



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110088124 A

(43)申请公布日 2019.08.02

(21)申请号 201780061293.6

(22)申请日 2017.08.31

(30)优先权数据

10-2016-0113452 2016.09.02 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.04.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2017/009570 2017.08.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/044105 KO 2018.03.08

(71)申请人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国首尔特别市

申请人 亚洲大学校产学协力团

(72)发明人 李景美 林善雅 金容星 金艺珍

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 陈桢

(51)Int.Cl.

C07K 14/54(2006.01)

A61K 38/20(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

A61K 47/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

序列表5页 附图6页

(54)发明名称

与免疫球蛋白重链恒定区异源二聚体(异源二聚体Fc)融合的IL-21(异源二聚体Fc融合IL-21)以及包含其的药物组合物

(57)摘要

公开了一种异源二聚体Fc融合蛋白和包含该异源二聚体Fc融合蛋白的药物组合物。该异源二聚体Fc融合蛋白包含免疫球蛋白重链恒定区(Fc)对的第一Fc区和第二Fc区,并且其中IL-21与该第一Fc区和/或该第二Fc区的N末端或C末端中的至少一项结合,其中该第一Fc区和该第二Fc区的CH3结构域发生突变,从而促进异源二聚体的形成。当使用根据本发明的异源二聚体Fc融合蛋白时,可显著增加包括在异源二聚体Fc融合蛋白内的IL-21的体内半衰期。



1. 一种异源二聚体Fc融合蛋白,其包含免疫球蛋白重链恒定区(Fc)对的第一Fc区和第二Fc区,并且其中IL-21与该第一Fc区和/或该第二Fc区的N末端或C末端中的至少一项结合,其中该第一Fc区和该第二Fc区的CH3结构域发生突变,从而促进异源二聚体Fc的形成。

2. 根据权利要求1的异源二聚体Fc融合蛋白,其中IL-21仅与该第一Fc区或该第二Fc区的N末端和C末端中的任一项结合。

3. 根据权利要求1的异源二聚体Fc融合蛋白,其中该第一Fc区和该第二Fc区各自衍生自选自人类IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD和IgE的Fc区。

4. 根据权利要求1的异源二聚体Fc融合蛋白,其中该第一Fc区和该第二Fc区以由人类IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD和IgE组成的完整抗体形式包括在内。

5. 根据权利要求1的异源二聚体Fc融合蛋白,其中该第一Fc区或该第二Fc区的CH3结构域的突变包括选自下组的一个或多个突变(突变位点是根据EU索引):

(1) 在该第一Fc区的CH3结构域的位置K360处的K360E氨基酸残基取代;

(2) 在该第二Fc区的CH3结构域的位置Q347处的Q347R氨基酸残基取代;

(3) 在该第一Fc区的CH3结构域的位置K409处的K409W氨基酸残基取代;和

(4) 在该第二Fc区的CH3结构域的位置F405处的F405T氨基酸残基取代以及在该第二Fc区的CH3结构域的位置D399处的D399V氨基酸残基取代。

6. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至5中任一项的异源二聚体Fc融合蛋白。

7. 根据权利要求6的药物组合物,其中旨在将该药物组合物用于治疗癌症。

8. 根据权利要求7的药物组合物,其中该癌症选自结肠癌、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。

9. 根据权利要求7的药物组合物,其中旨在将该药物组合物与其他抗癌剂一起进行联合治疗。

与免疫球蛋白重链恒定区异源二聚体(异源二聚体Fc)融合的 IL-21(异源二聚体Fc融合IL-21)以及包含其的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含免疫球蛋白重链恒定区(Fc)对的第一Fc区和第二Fc区的异源二聚体Fc融合蛋白,其中IL-21与第一Fc区和/或第二Fc区的N末端或C末端中的至少一项结合,其中第一Fc区和第二Fc区的CH3结构域发生突变,从而促进异源二聚体的形成,并且涉及包含异源二聚体Fc融合蛋白的药物组合物。

[0002] 当使用根据本发明的异源二聚体Fc融合蛋白时,可显著增加包括在异源二聚体Fc融合蛋白内的IL-21的体内半衰期。

背景技术

[0003] 自然界存在的人类抗体(免疫球蛋白G(IgG)、IgM、IgD、IgE和IgA)以两条具有相同氨基酸序列的重链和两条具有相同氨基酸序列的轻链的组装形式存在。在这方面,两条相同重链之间的同源二聚化是由抗体的恒定区的末尾结构域(IgG、IgD和IgA的CH3结构域,IgM的CH4结构域和IgE的CH2和CH4结构域)和铰链区间二硫键之间的非共价相互作用诱导的。

[0004] 抗体衍生的异源二聚体重链恒定区(异源二聚体Fc)技术是一项通过工程化以便通过位于恒定区的末尾结构域之间的特定非共价键形成优选异源二聚化并且不优选或抑制同源二聚化的键来生成异源二聚体Fc的技术,所述末尾结构域对上述天然存在的抗体(IgG、IgM、IgA、IgD、和IgE)的同源二聚化有极大地贡献。更确切地说,通过基因操作,在两个不同抗体重链的CH3结构域中诱导突变,使得两个重链在结构上与天然存在的抗体非常相似,具有最小的序列偏差,并形成异源二聚体(美国专利号7,695,936;韩国专利注册号1,522,954)。异源二聚体Fc技术是一项用于产生双特异性抗体的平台技术,并且大多数已知诱导异源二聚体形成的CH3结构域突变体都是通过将以抗体的基于结构的合理设计为基础的不对称突变对引入到CH3结构域的相互作用表面而产生的(Spreter Von Kreudenstein等人,2014)。作为开创性的工作,可从Genentech获得一种旋入孔(knob-into-hole)技术(Ridgway等人,1996),并且许多跨国制药公司已经开发并报告了上述平台技术,如Zymeworks公司的ZW1(Von Kreudenstein等人,2013)、可从XENECORE有限公司获得的HA-TF(Moore GL等人,2011)、可从EMD Serono公司获得的SEEDbody(Davis JH等人,2010)等。其中,本发明中使用的EW/RVT突变体是如下的突变体,其中异源二聚体形成增强,使得通过在序列和结构上分析上述现有突变体的相互作用,形成CH3结构域相互作用表面的选择性静电键(K360ECH3A-Q347RCH3B,这是一种新的突变策略),并且形成互补的疏水键(K409WCH3A-D399VCH3B/F405TCH3B),而非现有的静电键合(Choi等人,2013;韩国专利注册号10-1522954)。

[0005] 迄今已报道的所有异源二聚体Fc变体(包括上述EW/RVT变体)是基于IgG1(其为人类抗体同工型中最丰富的),并且除了IgG1(IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM和IgM)之外没有其他同工型的变体的报道。

[0006] 在不需要抗体特异性效应功能如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的免疫调节抗体或受体激动剂融合蛋白的情况下, 由于美国食品和药物管理局 (FDA) 批准的和可商购的大多数治疗性抗体采用同工型 IgG1 (Irani 等人, 2015), 最近有一个趋势是开发基于 IgG2 或 IgG4 的治疗蛋白, 其中与 IgG1 的情况相比, 这些蛋白的效应功能显著降低。

[0007] 同时, 大多数生理活性蛋白质通常尺寸小并且在体内的半衰期短。为了解决这些缺点, 已经尝试缀合 PEG 或融合抗体衍生的 Fc (可结晶片段) 区域, 但尚未实现在长时间有效和充分维持生理活性蛋白的活性的形式的开发。特别地, 在自然界中作为单体起作用的 IL-21 的情况下, 使用同源二聚化的现有抗体 Fc 区难以维持单体形式。一种 IL-21 通过与一种 IL-21 受体 (IL21R) 和一种 γ c-链的结合而具有活性。

