreeStyle™293表达培养基(Invitrogen)的摇瓶中培养细胞,构建了单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21(NKQ)-Fc、单-IL21(DDD)-Fc、单-IL21(NQNT)-Fc和单-IL21(DDD NQNT)-Fc。该方法的细节如下。

[0194] 对于瞬时转染,将HEK293-F细胞以 1.0×10^6 个细胞/ml的密度接种于摇瓶(康宁)中的90ml培养基中,并在8%CO₂下以135rpm孵育。24小时后,为了产生包括各自的异二聚重链恒定区的融合蛋白,将相应的CH3A和CH3B质粒稀释于4ml FreeStyle®293表达培养基(Invitrogen)中,总量为125μg(1.25μg/ml),更具体地,稀释比例为IgG4 CH3A(EW):IgG4CH3B(RVT)=2:1=83.3μg:41.7μg,过滤,与稀释了375μg的PEI的6ml培养基(3.75μg/ml)混合,并在室温下反应10分钟。然后将反应的混合培养基加入到先前接种的90ml中的细胞中,最短培养5天,最长培养7天。结果,细胞产生的蛋白质,即含有异二聚重链恒定区的融合蛋白被细胞分泌到细胞外并积累在培养基中。因此,使用蛋白A琼脂糖凝胶柱(GE healthcare)从细胞培养后以3,800rpm离心25分钟收集的细胞培养上清液中纯化蛋白质。此时,按照蛋白A柱公司提供的标准方案进行纯化,在更换储存缓冲液(PBS, pH7.4)后,使用

Vivaspin 30,000MWC0(Satorius) 离心浓缩器对洗脱下来的蛋白进行浓缩。使用BCA蛋白测定试剂盒(Thermo)中的溶液在562nm波长处测量纯化蛋白的吸光度,并按照绘制的标准曲线进行测定(表5)。实验独立进行两次,结果以平均值的标准误差(平均值±SD)表示。产量验证结果表明,与单-IL21-Fc融合蛋白相比,单-IL21-Fc融合蛋白变体具有总体更高的产量。这表明通过理据构建的单-IL21-Fc融合蛋白氨基酸置换突变体的表达没有问题。

[0195] [表4]

人IL21成熟形式的残基数																																																																				
克隆名称	1	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	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48																				
IL21	Q	D	R	H	M	I	R	M	R	Q	L	I	D	I	V	D	Q	L	K	N	Y	V	N	D	L	V	P	E	F	L	P	A	P	E	D	V	E	T	N	C	E	W	S	A	F	S	C	F	Q	K	A	Q	L	K	S	A	N	T	G	N	N	E	R	I	I	N	V	S
IL21(NKQ)	Q	D	R	H	M	I	R	M	R	Q	L	I	D	I	V	D	Q	L	K	N	Y	V	N	D	L	V	P	E	F	L	P	A	P	E	D	V	E	T	N	C	E	W	S	A	F	S	C	F	Q	K	A	Q	L	K	S	A	N	T	G	N	N	E	R	I	I	N	V	S
IL21(DDD)	Q	D	R	H	M	I	R	M	R	Q	L	I	D	I	V	D	Q	L	K	N	Y	V	N	D	L	V	P	E	F	L	P	A	P	E	D	V	E	T	N	C	E	W	S	A	F	S	C	F	Q	K	A	Q	L	K	S	A	N	T	G	N	N	E	R	I	I	N	V	S
IL21(NQNT)	Q	D	R	H	M	I	R	M	R	Q	L	I	D	I	V	D	Q	L	K	N	Y	V	N	D	L	V	P	E	F	L	P	A	P	E	D	V	E	T	N	C	E	W	S	A	F	S	C	F	Q	N	A	Q	L	Q	S	A	N	T	G	N	N	E	R	I	I	N	V	S
IL21(DDD NQNT)	Q	D	R	H	M	I	R	M	R	Q	L	I	D	I	V	D	Q	L	K	N	Y	V	N	D	L	V	P	E	F	L	P	A	P	E	D	V	E	T	N	C	E	W	S	A	F	S	C	F	Q	N	A	Q	L	Q	S	A	N	T	G	N	N	E	R	I	I	N	V	S

[0196]

人IL21成熟形式的残基数																																																SEQ ID No																
克隆名称	1	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	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48																
野生型	I	K	K	L	K	R	K	P	P	S	T	N	A	G	R	R	Q	K	H	R	L	T	C	P	S	C	D	S	Y	E	K	K	P	P	K	E	F	L	E	R	F	K	S	L	L	Q	K	M	I	H	Q	H	L	S	S	R	T	H	G	S	E	D	S	4
IL21(NKQ)	I	K	K	L	K	R	K	P	P	S	T	N	A	G	N	K	Q	K	H	R	L	T	C	P	S	C	D	S	Y	E	K	K	P	P	K	E	F	L	E	R	F	K	S	L	L	Q	K	M	I	H	Q	H	L	S	S	R	T	H	G	S	E	D	S	5
IL21(DDD)	I	K	K	L	K	R	K	P	P	S	T	N	A	G	D	D	Q	K	H	R	L	T	C	P	S	C	D	S	Y	E	K	K	P	P	K	E	F	L	E	R	F	K	S	L	L	Q	K	M	I	H	Q	H	L	S	S	R	T	H	G	S	E	D	S	6
IL21(NQNT)	I	K	K	L	K	R	K	P	P	S	T	N	A	G	R	R	Q	N	H	T	L	T	C	P	S	C	D	S	Y	E	K	K	P	P	K	E	F	L	E	R	F	K	S	L	L	Q	K	M	I	H	Q	H	L	S	S	R	T	H	G	S	E	D	S	7
IL21(DDD NQNT)	I	K	K	L	K	R	K	P	P	S	T	N	A	G	D	D	Q	N	H	T	L	T	C	P	S	C	D	S	Y	E	K	K	P	P	K	E	F	L	E	R	F	K	S	L	L	Q	K	M	I	H	Q	H	L	S	S	R	T	H	G	S	E	D	S	8

* 非结构化区

[0197] [表5]

克隆名称	纯化产量 (mg/L)
单-IL21-Fc	61.4 ± 12.1
单-IL21(NKQ)-Fc	79.1 ± 12.1
单-IL21(DDD)-Fc	86.8 ± 14.3
单-IL21(NQNT)-Fc	65.8 ± 24.2
单-IL21(DDD NQNT)-Fc	74.7 ± 7.8

[0199] 纯化的单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21(NKQ)-Fc和单-IL21(DDD)-Fc(5μg)在10%非还原和还原条件下通过SDS-PAGE分析(图8)。在非还原条件下,在71kDa处观察到单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21(NKQ)-Fc和单-IL21(DDD)-Fc。在还原条件下,包括包含与人野生型IL21和变体(NKQ或DDD)融合的异二聚重链恒定区CH3A(EW)和异二聚重链恒定区CH3B(RVT)的两种质粒的单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21(NKQ)-Fc和单-IL21(DDD)-Fc在43和28kDa处具有两个条带。异二聚重链恒定区CH3A和CH3B各自预计蛋白大小为约25kDa,并且人IL21预计蛋白大小为15kDa,但由于人IL21和Fc的N-糖基化,在还原和非还原条件下均观