[0008] 在这样的技术背景下, 本发明的诸位发明人构建了异源二聚体变体, 包括抗体衍生的 Fc 区, 以便模拟作为单体起作用的 IL-21, 并且使用异源二聚体变体来开发处于异源二聚体 Fc 融合蛋白的形式的新的治疗性融合蛋白, 其中 IL-21 结合到 Fc 区的末端。

[0009] 在用作免疫治疗剂的细胞中, 作为先天免疫细胞的 NK 细胞可以杀死各种癌细胞并识别癌细胞, 不管抗原是否存在, 并且因此最近作为抗癌免疫治疗剂引起了关注。为了使用 NK 细胞作为抗癌免疫治疗剂, 必须产生大量具有增加的抗癌活性的天然杀伤细胞, 并形成其中天然杀伤细胞在体内长时间存活的环境, 以展现抗癌功效。因此, 目前正在全球范围内尝试通过体内给予影响 NK 细胞活化调节的细胞因子 (IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21 和 IFN), 连同自然杀伤细胞一起, 增加 NK 细胞的生存力并诱导其抗癌活性。然而, IL-2 是可商购并且被批准在临床试验中直接给予患者的唯一细胞因子。IL-2 增加了 NK 细胞的生存力和活性, 并且相对便宜, 同时活化作为免疫抑制细胞的调节性 T 细胞, 以抑制抗癌免疫力 (Cesana 等人, J Clin Oncol. 2006, Wei 等人, Cancer Res. 2007)。因此, 迫切需要商业化活化 NK 细胞而不活化调节性 T 细胞的细胞因子。

[0010] 在这方面, IL-21 最近在抗癌免疫疗法中引起了关注。据报道, 与 IL-2 相似, 尽管 IL-21 促进了 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的增殖和分化, 但它不会影响调节性 T 细胞的增殖, 并且因此 IL-21 与抗癌免疫治疗剂的联合给药是期望的 (Al-Chami 等人, Cytokine, 2016)。据报道, 对于 NK 细胞, IL-21 显示出以下结果: 1) 在 Fms 样酪氨酸激酶-3 (FLT3-L) 连同 IL-15 的存在下, 促进了衍生自人源 CD34⁺造血祖细胞的 NK 细胞的增殖 (Parrish-Novak 等人, Nature, 2000); 2) 促进了 NK 细胞的细胞外扩增和当膜结合形式的 IL-21 在用作滋养层细胞系的 K562 细胞中表达时的老化抑制 (Lee DA 等人, PlosOne, 2012); 3) 促进了犬 NK 细胞培养期间归因于 IL-2 加 IL-15 的增殖 (Shin 等人, Vet Immunol Immunopathol. 2015 年); 4) 通过活化人类 NK 细胞中的 STAT3 促进了 NKG2D 受体的表达 (Zhu 等人, Blood, 2014); 等等。

[0011] 因此, 在本发明中, 使用异源二聚体法制备能够长时间维持体内活性的 Fc 结合重组 IL-21, 并且发现与水溶性 IL-21 或二聚体 IL-21 相比, 制备的 Fc-IL21 单体展现出优异的 NK 细胞增殖促进作用, 并且可以通过较低频率的给药在体内诱导相对于水溶性 IL-2 或二聚体 IL-21 的优越抗肿瘤效应。包括本发明的 Fc-IL21 单体的异源二聚体 Fc 融合蛋白补充了如下缺点, 即, 在使用水溶性 IL-21 或 IL-2 时需要频繁的给药, 并且与使用现有方法制备的二聚体 IL-21 相比展现出高生物抗癌活性。

发明内容

[0012] 因此,鉴于上述问题作出了本发明,并且本发明的目的是提供一种新的异源二聚体Fc融合蛋白,其中细胞因子作为展现出生理活性的单体,其活性能够被充分维持很长一段时间。

[0013] 特别地,根据本发明的异源二聚体Fc融合蛋白质的形式模拟了自然界存在的IL-21形式,其作为单体展现出生理活性,从而维持自然界存在的IL-21的活性。与水溶性IL-21或二聚体IL-21相比,本发明的Fc-IL21单体展现出卓越的活性。

[0014] 此外,本发明的另一个目的是提供包含异源二聚体Fc融合蛋白的药物组合物、用于治疗疾病(特别是用其治疗癌症)的组合物和方法、以及该组合物用于此的用途。

[0015] 为了解决上述问题,本发明提供了一种异源二聚体Fc融合蛋白,其包含免疫球蛋白重链恒定区(Fc)对的第一Fc区和第二Fc区,并且其中IL-21与第一Fc区和/或第二Fc区的N末端或C末端中的至少一项结合,

[0016] 其中该第一Fc区和该第二Fc区的CH3结构域发生突变,从而促进异源二聚体Fc的形成。

[0017] 本发明还提供了一种包含异源二聚体Fc融合蛋白的药物组合物。

[0018] 本发明还提供了一种治疗疾病(特别是癌症)的方法,该方法包括给予包含异源二聚体Fc融合蛋白的药物组合物。

[0019] 本发明还提供了一种包含异源二聚体Fc融合蛋白的药物组合物的用于治疗疾病(特别是癌症)的用途。

附图说明

[0020] 图1是示出了待融合到重链恒定区的重组人类IL-21的形式的视图。

[0021] 图2是示出了如下的Fc-IL21二聚体形式的视图,其中人类IL-21融合到野生型IgG4Fc。

[0022] 图3是示出了如下的Fc-IL21单体形式的视图,其中人类IL-21融合到基于IgG4产生的EW/RVT变体。

[0023] 图4示出了如下的结果,其列出并比较每种人类抗体免疫球蛋白G同工型的CH3结构域的序列(IgG1:SEQ ID NO:4;IgG2:SEQ ID NO:5;IgG3:SEQ ID NO:6;IgG4:SEQ ID NO:7)并选择潜在突变位点,以便构建CH3结构域变体以形成每种人类抗体同工型的异源二聚体。

[0024] 图5示出了IgG4CH3结构域的引入野生型和变体的异源二聚体Fc对的序列信息(IgG4野生型:SEQ ID NO:7;IgG4EW:SEQ ID NO:1;和IgG4RVT:SEQ ID NO:2)。

[0025] 图6示出了与用以构建Fc-IL21二聚体和Fc-IL21单体的与IL-21融合的野生型Fc和异源二聚体Fc对的序列信息。

[0026] 图7是示出了用于在动物细胞中表达和纯化图3的融合蛋白的载体的视图。

[0027] 图8是示出了用于在动物细胞中表达和纯化图2的融合蛋白的载体的视图。

[0028] 图9示出了通过共转染在HEK293F细胞中临时表达和纯化图7和图8中的表达载体的动物细胞而获得的结果,在非还原和还原条件下在SDS-PAGE上分离3μg蛋白质,然后通过考马斯蓝染色分析蛋白质的大小和组合形式。

[0029] 图10A示出了自然杀伤细胞的生长曲线和可扩展性,作为通过用Fc-IL21单体或Fc-IL21二聚体处理细胞并在来自人类血液的自然杀伤细胞体外扩增时培养经处理的细胞执行实验的结果,并且图10B示出了对来自6个供体的重复执行的实验结果进行统计处理而获得的结果。

[0030] 图11是示出了在构建异种移植人类黑素瘤癌症模型和NK细胞治疗剂、IL-2和Fc-IL21的给药方法后,NK细胞和IL-2、Fc-IL21单体或Fc-IL21二聚体之间的联合治疗效应的图表。

[0031] 图12A示出了如下的结果,其比较在异种移植人类黑素瘤癌症模型中NK细胞和IL-2、Fc-IL21单体或Fc-IL21二聚体之间的联合治疗效应下的肿瘤大小,并且图12B示出了如下的结果,其显示在异种移植人黑素瘤癌细胞中仅用NK细胞治疗时的肿瘤大小。

[0032] 具体实施方式和示例性实施方案

[0033] 除非另有定义,否则本说明书中所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。通常,本文中使用的命名法是熟知的并且是本领域中通常使用的。

[0034] 根据本发明的实施方案,提供了一种异源二聚体Fc融合蛋白,其包含免疫球蛋白重链恒定区(Fc)对的第一Fc区和第二Fc区,并且其中IL-21与第一Fc区或第二Fc区的N末端和C末端中的一项结合,

[0035] 其中该第一Fc区和该第二Fc区的CH3结构域发生突变,从而促进异源二聚体Fc的形成。

[0036] 优选地,该异源二聚体Fc融合蛋白是如下的异源二聚体Fc融合蛋白,其中IL-21仅与该第一Fc区或该第二Fc区的N末端和C末端中的任一项结合。

[0037] 如本文所用,术语“Fc区”或“重链恒定区”是指包括衍生自抗体的CH2结构域、CH3结构域和铰链结构域的区域。

[0038] 如本文所用,表述“第一Fc区和第二Fc区的CH3结构域发生突变,从而促进异源二聚体的形成”意指在以同源二聚体形式在自然界存在的抗体的两个Fc区的某些序列中诱导突变,其中相同序列发生突变,使得通过第一Fc区和第二Fc区之间的非共价键促进异源二聚体的形成,并且同源二聚体的形成减少或优选地几乎不发生。

[0039] 优选地,根据本发明的第一Fc区和第二Fc区发生突变从而促进异源二聚体Fc的形成可能包括在抗体衍生的第一Fc区和第二Fc区中包括的相应CH3结构域发生突变,从而促进异源二聚体的形成。

[0040] 如本文所用,术语“异源二聚体Fc”或“Fc异源二聚体”是指包含第一Fc区和第二Fc区的异源二聚体,其中第一Fc区和第二Fc区的CH3结构域发生突变,从而促进异源二聚体的形成。

[0041] 本发明的第一Fc区和第二Fc区各自可能衍生自选自人类IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD和IgE的Fc区,并且优选地,第一Fc区和第二Fc区各自衍生自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0042] 另外,第一Fc区和第二Fc区衍生自同型抗体。

[0043] 在另一个实施方案中,CH3结构域的突变可包括选自下组的一个或多个突变。本发明的所有突变位点均根据EU索引。

[0044] (1) 在该第一Fc区的CH3结构域的位置K360处的氨基酸残基取代;以及在该第二Fc区的CH3结构域的位置Q347处的氨基酸残基取代;和/或

[0045] (2) 在该第一Fc区的CH3结构域的位置K409处的氨基酸残基取代;以及在该第二Fc区的CH3结构域的位置F405和/或D399处的氨基酸残基取代。

[0046] 优选地,在该第一Fc区的CH3结构域的位置K360处的氨基酸残基取代可以是K360E;并且在该第二Fc区的CH3结构域的位置Q347处的氨基酸残基取代可以是Q347R,并且

[0047] 在该第一Fc区的CH3结构域的位置K409处的氨基酸残基取代可以是K409W,在该第二Fc区的CH3结构域的位置F405处的氨基酸残基取代可以是F405T,并且在该第二Fc区的CH3结构域的位置D399处的氨基酸残基取代可以是D399V。

[0048] 最优选地,第一Fc区或第二Fc区的CH3结构域的突变可以包括选自下组的一个或多个突变(突变位点是根据EU索引):

[0049] (1) 在该第一Fc区的CH3结构域的位置K360处的K360E氨基酸残基取代;

[0050] (2) 在该第二Fc区的CH3结构域的位置Q347处的Q347R氨基酸残基取代;

[0051] (3) 在该第一Fc区的CH3结构域的位置K409处的K409W氨基酸残基取代;和

[0052] (4) 在该第二Fc区的CH3结构域的位置F405处的F405T氨基酸残基取代以及在该第二Fc区的CH3结构域的位置D399处的D399V氨基酸残基取代。

[0053] 优选地,根据本发明的抗体衍生的第一Fc区和第二Fc区各自包括的CH3结构域可以具有选自由SEQ ID NO:1和2表示的氨基酸序列的序列。

[0054] 特别地,根据本发明的抗体衍生的第一Fc区和第二Fc区可具有下表1中所示的IgG4衍生的CH3结构域序列。

[0055] 表1

[0056]

构型	第一Fc区的CH3序列 (EU编号341-447)	第二Fc区的CH3序列 (EU编号341-447)
IgG4-EW/ RVT	GQPREPQVYTLPPSQEEMTENQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGFSFLYSW LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 1)	GQPREPRVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLVSDGSFTLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 2)

[0057] 根据另一个实施方案,本发明提供了包含根据本发明的异源二聚体Fc融合蛋白的药物组合物。根据本发明的药物组合物是用于治疗癌症的药物组合物,其包含含有IL-21作为生理活性蛋白的异源二聚体Fc融合蛋白。

[0058] 可使用用于治疗癌症的包含含IL-21的异源二聚体Fc融合蛋白的药物组合物进行治疗的癌症可选自结肠癌、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,但是本发明不限于此。

[0059] 根据本发明的药物组合物还进一步包括药学上可接受的载剂。术语“药学上可接受的载剂”是指可添加到活性成分中以帮助配制或稳定制剂的物质,并且该载剂不会导致

对患者显著有害的毒性作用。

[0060] 载剂是指不刺激患者并且不妨碍根据本发明的异源二聚体Fc融合蛋白的生物活性和特征的载剂或稀释剂。作为被配制成液体溶液的组合物(适于灭菌和活体)中的药学上可接受的载剂,可以使用选自以下的一种:盐水、无菌水、林格氏溶液、缓冲盐水、白蛋白注射溶液、右旋糖溶液、麦芽糖糊精溶液、甘油和乙醇或这些成分中两种或更多种的混合物。如果需要,可以加入其他一般添加剂,如抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂等。此外,可以向组合物中进一步添加稀释剂、分散剂、表面活性剂、粘合剂和润滑剂,以配制成可注射制剂(如水溶液、悬浮液、乳液等)、丸剂、胶囊、颗粒或片剂。其他载剂可以是例如Remington's Pharmaceutical Sciences (E.W.Martin)中描述的。

[0061] 药学上可接受的载剂包括无菌水溶液或分散体和用于临时给予无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。这些介质和试剂用于药物活性材料的用途是本领域已知的。优选地,配制该组合物用于非口服注射。组合物可被配制成溶液、微乳液、脂质体或适合高药物浓度的其他定制结构。药学上可接受的载剂的例子包括溶剂或分散介质,包括水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、及其合适的混合物。在某些情况下,该组合物可包括等渗剂(如糖)、或多元醇(如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化钠。可以如下制备无菌可注射溶液:通过在适当的溶剂中掺入所需量的异源二聚体Fc融合蛋白,连同上述成分之一或其组合(如果需要)一起,并且然后对其进行无菌微滤。通常,通过将活性化合物掺入无菌运载体中来制备分散体,该无菌运载体包括基本分散介质和来自上述那些的其他所需成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,一些制备工艺涉及真空干燥和冷冻干燥(冻干),其中活性成分和任何另外的所需成分粉末由预先灭菌和预先过滤的溶液产生。

[0062] 此外,可以按可随着患病患者的严重程度而有所变化的剂量和频率口服或胃肠外给予根据本发明的药物组合物。如果需要,可以按推注或通过连续注射将组合物给予患者。在另一个实施方案中,可以直肠内、静脉内、皮下、子宫内或脑血管内给予根据本发明的药物组合物。