察到大于预期蛋白大小的条带。SDS-PAGE结果表明,单-IL21-Fc融合蛋白氨基酸置换变体的各异二聚重链恒定区的表达及使用其形成融合蛋白均没有问题。

[0200] 实施例6.单-IL21-Fc融合蛋白氨基酸置换变体的特性评估

[0201] 图8是SEC(尺寸排阻色谱法)后280nm处的mAU随时间(分钟)变化的色谱图,以分析表达的单-IL21(NKQ)-Fc、单-IL21(DDD)-Fc和单-IL21(NQNT)-Fc的物理特性。根据以下具体方案,使用HPLC(Agilent Technologies,美国)仪器和Superdex200 10/300GL柱(Cytiva,美国)进行测量。

[0202] 制备已经受过滤和脱气的三级水和1X PBS(pH7.4,137mM NaCl)(12mM磷酸盐、137mM NaCl、2.7mM KCl,pH 7.4)。通过稀释以1 μ g/ml浓度制备单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21(NKQ)-Fc、单-IL21(DDD)-Fc和单-IL21(NQNT)-Fc,并将所得稀释液中的每一种的45 μ l加入250 μ l带有Polymer Feet 100/PK(Agilent Technologies,美国)的插入物中,并注入自动进样器小瓶中以制备待分析的最终样品。此外,在相同浓度条件下制备了能够被区分的未知蛋白质样品大小的标志物。对应于150kDa的标志物是醇脱氢酶,以及对应于66kDa的标志物是BSA。

[0203] 首先,以0.5ml/min流过相当于柱体积2至3倍的量的三级水,以从柱中去除初始储存缓冲液(20%乙醇),同时进行标准化。该过程完成后,以0.75ml/min流过相当于1X PBS(pH7.4,137mM NaCl)体积2至3倍的量的运行缓冲液,以完成标准化过程,然后开始分析。将制备好的分析样品放入装置中,以0.75ml/min的流速进行分析,注入量为30 μ g(仅注入制备好的45 μ l样品中的30 μ l),分析进行40分钟,后时间设定为10分钟。

[0204] 单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21(NKQ)-Fc、单-IL21(DDD)-Fc和单-IL21(NQNT)-Fc的SEC分析结果表明,与单-IL21-Fc融合蛋白相比,单-IL21(NQNT)-Fc融合蛋白变体的表达融合蛋白对应的峰显著增加。这支持了以下假设:人IL21的正表面电荷在SEC分析过程中与柱引起非特异性相互作用,这导致分析过程中出现意外峰。此外,缓解该问题的单-IL21-Fc融合蛋白变体具有改善的生物学特性,注射入体内时的非特异性相互作用减少,药物副作用减少,药效学改善。

[0205] 实施例7.单-IL21-Fc融合蛋白的IL21直系同源序列移植突变体的构建及表达/纯化

[0206] 与使用实施例6中为了进一步改善单-IL21-Fc融合蛋白的生物学特性而进行的氨基酸置换而构建的单-IL21-Fc融合蛋白变体不同,使用新的策略开发了单-IL21-Fc融合蛋白变体。具体地,首先,使用PSIPRED、二级结构预测平台和多序列比对,将三种细胞因子,与IL21同属一个家族的IL-2(PDB ID:1IAR)和IL-4(PDB ID:2B5I)与IL21之间的二级结构形成模式进行了比较。序列分析结果显示,与IL2和IL4相比,IL21具有更短的螺旋C以及显著更长的连接螺旋C和螺旋D的环结构,且还具有环结构之间的非典型区。推测这些结构差异可能使IL21的结构不稳定。因此,将IL2和IL4的相应区的互补序列与IL21的进行比较,使用亲水残基比人IL2多的IL4的序列构建了单-IL21-Fc融合蛋白直系同源序列移植突变体,在序列移植时由于疏水氨基酸残基较多可能造成结构的不稳定性。因此,将包括IL21的非典型区的K77至R90序列改为互补人IL4序列和直系同源IL4序列,以构建单-IL21-Fc融合蛋白直系同源序列移植变体(序列信息提供在表6中)。使用人IL4序列的变体被称为“单-IL21(螺旋1)-Fc(SEQ ID NO:9)”,使用直系同源IL4序列的变体被称为“单-IL21(螺旋2)-Fc”

(SEQ ID NO:10)。

[0207] 本实施例中构建的克隆的基础和置换策略示于图9中。

[0208] 为构建单-IL21(螺旋1)-Fc和单-IL21(螺旋2)-Fc,使用NotI/HindIII进行框内克隆到动物细胞表达载体pcDNA3.1(+)(Invitrogen,美国)中,以形成信号序列-IL21(螺旋1)成熟形式-突变铰链-CH2-CH3A(IgG4,EW)和信号序列-IL21(螺旋2)成熟形式-突变铰链-CH2-CH3A(IgG4,EW)。

[0209] 通过用聚乙烯亚胺(PEI)(Polyscience)与融合有野生型人IL21或IL21(螺旋1)或IL21(螺旋2)的表达载体的比为2:1的IgG4-CH3A(EW)和IgG4CH3B(RVT)的表达载体得混合物比瞬时转染HEK293-F(Invitrogen)细胞,并在含有无血清FreeStyle™293表达培养基(Invitrogen)的摇瓶中培养所得产物,构建了单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21(螺旋1)-Fc和单-IL21(螺旋2)-Fc。该方法的细节如下。

[0210] 对于瞬时转染,将HEK293-F细胞以 1.0×10^6 个细胞/ml的密度接种于摇瓶(康宁(Corning))的90ml培养基中,并在8%CO₂下以135rpm孵育。24小时后,为了产生包括各自的异二聚重链恒定区的融合蛋白,将相应的CH3A和CH3B质粒稀释于4ml FreeStyle® 293表达培养基(Invitrogen)中,总量为125μg(1.25μg/ml),更具体地,稀释比例为CH3A(EW):CH3B(RVT)=2:1=8 3.3μg:41.7μg,过滤,与稀释了375μg的PEI的6ml培养基(3.75μg/ml)混合,并在室温下反应10分钟。然后将反应的混合培养基加入到先前接种的90ml细胞中,最短培养5天,最长培养7天。结果,细胞产生的蛋白质,即含有异二聚重链恒定区的融合蛋白被细胞分泌到细胞外并积累在培养基中。因此,使用蛋白A琼脂糖凝胶柱(GE healthcare)从在细胞培养后以3800rpm离心25分钟收集的细胞培养上清液中纯化蛋白质。此时,按照蛋白A柱公司提供的标准方案进行纯化,在更换储存缓冲液(PBS,pH7.4)后,使用Vivaspin 30,000MWC(Satorius)离心浓缩器对洗脱下来的蛋白进行浓缩。使用BCA蛋白测定试剂盒(Thermo)中的溶液在562nm波长处测量纯化蛋白的吸光度,并按照绘制的标准曲线进行测定(表7)。实验独立进行三次,结果以平均值的标准误差(平均值±SD)表示。产量验证结果表明,单-IL21(螺旋1)-Fc和单-IL21(螺旋2)-Fc的产量与单-IL21-Fc融合蛋白的产量相似。