[0063] 此外,用于治疗癌症的包含含IL-21的异源二聚体Fc融合蛋白的药物组合物可以与其他抗癌剂一起用于联合治疗,并且其他抗癌剂可以是细胞毒性T细胞和/或自然杀伤(NK)细胞,但本发明不限于此。也就是说,可以将可在其他技术领域中使用的所有抗癌剂用于联合治疗。

[0064] 特别地,在将用于治疗癌症的包含含IL-21的异源二聚体Fc融合蛋白的药物组合物与细胞毒性T细胞和/或天然杀伤(NK)细胞一起用于联合治疗的情况下,这种情况可以使得能够

[0065] 1) 保留由IL-21诱导的NK细胞的体外增殖能力;

[0066] 2) 与仅用IL-21治疗的组相比,在体内与NK细胞联合给药时,诱导抗癌活性显著增加;或

[0067] 3) 更改由于IL-21和其他 γ 链细胞因子(例如,IL-2、IL-7、IL-15等)的半衰期较短而需要的频繁体内给药。

[0068] 在用于治疗癌症的上述药物组合物与天然杀伤(NK)细胞联合给药的情况下,与水溶性IL-21或二聚体IL-21相比,含有作为单体的IL-21的异源二聚体Fc融合蛋白展现出显著的高活性。

[0069] 根据另一个实施方案,本发明提供了一种治疗疾病的方法,其包括将包含根据本发明的异源二聚体Fc融合蛋白的药物组合物给予需要治疗的患者。

[0070] 优选地,在根据本发明的异源二聚体Fc融合蛋白中包括的生理活性蛋白是IL-21(更优选地单体IL-21)的情况下,本发明提供了治疗患有癌症的患者的方法,该癌症特别是选自以下的癌症: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。

实施例

[0071] 在下文中,将参考以下实施例进一步详细描述本发明。将对于本领域普通技术人员来说显而易见的是,提供这些实施例仅用于说明目的,并不旨在根据本发明的实质而限制本发明的范围。

[0072] 实施例1:用于形成每种人类抗体同工型的异源二聚体的CH3结构域变体的设计(测序)

[0073] 为了制备引入了CH3结构域突变(优选形成异源二聚体)的人类抗体重链恒定区(Fc)异源二聚体的片段,首先,分析CH3结构域的人类抗体同工型之间的氨基酸序列相似度,该结构域在异源二聚体形成的相互作用中起主要作用。此时,以异源CH3A:CH3B(在本发明中,CH3A和CH3B分别意指第一Fc区的CH3区和第二Fc区的CH3区)诱导的变体对(EW/RVT)使得能够高产率地形成CH3A:CH3B,作为促进Fc异源二聚体形成的策略,这在现有文献或专利中公开(Choi等人,2013;KR 10-1522954)。图4示出了如下的结果,其列出并比较每种人类抗体免疫球蛋白G(IgG)同工型(IgG1:SEQ ID NO:4;IgG2:SEQ ID NO:5;IgG3:SEQ ID NO:6;以及IgG4:SEQ ID NO:7)的CH3结构域的序列。

[0074] 表2

[0075]

构型	CH3A链 第一Fc区的CH3序列 (EU编号341-447)	CH3B链 第二Fc区的CH3序列 (EU编号341-447)
IgG1 野生型	GQPREP Q VYTLPPSRDEL T KNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTT P PVL D SDGSF F LY S KL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO: 4)	与SEQ ID NO: 7相同
IgG2 野生型	GQPREP Q VYTLPPSREEM T KNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTT P PML D SDGSF F LY S KL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO: 5)	与SEQ ID NO: 10相同
IgG3 野生型	GQPREP Q VYTLPPSREEM T KNQVSLTCLVKGFYPS DIAMEWESSGQPENNYKTT P PVL D SDGSF F LY S KL TVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO: 6)	与SEQ ID NO: 13相同
IgG4 野生型	GQPREP Q VYTLPPSQEEM T KNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTT P PVL D SDGSF F LY S RL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK (SEQ ID NO: 7)	与SEQ ID NO: 16相同

[0076] 作为序列比较的结果,可以确认粗体的Q347、K360、D399、F405和K409残基是引入了突变的残基,并且不论人类抗体IgG的亚型如何,几乎相似的残基是保守的。因此,发现为了形成异源二聚体CH3变体对而诱导的突变不限于人类抗体IgG1。在International ImMunoGeneTics信息系统(IMG;URL:<http://www.imgt.org/>)中确认每个氨基酸序列,并且本发明中所有氨基酸位点的编号是根据EU索引(编号)。

[0077] 实施例2:人类Fc-IL21融合蛋白的构建体

[0078] 在图5的同工型变体中,预期异源二聚体可成形性将维持在与先前报道的基于IgG1的EW/RVT Fc异源二聚体变体相似的水平,使用基于IgG4的变体(IgG4-EW/RVT,SEQ ID NO:1和2)构建人类白细胞介素21(IL-21,SEQ ID NO:3)-融合蛋白。自然界存在的IL-21是作为单体起作用的细胞因子,并且一种IL-21通过与一种IL-21受体(IL21R)和一种 γ c链结

合而具有活性。因此,通过使用IgG4-EW/RVT异源二聚体变体,一种IL-21仅连接到不同的异源二聚体Fc变体中一种(CH3A或CH3B),以维持自然界存在的IL-21单体形式。

[0079] 作为用于构建融合蛋白的Fc异源二聚体变体,使用IgG4-EW/RVT,其作为基于IgG4的异源二聚体而形成并且其中引入了EW/RVT突变。先前的报道已经显示,在免疫细胞因子(抗体和细胞因子的融合形式)的构建中,IgG1的内在功能(如ADCC/CDC)反而促进体内清除。因此,使用同工型IgG4构建融合蛋白,其中与IgG1相比,几乎没有展现出ADCC/CDC的功能(Gillies SD等人,1999)。

[0080] 图1-3示出了IL-21的重组蛋白,即使用野生型Fc的IL-21二聚体融合蛋白和使用EW/RVT的IL-21单体融合蛋白。其中,图3中示出了在本发明中构建的引入了CH3变体对的融合蛋白。

[0081] 引入了CH3变体对的IL21-Fc (IgG4EW) 和Fc (IgG4RVT) 被框内克隆到pcDNA3.1 (+) (Invitrogen,USA),这是具有CMV启动子的动物细胞表达载体,使用NotI/HindIII以具有信号序列-IL21成熟形式-铰链-CH2-CH3或信号序列-铰链-CH2-CH3。本文使用的IL-21是人类IL-21 (Uniprot条目名,Q9HBE4;SEQ ID NO:3),并且除了信号序列外,只使用编码成熟形式的DNA序列。特别地,将人类IL-21与Fc连接,使用铰链区,而无需用以促进与IL-21受体的相互作用的额外肽接头。本文使用的铰链区是常用的IgG1衍生的铰链,并且除了用于二聚体形成的核心铰链区中的半胱氨酸残基外,上铰链区中的半胱氨酸残基被丝氨酸残基取代,以防止在蛋白质融合期间形成不需要的二硫键。

[0082] 特别地,用于本发明中的Fc的CH2结构域是IgG2/4杂合体。IgG2/4杂合体以IgG2的下铰链部分和IgG4的CH2部分的融合形式存在。这是衍生自依库丽单抗抗体(产品名称:Soliris)的结构域,其靶向补体C5,并且是根据抗体的使用目的设计来抑制结合Fc受体的能力的结构域(以完全消除CDC功能)(Robert A等人,2009)。

[0083] 作为图3的比较实施例,构建融合了野生型Fc的Fc-IL21二聚体(图2)。如图8所示,通过使用与上述类似的方法,用限制酶NotI/HindIII,将编码人类IL-21成熟形式的DNA序列框内克隆到含有野生型IgG4CH3的动物细胞表达载体中。此时,使用的铰链区和CH2结构域也具有与构建Fc-IL21单体所用的相同的序列(参见图6)。

[0084] 表3显示了用于构建融合蛋白的人类IL-21成熟形式的氨基酸序列。

[0085] 表3

[0086]

构型	氨基酸序列 (a.a.25-155)
成熟的人类 IL-21	QDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAF SCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLKRKPPSTNAGRQKHRLT CPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQH LSSRTHGSEDS (SEQ ID NO: 3)

[0087] 实施例3:Fc-IL21融合蛋白的表达/纯化

[0088] 图3的Fc-IL21单体融合蛋白是通过用融合了人类IL-21的IgG4CH3A (EW) 和IgG4CH3B (RVT) 表达载体与聚乙烯亚胺(PEI) (Polyscience)的1:1比例的混合物瞬时转染HEK293-F (Invitrogen) 细胞并在含有无血清FreeStyle 293表达培养基 (Invitrogen) 的摇

瓶中培养细胞来制备的。将如下详细描述该方法。

[0089] 在摇瓶(Corning)中200mL转染时,将HEK293-F细胞以 1.0×10^6 细胞/ml的密度接种于180ml培养基中,并以130rpm和8%CO₂进行培养。24小时后,为了产生包含每种Fc变体的融合蛋白,将相应的CH3A和CH3B质粒稀释于10ml的FreeStyle 293表达培养基(Invitrogen)中,总共250 μ g (2.5 μ g/ml),CH3A125 μ g和CH3B 125 μ g,然后与10ml用750 μ g PEI (7.5 μ g/ml) 稀释的培养基混合,并使其在室温下反应10分钟。随后,当将得到的混合培养基加入到接种于180ml的培养基中的上述细胞中并且将细胞培养最少5天至最多7天时,由细胞产生的蛋白质(即,包括Fc变体的融合蛋白)分泌到细胞外并在培养基中积累。因此,使用蛋白A琼脂糖柱(GE healthcare),从在细胞培养后以2,500rpm离心20分钟而收集的细胞培养上清液纯化蛋白质。此时,纯化方法是根据蛋白质A柱生产商提供的标准方案,使用BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo)中的溶液测量纯化蛋白质在562nm的吸光度,并且根据所绘制的标准曲线对其量进行量化。

[0090] 在12%非还原和还原条件下,在SDS-PAGE上分析3 μ g纯化的Fc-IL21单体和Fc-IL21二聚体融合蛋白(参见图9)。在非还原条件下,在71kDa处观察到Fc-IL21单体且在86kDa处观察到Fc-IL21二聚体;并且在还原条件下,在Fc-IL21二聚体融合IL-21且仅由野生型Fc组成的情况下,在43kDa处仅观察到单个条带;而在Fc-IL21单体由IL-21融合Fc变体CH3A(EW)和未融合IL-21的Fc变体CH3B(RVT)的两个质粒组成的情况下,在43kDa和28kDa处观察到两个条带。

[0091] 表4显示了表达的Fc-IL21单体和Fc-IL21二聚体融合蛋白的纯化产率。结果值表示为三次独立实验后的平均标准误差(平均值 $\pm$ SD)。确认Fc-IL21单体形式展现的纯化产率约为Fc-IL21二聚体形式的约17倍。

[0092] 表4

[0093]

融合蛋白名称	纯化产率(每升)
Fc-IL21二聚体	3.61 ± 2.0
Fc-IL21单体	64.3 ± 6.6

[0094] 实施例4:评价人类Fc-IL21融合蛋白的NK细胞增殖能力

[0095] 在实施例3的人类IL-21融合蛋白的存在下培养外周血单核细胞、辐射照射的Jurkat细胞和EBV-LCL细胞时,确认了诱导改善NK细胞的增殖和功能。

[0096] 通过以下方法制备天然杀伤细胞的体外扩增。收集人类血液并使用Ficoll (Ficoll-paqueTM PLUS,GE healthcare)以2,500rpm离心30分钟,并且然后从血沉棕黄层中分离外周血单核细胞。随后,将已经用100Gy辐射照射的Jurkat细胞系和EBV-LCL细胞系在hRPMI培养基中共培养,其中在500U/ml的IL-2存在下,将10%FBS和1%青霉素/链霉素加入到RPMI1640培养基中,比例为1:0.5:0.5。此时,用1.25 μ M的IL-21或Fc-IL21(单体或二聚体)处理每个细胞系并培养。此后,进行培养,同时每隔4天一次将培养基替换为加入了500U/ml IL-2的hRPMI培养基。当更换培养基时,使用血细胞计数器计算细胞数,并以 2.5×10^5 个细胞/ml的密度培养约3周(韩国专利号1643165)。

[0097] 结果确认,在体外扩增来自人类血液的天然杀伤细胞时,当在用Fc-IL21单体或Fc-IL21二聚体处理后培养细胞时,Fc-IL21单体和Fc-IL21二聚体都展现出与水溶性IL-21

相似的天然杀伤细胞可扩增性2倍或更多的增加(参见图10A和表5)。此外,确认即使在对来自6个供体的NK杀伤细胞重复进行该过程时,在添加IL-21、Fc-IL21单体或Fc-IL21二聚体后培养细胞的情况也展现出显著增强的增殖性扩增能力(参见图10B)。

[0098] 表5

[0099]

	D+18倍变化
无处理	1146
IL-21 (细胞因子)	2186
Fc-IL21单体	2322
Fc-IL21二聚体	2120

[0100] 也就是说,确认了当在体外扩增和培养天然杀伤细胞治疗剂时额外添加Fc-IL21单体时,与现有方法相比,可以诱导大量的天然杀伤细胞。

[0101] 实施例5:评价人类Fc-IL21融合蛋白对体内肿瘤生长的抑制效应

[0102] 检查实施例3的人类IL-21融合蛋白对NK细胞增殖的效应是否以相同的方式在体内展现出来。

[0103] 图12示出了通过使用动物癌症模型测量小鼠中肿瘤生长抑制活性的结果。

[0104] 特别地,通过将黑素瘤细胞系A375的 2.5×10^6 个细胞皮下注射到6至7周龄的免疫缺陷小鼠(Nude)中来诱导肿瘤。当11天后形成肿瘤时,将Fc-IL21单体或Fc-IL21二聚体以相同的摩尔浓度(约580μM)每三天一次静脉内注射到细胞中,,每六天一次静脉内注射 1×10^7 个NK细胞,并且然后每3天一次测量肿瘤的大小(参见图11)。每六天一次静脉内给予NK细胞,每天两次腹膜内注射IL-2,并且每三天一次静脉内给予Fc-IL21。作为对照,从给予NK细胞的那日起持续总共3天以5000IU 6次给予IL-2。对动物癌症模型给药时,在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释Fc-IL21,并且针对Fc-IL21二聚体以10μg(约580μM)的剂量静脉内给药。

[0105] 将未给药组与先前已经验证了NK细胞的治疗效应的NK+IL-2给药组、NK+Fc-IL21单体给药组和NK+Fc-IL21二聚体给药组进行比较。结果确认,与对照组相比,在NK+IL-2给药组、Fc-IL21单体给药组和Fc-IL21二聚体给药组中展现出癌细胞生长减慢,并且最重要的是,与Fc-IL21二聚体相比,Fc-IL21单体展现出优异的抗肿瘤效应。也就是说,确认对于异种移植皮肤癌模型(人类A375黑素瘤),NK细胞治疗剂和Fc-IL21单体的联合给药增强了NK细胞的体内抗癌功能。