[0211] [表6]

人IL21成熟形式的残基数	
克隆名称	QDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVS
IL21	QDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVS
IL21(螺旋1)	QDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVS
IL21(螺旋2)	QDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVS

[0212]

人IL21成熟形式的残基数		SEQ ID No
克隆名称	QDRHMI RMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVS	
IL21	IKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIHQHLSRTHGSEDS	4
IL21(螺旋1)	IKKLKRLDRN L WGLAGLTCPCDSYEKKPPKEFLERFKSL LQKMIHQHLSRTHGSEDS	9
IL21(螺旋2)	IKKLKRLDRN L N S L A N L T C P C D S Y E K K P P K E F L E R F K S L L Q K M I H Q H L S R T H G S E D S	10

* 非结构化区

[0213] [表7]

克隆名称	纯化产量 (mg/L)
单-IL21-Fc	66.9 ± 11.0
单-IL21(螺旋1)-Fc	70.2 ± 14.1
单-IL21(螺旋2)-Fc	57.8 ± 20.6

[0215] 纯化的单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21(螺旋1)-Fc和单-IL21(螺旋2)-Fc (5μg) 在10%非还原和还原条件下通过SDS-PAGE分析(图11)。在非还原条件下,在71kDa处观察到单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21(螺旋1)-Fc、单-IL21(螺旋2)-Fc。在还原条件下,包括包含与人野生型IL21及IL21(螺旋1)融合的异二聚重链恒定区CH3A(EW)和异二聚重链恒定区CH3B(RVT)的两种质粒的单-IL21-Fc融合蛋白在43和28kDa处具有两个条带。与IL21(螺旋2)融合的异二聚重链恒定区CH3A(EW)观察具有比43kDa更大的条带。这被认为是由于在IL21(螺旋2)构建过程中,移植着丝粒的IL4序列时,产生了另一个N-糖基化区(N90-T92)。SDS-PAGE分析结果表明,各异二聚体重链恒定区的表达及通过其形成融合蛋白均没有问题。

[0216] 实施例8. 单-IL21-Fc融合蛋白的IL21直系同源氨基酸置换变体的特性评估

[0217] 图12是SEC(尺寸排阻色谱法)后280nm处的mAU的色谱图,以比较表达的单-IL21-Fc融合蛋白的IL21直系同源氨基酸置换变体与先前构建的单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21(DDD)-Fc、单-IL21(NQNT)-Fc和单-IL21(DDD NQNT)-Fc之间的物理特性。根据以下具体方案,使用HPLC(Agilent Technologies,美国)仪器和Superdex200 10/300GL柱(Cytiva,美国)进行测量。

[0218] 制备已经受过滤和脱气的三级水和1X PBS(pH7.4,137mM NaCl)。通过稀释以1μg/ml浓度制备构建的单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21(DDD)-Fc、单-IL21(NQNT)-Fc、单-IL21(DDD NQNT)-Fc、单-IL21(螺旋1)-Fc和单-IL21(螺旋2)-Fc,并将所得稀释液中的每一种的45μl加入250μl带有Polymer Feet 100/PK(Agilent Technologies,美国)的插入物中,并注入自动进样器小瓶中以制备待分析的最终样品。此外,在相同浓度条件下制备了能够被区分的未知蛋白质样品大小的标准样品。对应于150kDa的标准样品是醇脱氢酶,以及对应于66kDa的标准样品是BSA。

[0219] 首先,以0.5ml/min流过相当于柱体积2至3倍的量的三级水,以从柱中去除初始储存缓冲液(20%乙醇),同时进行标准化。该过程完成后,以0.75ml/min流过相当于1X PBS(pH7.4,137mM NaCl)体积2至3倍的量的运行缓冲液,以完成标准化过程,然后开始分析。将制备好的分析样品放入装置中,以0.75ml/min的流速进行分析,注入量为30μg(仅注入制备

好的45 μ l样品中的30 μ l),分析进行40分钟,后时间设定为10分钟。

[0220] 通过尺寸排阻色谱法分析了单-IL21-Fc融合蛋白直系同源序列移植变体的特性。从图10可以看出,单-IL21(螺旋1)-Fc和单-IL21(螺旋2)-Fc具有比单-IL21-Fc融合蛋白更高的主峰。特别地,与单-IL21-Fc融合蛋白相比,单-IL21(螺旋2)-Fc具有较低的低聚物比率和较高的主峰。据推测,这就是通过将序列改变部分中带正侧链电荷的精氨酸的数量从3个减少到1个并用螺旋结构置换非典型区来进一步改善结构稳定性的原因。

[0221] 实施例9.单-IL21-Fc融合蛋白受体结合能力评估

[0222] 为了评估构建的单-IL21-Fc融合蛋白变体与IL21受体的结合能力,使用Jurkat细胞系(一种表达IL21受体的CD4阳性人T细胞系)评估单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21(NKQ)-Fc和单-IL21(DDD)-Fc的受体结合能力。具体地,以 2.0×10^6 个细胞/样品制备细胞,用洗涤缓冲液(PBS+1%FBS)洗涤,然后用单-IL21-Fc融合蛋白、单-IL21(NKQ)-Fc和单-IL21(DDD)-Fc在4 $^{\circ}$ C下以200nM和50nM处理1小时。用洗涤缓冲液再次洗涤产物,用二抗抗人IgG4 FITC在4 $^{\circ}$ C黑暗条件下处理30分钟。然后用洗涤缓冲液洗涤产物,并使用流式细胞仪FACScalibur(BD bioscience,美国)进行分析。

[0223] 通过用荧光物质标记经受处理单-IL21-Fc融合蛋白和单-IL21(变体)-Fc过程的实验组和未经受该过程的对照组,并测量荧光信号的强度来评估与IL21受体的结合能力。结果显示在图13中。结果表明,单-IL21(变体)-Fc也具有与单-IL21-Fc融合蛋白相似的荧光信号,并且信号强度也随着处理的蛋白浓度的增加而增加。这表明单-IL21(变体)-Fc的受体结合能力得以保留,因此生物活性没有问题。