[0106] 另外,当不给予IL-2时,人类NK细胞不展现抗癌活性(参见图12B)。根据这些结果,确认需要联合给予IL-2以观察NK细胞的体内抗肿瘤作用。

[0107] 工业适用性

[0108] 根据本发明的异源二聚体Fc融合蛋白尽可能模拟自然界存在的作为单体的IL-21形式,并且因此可以维持自然界存在的IL-21的活性。另外,与水溶性IL-21或二聚体IL-21相比,作为单体的IL-21可以具有优异的活性,并且可以在体内展现出显著延长的半衰期。

[0109] 此外,根据本发明的异源二聚体Fc融合蛋白形式使得能够制备一种单体异源二聚体Fc融合蛋白,而无需工艺优化,如另外的纯化工艺。

[0110] 虽然已经参考其具体实施方案详细显示和描述了本发明,但是对于本领域技术人员来说显而易见的是,此具体实施方案仅仅是示例性的实施方案,并不旨在限制本发明的

范围。因此,本发明的真实范围应由所附权利要求书及其等同物限定。

[0111] 文本文件

[0112] 参见所附序列表。

序列表

<110> 高丽大学校产学协力团

亚洲大学校产学协力团

<120> 与免疫球蛋白重链恒定区异源二聚体(异源二聚体Fc)融合的I1-21(异源二聚体Fc融合IL-21)以及包含其的药物组合物

<130> PF-B2163

<140> PCT/KR2017/009570

<141> 2017-08-31

<150> KR 10-2016-0113452

<151> 2016-09-02

<160> 7

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG4-EW

<400> 1

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu

1 5 10 15

Glu Met Thr Glu Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Trp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

100 105

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG4-RVT

<400> 2

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Arg	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu
1				5					10					15	
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
			35					40					45		
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Val	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
			50					55					60		
Thr	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly
65					70					75					80
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
				85					90					95	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys					
				100					105						

<210> 3

<211> 131

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> human IL21

<400> 3

Gln	Asp	Arg	His	Met	Ile	Arg	Met	Arg	Gln	Leu	Ile	Asp	Ile	Val	Asp
1				5					10					15	
Gln	Leu	Lys	Asn	Tyr	Val	Asn	Asp	Leu	Val	Pro	Glu	Phe	Leu	Pro	Ala
			20					25					30		
Pro	Glu	Asp	Val	Glu	Thr	Asn	Cys	Glu	Trp	Ser	Ala	Phe	Ser	Cys	Phe
			35					40					45		
Gln	Lys	Ala	Gln	Leu	Lys	Ser	Ala	Asn	Thr	Gly	Asn	Asn	Glu	Arg	Ile
			50					55					60		
Ile	Asn	Val	Ser	Ile	Lys	Lys	Leu	Lys	Arg	Lys	Pro	Pro	Ser	Thr	Asn
65					70					75					80
Ala	Gly	Arg	Arg	Gln	Lys	His	Arg	Leu	Thr	Cys	Pro	Ser	Cys	Asp	Ser
				85					90					95	
Tyr	Glu	Lys	Lys	Pro	Pro	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	Arg	Phe	Lys	Ser	Leu
				100					105					110	
Leu	Gln	Lys	Met	Ile	His	Gln	His	Leu	Ser	Ser	Arg	Thr	His	Gly	Ser
				115					120					125	

Glu Asp Ser

130

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG1 WT

<400> 4

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp

1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG2 WT

<400> 5

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu

1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

65	70	75	80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
	85	90	95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
100	105		

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG3 WT

<400> 6

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu			
1	5	10	15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
	20	25	30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Met Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu			
	35	40	45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
	50	55	60
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
65	70	75	80
Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
	85	90	95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
100	105		

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG4 WT

<400> 7

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu			
1	5	10	15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
	20	25	30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
	35	40	45

Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
50						55					60				
Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly
65					70					75					80
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
				85					90					95	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys					
			100					105							

重组人类IL21



(15 kDa)

图1

Fc-IL21二聚体



人类IL21-FcWT (IgG4) 同源二聚体

(86 kDa)

图2

Fc-IL21单体

人类Fc-IL21 (EW/RVT IgG4) 异源二聚体
(71 kDa)