[0224] 实施例10.单-IL21-Fc融合蛋白变体的生物活性评估

[0225] 按照正当程序征得同意采集人血液,使用Ficoll(Ficoll-paqueTM PLUS, GE healthcare)以1:2的比将血液小心地置于Ficoll层上,以2,000rpm离心30分钟,从密度(比重)差异分离的血沉棕黄层中分离出外周血单个核细胞(PBMC)(图14)。此外,使用磁珠(Myltenyi Biotech)去除CD4 T细胞和CD8T细胞后进行组培养,以富集通过Ficoll分离的PBMC中的NK细胞(图15)。然后,将用100Gy的 γ 辐照的Jurkat细胞和EBV-LCL细胞以1:1的比与外周血单个核细胞在RPMI 1640(Corning)中补充有10% FBS(胎牛血清,HyClone)、1%青霉素-链霉素(Gibco)和IL-2-Fc(单体,30ng/ml)的培养基中一起培养。此时,在第0天用30ng/ml的7种类型的单Fc-IL21融合蛋白变体(单-IL21-Fc、单-IL21(NKQ)-Fc、单-IL21(DDD)-Fc、单-IL21(NQNT)-Fc、单-IL21(DDD NQNT)-Fc、单-IL21(螺旋1)-Fc、单-IL21(螺旋2)-Fc)处理细胞一次。每3至4天加入含有30ng/ml的IL-2-Fc(单体)的RPMI培养基,在第6天将细胞数调整为 2.5×10^5 个细胞/ml,转入烧瓶培养。在第6天和第10天,用CD3-(FITC)和CD56+(APC)对细胞进行荧光染色,通过流式细胞术测量NK细胞百分比,最后计算NK细胞扩增率。结果表明,当使用PBMC时,NQNT和DDD-NQNT具有比WT-IL21显著更高的产量(图14),而当使用去除了CD4和CD8 T细胞的PBMC时,NQNT和螺旋-1具有高产量(图15)。由此可以看出,用单Fc-IL21融合蛋白变体处理的组中NK细胞增殖扩增能力得到提高。可以看出,当在NK细胞治疗剂体外扩增培养过程中,使用常规处理方法进一步用单Fc-IL21融合蛋白变体处理该组时,与常规方法相比,可以扩增大量的NK细胞。

[0226] 工业实用性

[0227] 本文公开的现有单-IL21-Fc融合蛋白的预期局限性在于,由于野生型IL21的高等

电点,在机体pH环境中净电荷为正,在表面上形成阳离子斑块,除了与IL21受体外,其可能与各种组织和细胞发生非特异性相互作用。因此,当单-IL21-Fc融合蛋白注射入体内时,其在体中的生物学特性可能较差,从而通过与其他细胞和组织的非特异性相互作用引起副作用诸如过度免疫响应,并导致药效学较差。作为克服这一问题的策略,其中将人IL21或其变体与异二聚重链恒定区Fc($\gamma 1/4$,EW-RVT)融合的单-IL21-Fc融合蛋白或其变体保留了常规单-IL21-Fc融合蛋白的结构、与IL21受体的结合能力以及包括对T细胞和NK细胞的增殖能力和激活能力的生物活性,从而改善体内物理特性,减少副作用,在保持抗肿瘤功能的同时,诱导增加半衰期的效果。

[0228] 根据本发明的单-IL21-Fc融合蛋白或其变体基于高生产产率易于开发成治疗药物,并能保持常规单-IL21-Fc融合蛋白与IL21受体的结合能力,保持原有的生物学功能(增强的T细胞增殖能力和毒性能力,以及增强的NK细胞增殖能力和毒性能力),从而表现出有效的抗癌活性。

[0229] 根据本发明的单-IL21-Fc融合蛋白或其变体可用作药物组合物,其可在体内和体外增加用于免疫细胞治疗的T细胞和NK细胞的增殖和激活能力。

[0230] 根据本发明的单-IL21-Fc融合蛋白或其变体用于增加用于免疫细胞治疗的T细胞和NK细胞的增殖和激活能力的免疫细胞培养基础实验以及用于细胞疗法开发的研究。

[0231] 根据本发明的单-IL21-Fc融合蛋白或其变体的构建策略提供了一种用于构建变体的策略,该变体适用于作为药物组合物用于治疗 and 预防各种疾病的物质,预计除了IL21之外,由于体内高正电荷,这些物质具有较差的生物学特性、副作用和较差的药效学。

[0232] 尽管已经详细描述了本发明的具体配置,但是本领域的技术人员将会理解,提供该描述是为了说明的目的而阐述优选实施方式并且不应该被解释为限制本发明的范围。因此,本发明的实质范围由所附权利要求及其等同物来限定。

[0233] 独立文本的序列表附上电子文件。

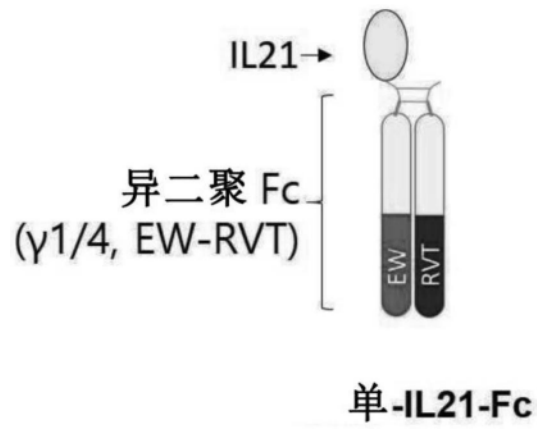


图1a

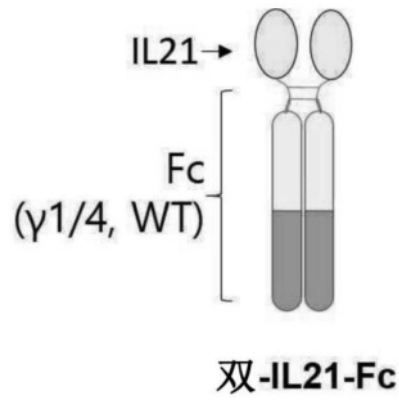


图1b

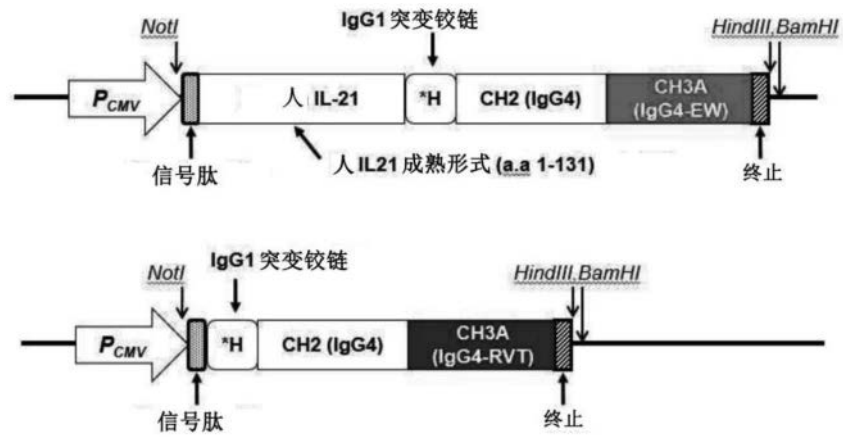


图2

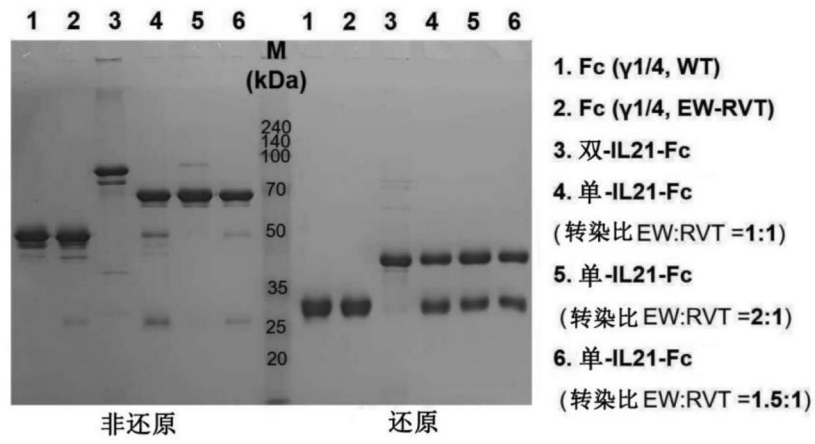


图3

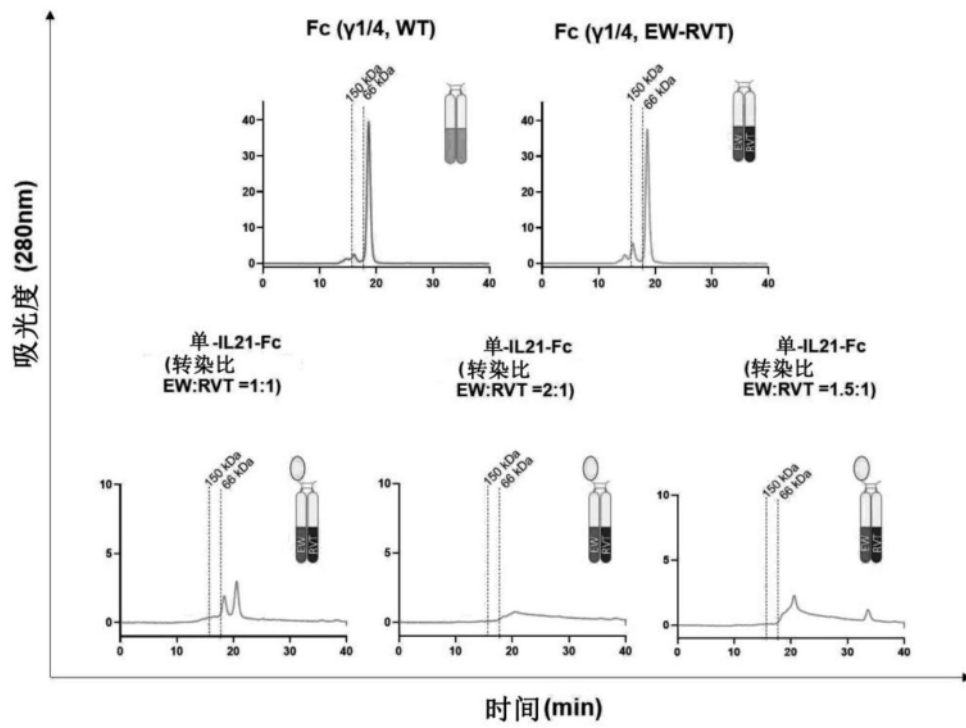


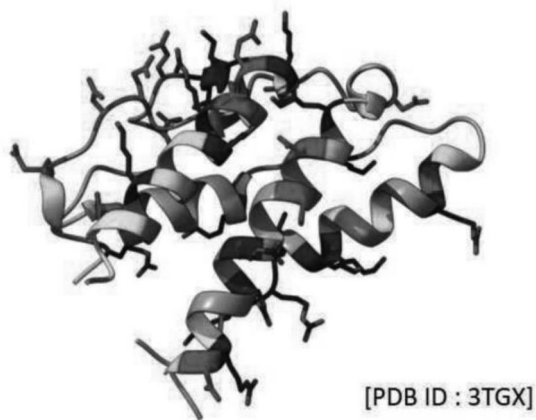
图4

正电荷残基 (10 Arg, 12 Lys) : 蓝色

负电荷残基 (6 Asp, 8 Glu) : 红色

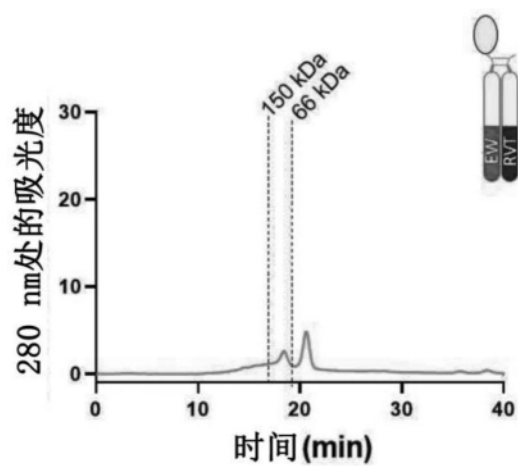
疏水残基 (Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Trp) : 灰色

其他 (Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, His, Tyr) : 绿色



理论 pI: 9.42

图5



单-IL21-Fc
(转染比 EW:RVT=2:1)

图6a

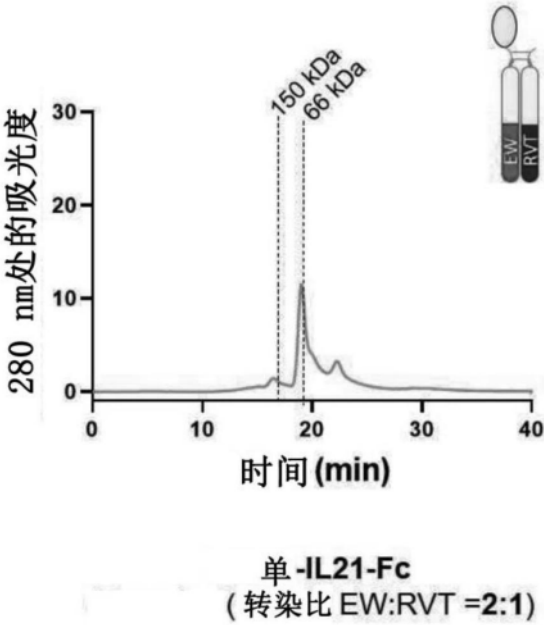
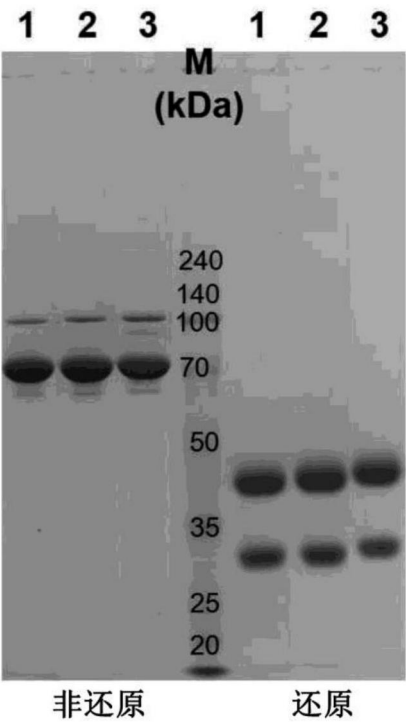


图6b

	IL21 变体	突变	理据
1	IL21(NKQ)	R83N, R84K, R124Q	IL-21 IL-21R 非结构化区 (R83,R84) 非结构化区 (R124) PDB ID : 3TGX
2	IL21(DDD)	R83D, R84D, R124D	
3	IL21(NQNT)	K50N, K54Q, K86N, R88T	IL-21R IL-21 PDB ID : 3TGX K86 R88 K50 K73 K54 K70 R63
4	IL21(DDD NQNT)	R83D, R84D, R124D K50N, K54Q, K86N, R88T	