图3

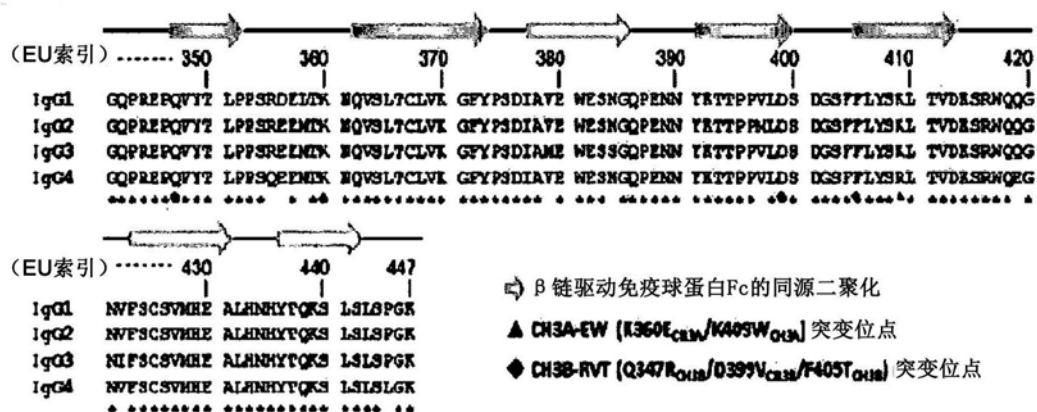


图4

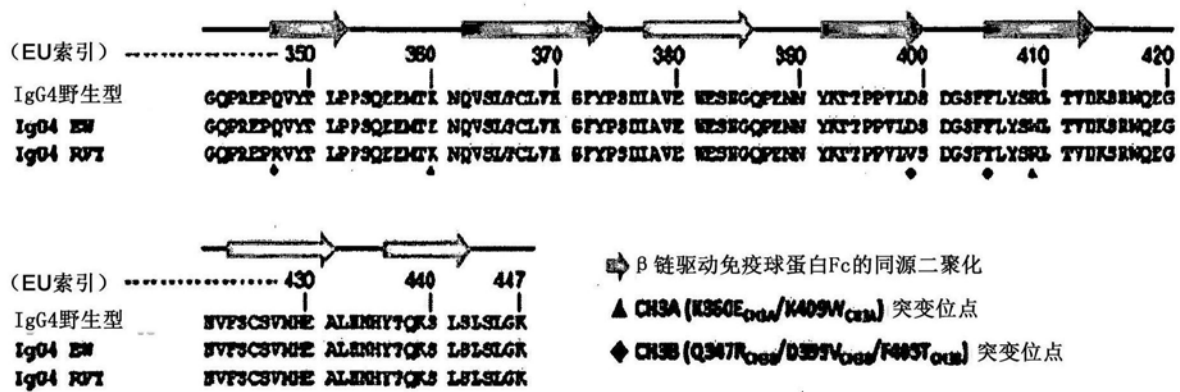


图5

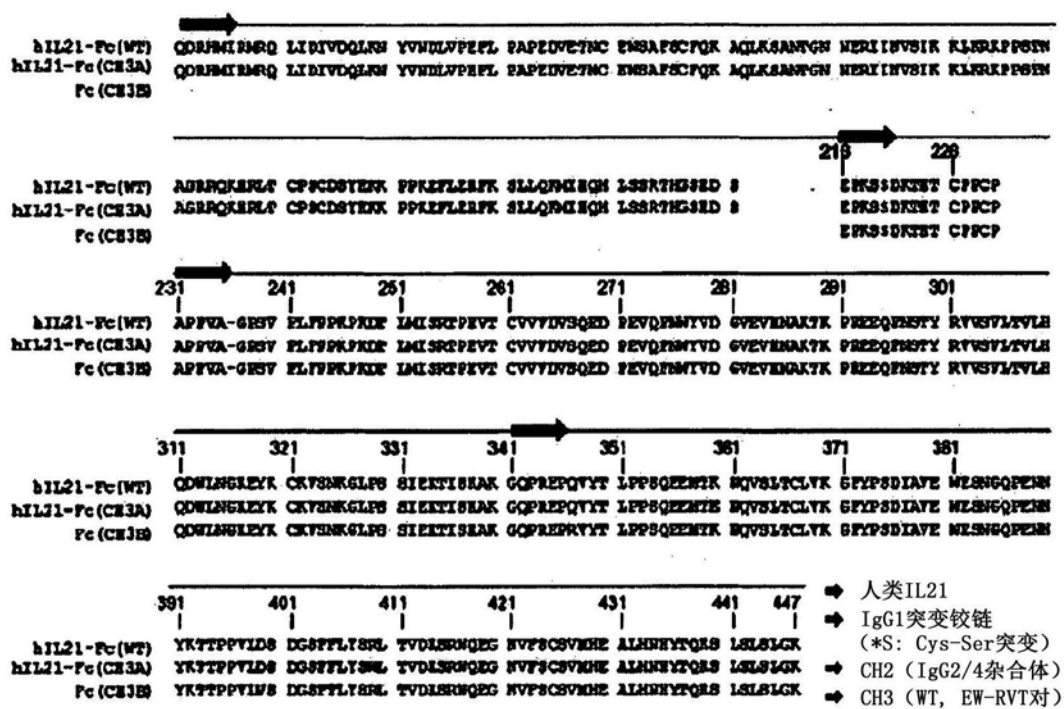


图6

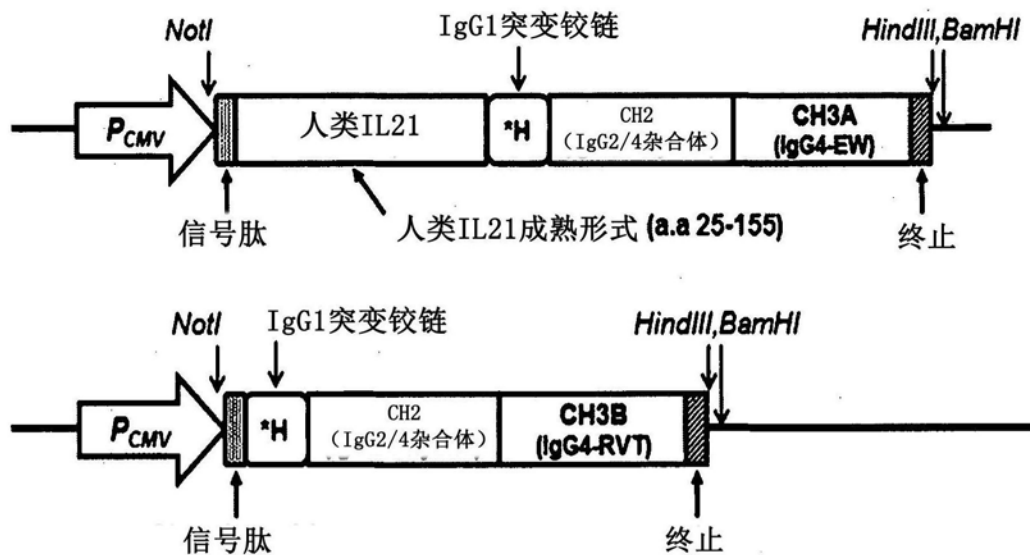


图7

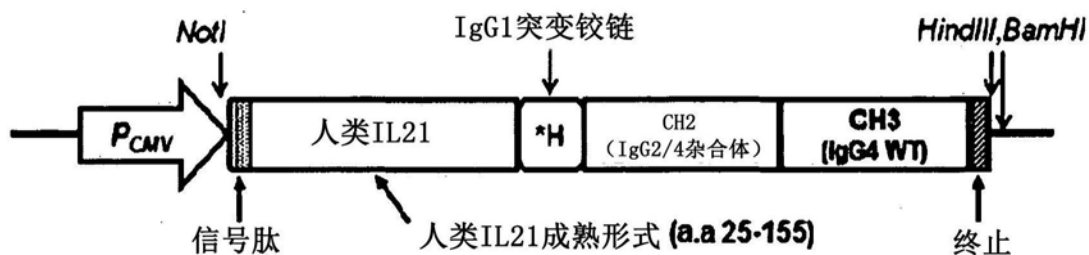