图7



- 1. 单-IL21-Fc
- 2. 单-IL21(NKQ)-Fc
- 3. 单-IL21(DDD)-Fc

图8

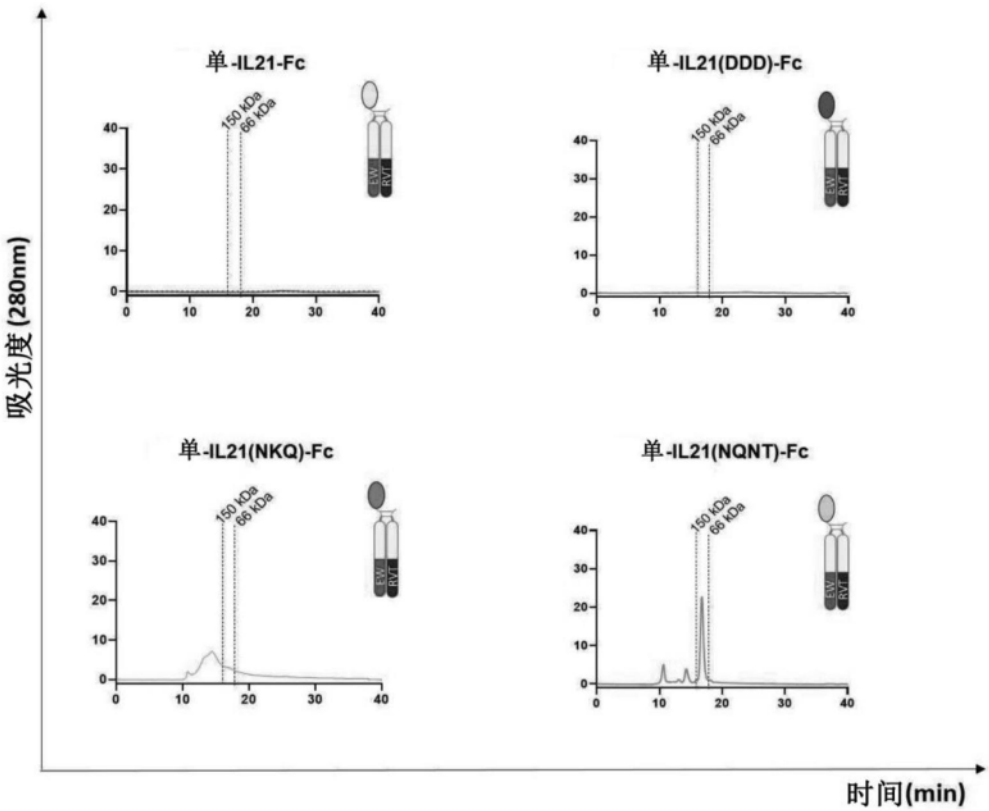


图9

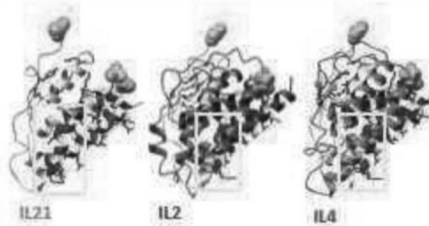
	IL21 变体	突变	证据
5	IL21(螺旋1)	{K75~R88 区} KPPSTNAGRROKHR → LDRNLWGLAG	
6	IL21(螺旋2)	{K75~R88 区} KPPSTNAGRROKHR → LDRNLNSLAN	

图10

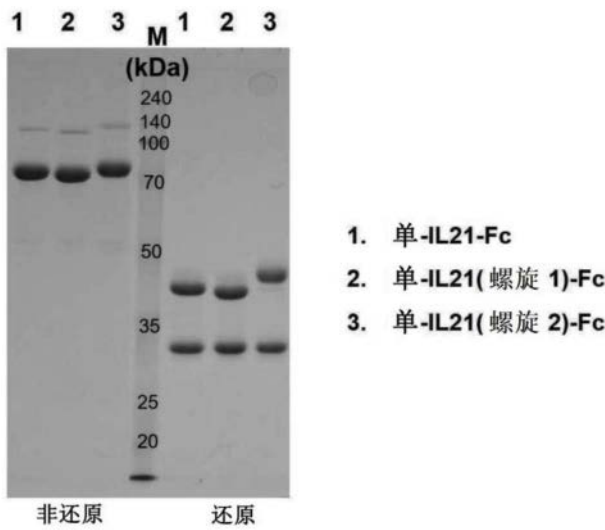


图11

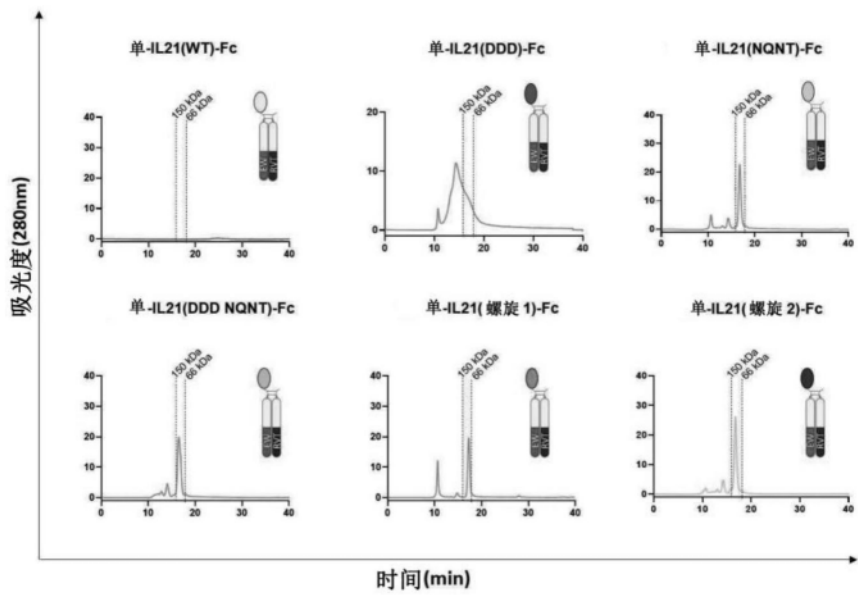


图12

细胞系: Jurkat 细胞
(CD4⁺人T-细胞系)

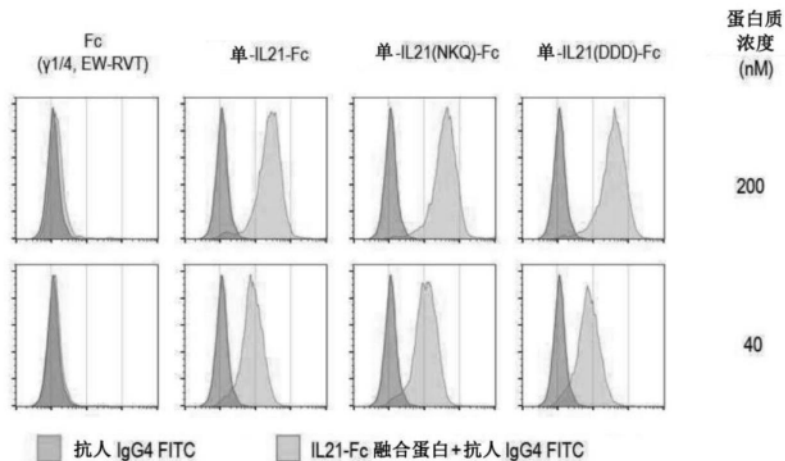


图13

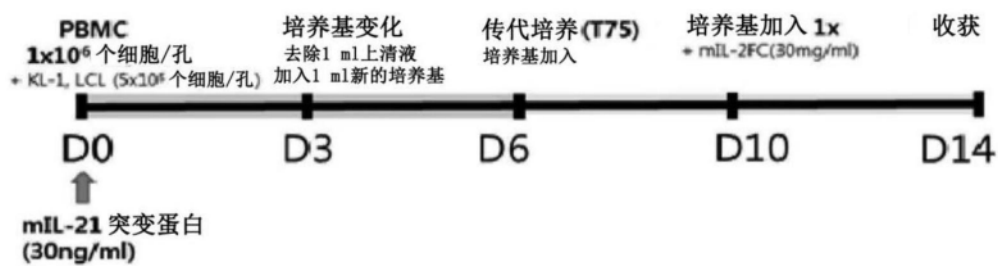


图14a

PBMC (KL1+LCL)			mIL-21-FC (野生)	mIL21 -NKQ-FC	mIL21 -DDD-FC	mIL21 -NQNT-FC	m-IL21 -DDD NQNT-FC	mIL21 -螺旋 1-FC	mIL21 -螺旋 2-FC
单体 IL-21 FC 突变蛋白		-	+	+	+	+	+	+	+
第0天	总细胞数 (x10 ⁶)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	NK 频率 (%)	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%
	NK 细胞数 (x10 ⁶)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
第6天	总细胞数 (x10 ⁶)	3.00	4.20	3.90	4.40	4.40	4.30	2.90	4.30
	NK 频率 (%)	47%	45%	31%	40%	48%	48%	40%	38%
	NK 细胞数 (x10 ⁶)	1.41	1.89	1.21	1.76	2.11	2.06	1.16	1.63
第14天	总细胞数 (x10 ⁶)	66.30	76.20	89.70	64.50	106.50	116.70	38.10	60.30
	NK 频率 (%)	84%	85%	83%	85%	84%	84%	80%	80%
	NK 细胞数 (x10 ⁶)	55.69	64.77	74.45	54.83	89.46	98.03	30.48	48.24
倍数		222.77	259.08	297.80	219.30	357.84	392.11	121.92	192.96

[IL-2 二聚 FC]

第0天	仅 IL-2	突变蛋白1	突变蛋白2	突变蛋白3	突变蛋白4	突变蛋白5	突变蛋白6	突变蛋白7
总细胞计数	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06
NK 细胞 %	6.49%	6.49%	6.49%	6.49%	6.49%	6.49%	6.49%	6.49%
总NK计数	6.49E+04	6.49E+04	6.49E+04	6.49E+04	6.49E+04	6.49E+04	6.49E+04	6.49E+04
第6天	仅 IL-2	突变蛋白1	突变蛋白2	突变蛋白3	突变蛋白4	突变蛋白5	突变蛋白6	突变蛋白7
总细胞计数	2.70E+06	3.96E+06	3.78E+06	2.88E+06	3.24E+06	4.41E+06	3.60E+06	4.23E+06
NK 细胞 %	36.10%	36.50%	38.60%	37.60%	41.60%	41.70%	35.80%	35.40%
总NK计数	9.75E+05	1.45E+06	1.46E+06	1.08E+06	1.35E+06	1.84E+06	1.29E+06	1.50E+06
第9天	仅 IL-2	突变蛋白1	突变蛋白2	突变蛋白3	突变蛋白4	突变蛋白5	突变蛋白6	突变蛋白7
总细胞计数	4.23E+06	5.78E+06	9.50E+06	4.66E+06	9.16E+06	5.78E+06	5.13E+06	4.96E+06
NK 细胞 %	47.80%	49.40%	52.40%	53.90%	61.60%	61.60%	55.10%	54.00%
总NK计数	2.02E+06	2.85E+06	4.98E+06	2.51E+06	5.64E+06	3.56E+06	2.82E+06	2.68E+06
第14天	仅 IL-2	突变蛋白1	突变蛋白2	突变蛋白3	突变蛋白4	突变蛋白5	突变蛋白6	突变蛋白7
总细胞计数	1.76E+07	2.54E+07	2.51E+07	4.81E+07	3.56E+07	2.71E+07	3.13E+07	1.99E+07
NK 细胞 %	57.90%	69.00%	75.90%	75.30%	82.00%	82.10%	73.70%	69.90%
总NK计数	1.02E+07	1.75E+07	1.91E+07	3.62E+07	2.92E+07	2.22E+07	2.31E+07	1.39E+07
倍数值	157	270	294	558	450	343	355	214