图8

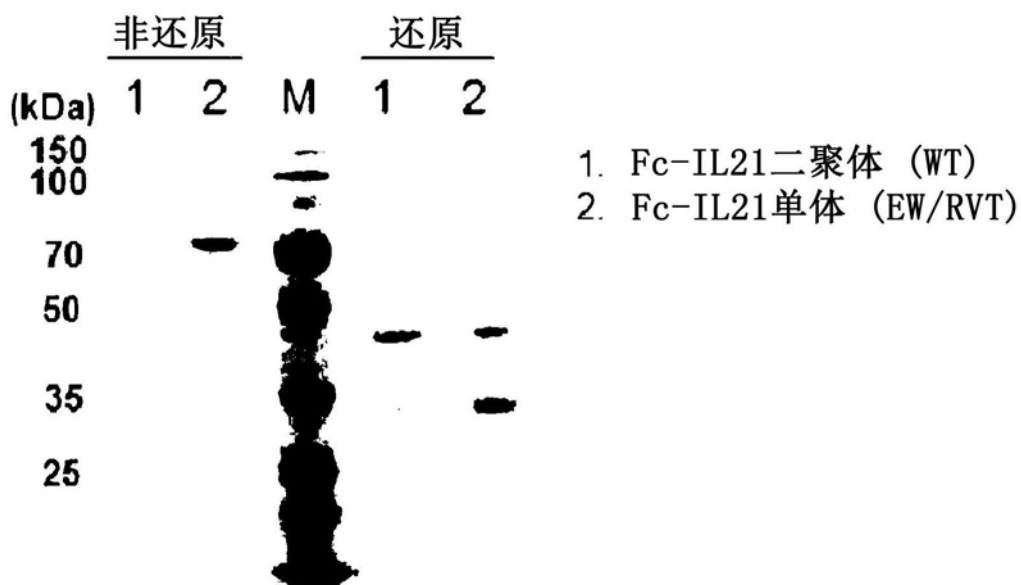


图9

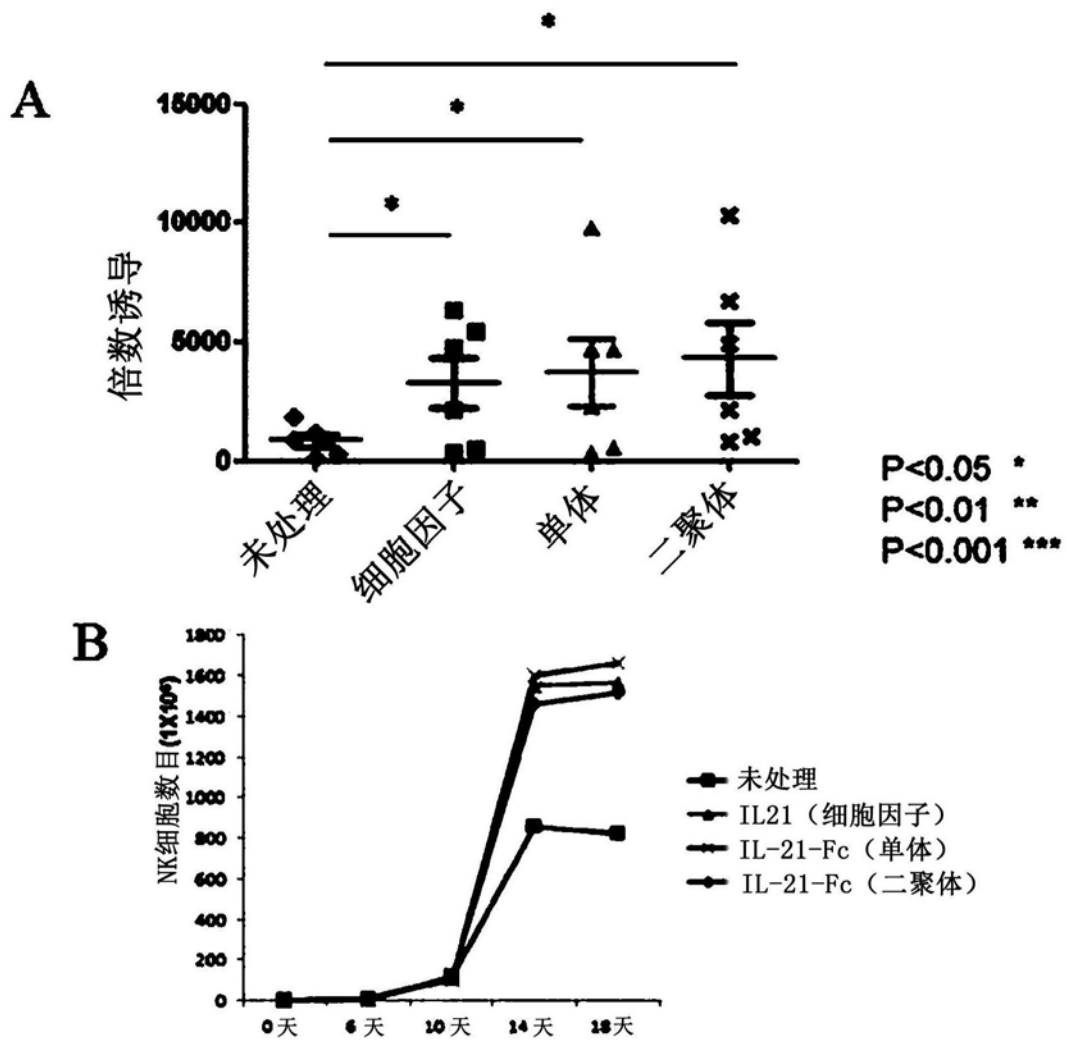


图10

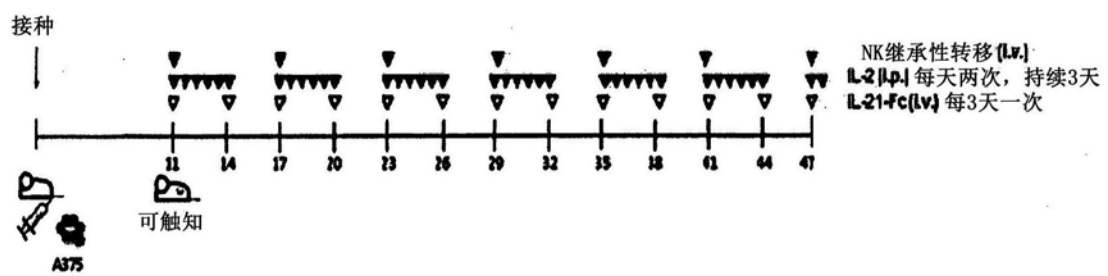


图11

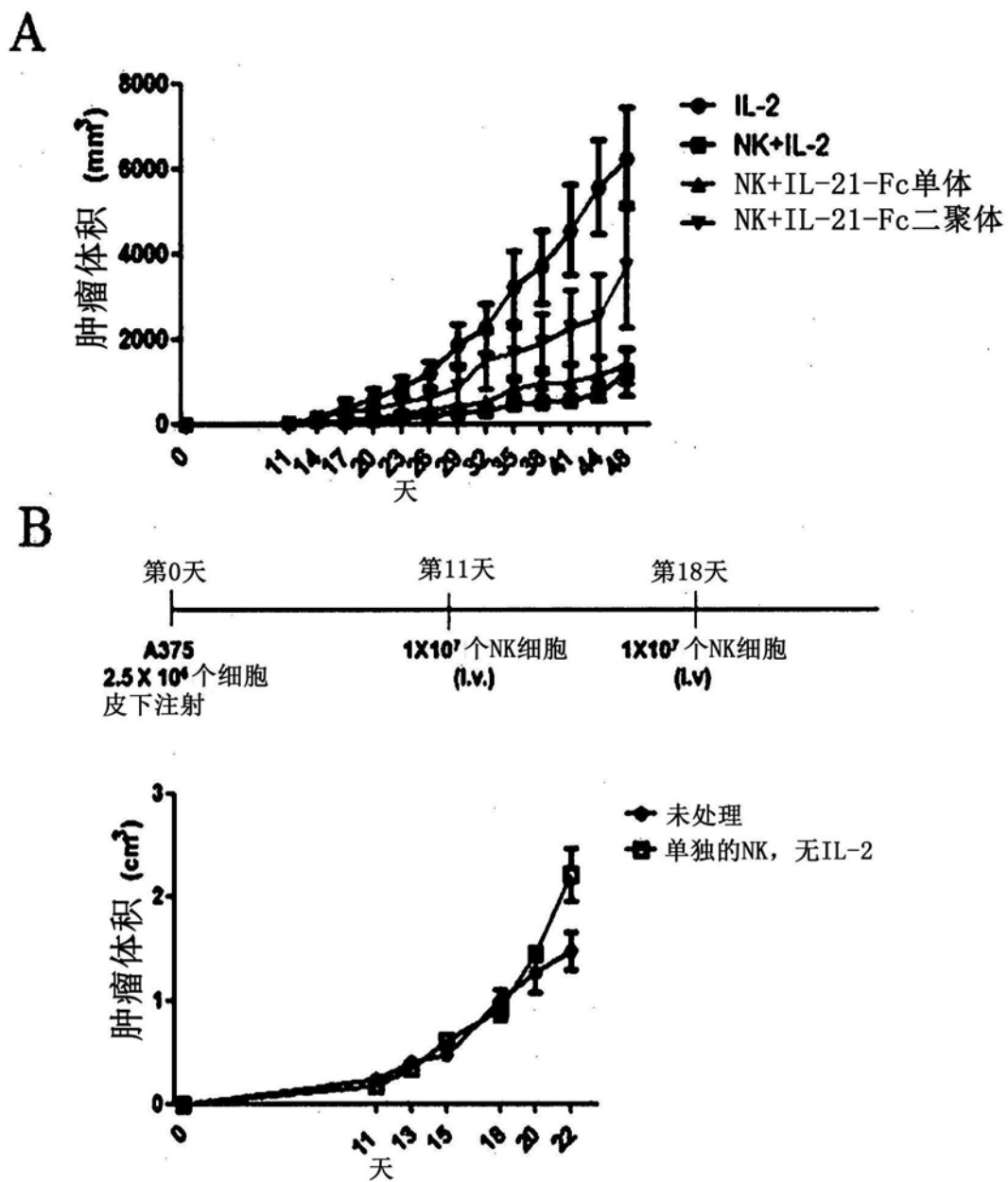


图12