图14b

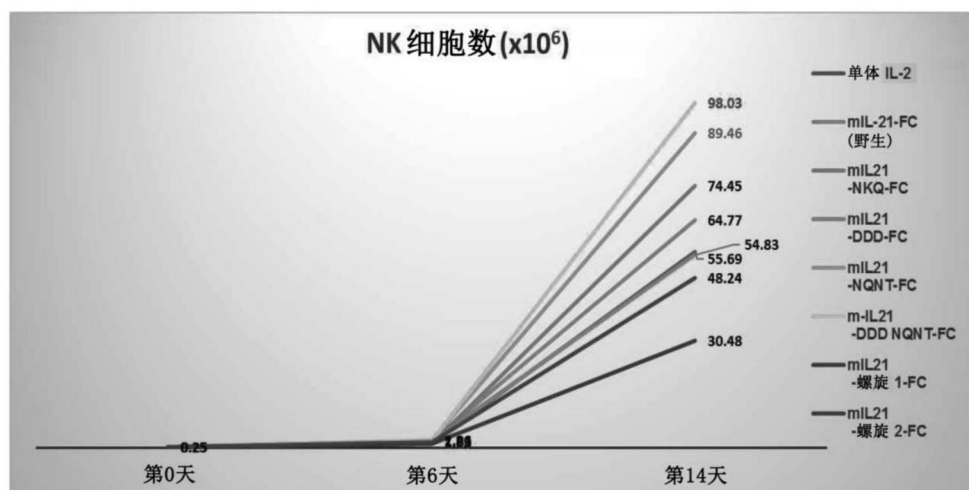


图14c

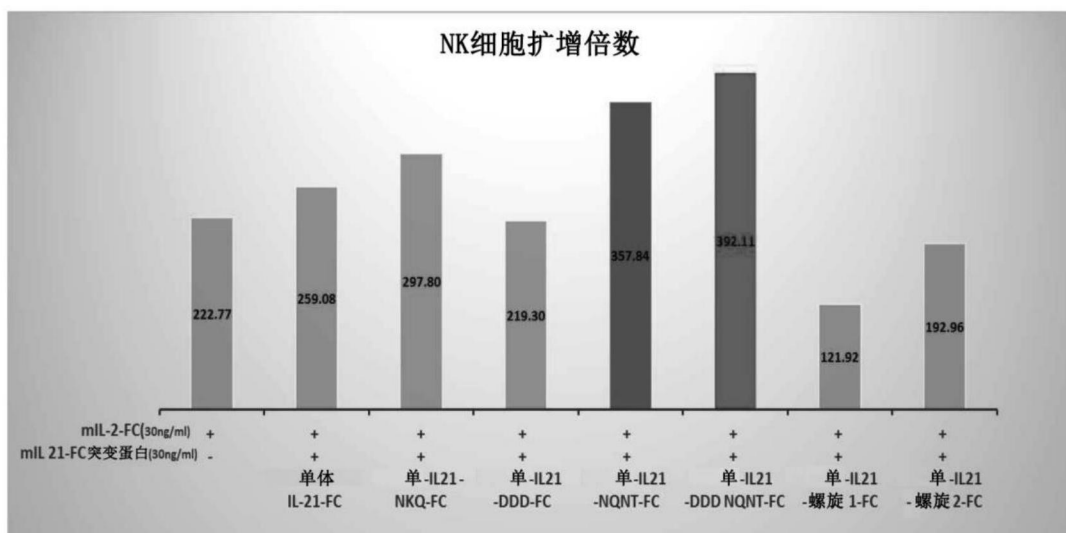


图14d

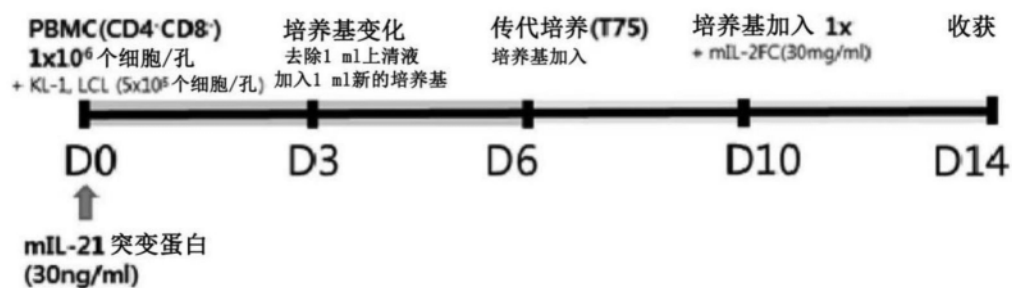


图15a

PBMC CD4-CD8- (KL1+LCL)			miL-21-FC (野生)	miL21 -NKQ-FC	miL21 -DDD-FC	miL21 -NQNT-FC	miL21 -DDD NQNT-FC	miL21 -螺旋 1-FC	miL21 -螺旋 2-FC
单体 IL-21 FC 突变蛋白(30ng/ml)		-	+	+	+	+	+	+	+
第0天	总细胞数($\times 10^5$)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	NK 频率(%)	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%
	NK 细胞数 ($\times 10^5$)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
第6天	总细胞数($\times 10^5$)	1.50	2.50	3.00	2.85	3.65	2.35	2.30	2.40
	NK 频率(%)	81%	84%	83%	84%	83%	85%	85%	83%
	NK 细胞数 ($\times 10^5$)	1.22	2.10	2.49	2.39	3.03	2.00	1.96	1.99
第14天	总细胞数($\times 10^5$)	12.00	48.00	64.20	38.70	67.80	45.30	74.70	53.70
	NK 频率(%)	68%	82%	81%	82%	83%	82%	78%	80%
	NK 细胞数 ($\times 10^5$)	8.16	39.36	52.00	31.73	56.27	37.15	58.27	42.96
倍数		16.32	78.72	104.00	63.47	112.55	74.29	116.53	85.92

图15b

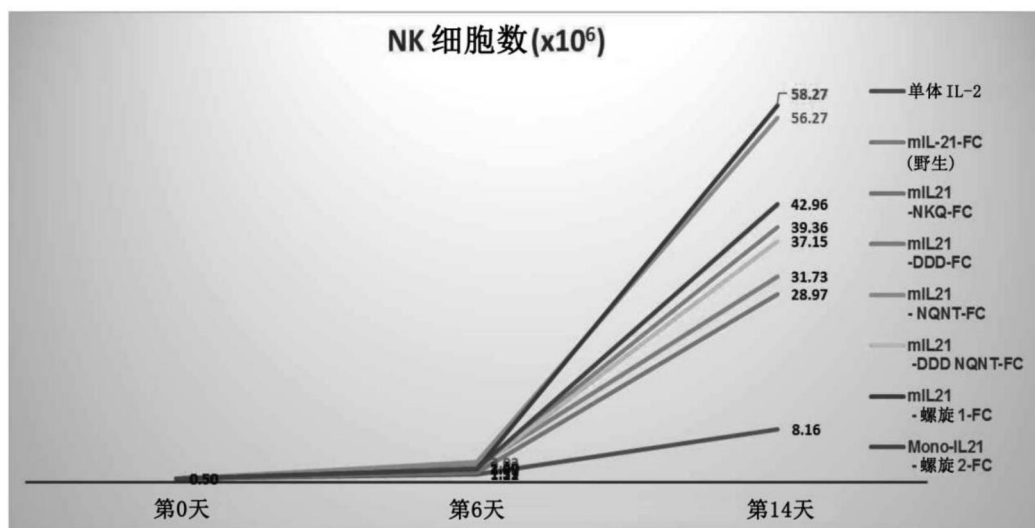


图15c

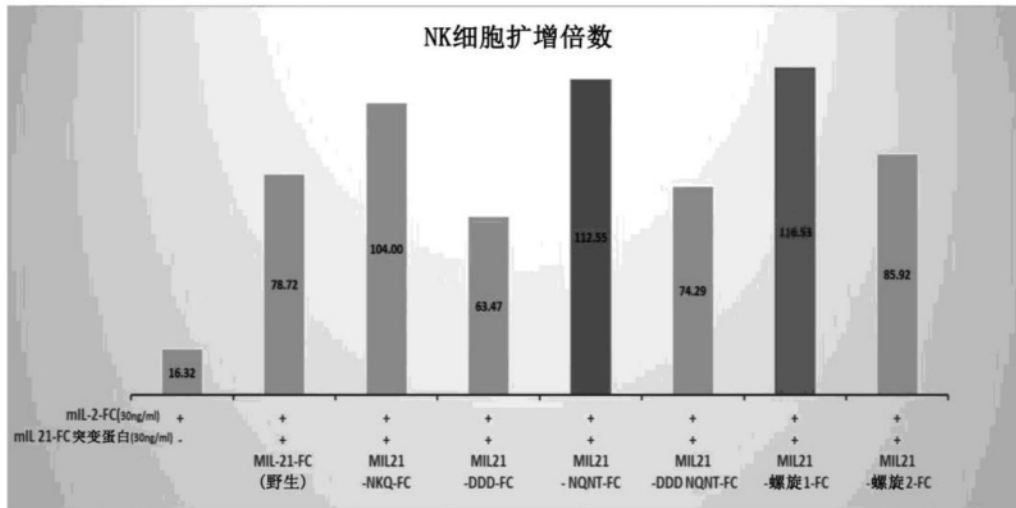


图15d