



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105143253 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201480014913. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 14

C07K 14/55(2006. 01)

A61K 38/20(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/784669 2013. 03. 14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/029111 2014. 03. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/153111 EN 2014. 09. 25

(71) 申请人 美国安进公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 M. A. 加文 G. 肯南 L. 李

J. T. 皮尔森 M. 卡罗

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 罗文锋 彭昶

权利要求书5页 说明书40页

序列表34页 附图23页

(54) 发明名称

用于T调节性细胞的扩增的白细胞介素-2突变蛋白

(57) 摘要

本文中提供了优先扩增和活化T调节性细胞并且适合于大规模生产的IL-2突变蛋白和IL-2突变蛋白Fc-融合分子。本文中还提供了缺乏效应子功能或具有高度减弱的效应子功能并且具有高度稳定性(尽管在N297上缺乏糖基化)的变体人IgG1Fc分子。此外,本文中还提供了当在哺乳动物细胞中表达时被糖基化的接头肽。

1. 一种人白细胞介素-2(IL-2) 突变蛋白,其包含 V91K 取代和与 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列,其中所述 IL-2 突变蛋白优先刺激 T 调节性细胞。

2. 根据权利要求 1 所述的 IL-2 突变蛋白,其中所述突变蛋白包含与 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列

3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的人 IL-2 突变蛋白,其中所述突变蛋白包含 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列

4. 根据权利要求 1、2 或 3 所述的人 IL-2 突变蛋白,其中位置 125 是丙氨酸。

5. 根据权利要求 1、2 或 3 所述的人 IL-2 突变蛋白,其中位置 125 是半胱氨酸。

6. 一种包含 Fc 和根据权利要求 1-5 中任一项所述的人 IL-2 突变蛋白的 Fc- 融合蛋白。

7. 根据权利要求 6 所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述 Fc 是人 IgG1Fc。

8. 根据权利要求 7 所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述人 IgG1Fc 包含一个或多个改变所述 Fc 的效应子功能的突变。

9. 根据权利要求 8 所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述人 IgG1 包含 N297 上的取代。

10. 根据权利要求 9 所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述 N297 上的取代是 N297G。

11. 根据权利要求 7-10 中任一项所述的 Fc- 融合蛋白,其包含所述人 IgG Fc 的 C 末端赖氨酸的取代或缺失。

12. 根据权利要求 11 所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述人 IgG Fc 的 C 末端赖氨酸缺失。

13. 根据权利要求 6-12 中任一项所述的 Fc- 融合蛋白,其中接头连接所述蛋白的 Fc 与人 IL-2 突变蛋白部分。

14. 根据权利要求 13 所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述接头是 GGGGS(SEQ ID NO :5)、GGNGT 或 (SEQ ID NO :6) 和 YGNGT(SEQ ID NO :7)。

15. 根据权利要求 14 所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述接头是 GGGGS(SEQ ID NO :5)。

16. 根据权利要求 6-15 中任一项所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述 IL-2 突变蛋白还包含当在哺乳动物细胞中表达时改变所述 Fc- 融合蛋白的糖基化的氨基酸添加、取代或缺失。

17. 根据权利要求 16 所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述 IL-2 突变蛋白包含 T3 取代。

18. 根据权利要求 17 所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述 IL-2 突变蛋白包含 T3N 或 T3A 取代。

19. 根据权利要求 18 所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述 IL-2 突变蛋白包含 T3N 取代。

20. 根据权利要求 19 所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述 IL-2 突变蛋白还包含 S5 突变。

21. 根据权利要求 20 所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述 IL-2 突变蛋白还包含 S5T 突变。

22. 根据权利要求 6-21 中任一项所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述 Fc- 融合蛋白包含 Fc 二聚体。

23. 根据权利要求 22 所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述 Fc- 融合蛋白包含两个 IL-2 突变蛋白。

24. 根据权利要求 22 所述的 Fc- 融合蛋白,其中所述 Fc- 融合蛋白包含单个 IL-2 突变蛋白。

25. 一种分离的核酸,其编码根据权利要求 1-5 中任一项所述的人 IL-2 突变蛋白。

26. 一种分离的核酸。其编码抗体的 Fc 部分和根据权利要求 1-5 中任一项所述的人 IL-2 突变蛋白。

27. 根据权利要求 26 所述的分离的核酸,其中在单一开放阅读框架内编码抗体的所述 Fc 部分和所述人 IL-2 突变蛋白。

28. 根据权利要求 26 或 27 所述的分离的核酸,其中所述 Fc 是人 IgG1Fc。

29. 根据权利要求 28 所述的分离的核酸,其中所述人 IgG1Fc 包含一个或多个改变所述 Fc 的效应子功能的突变。

30. 根据权利要求 29 所述的分离的核酸,其中所述人 IgG1 包含 N297 上的取代。

31. 根据权利要求 28 所述的分离的核酸,其中所述 N297 上的取代是 N297G。

32. 根据权利要求 28-31 中任一项所述的分离的核酸,其编码所述人 IgG Fc 的 C 末端赖氨酸的取代或缺失。

33. 根据权利要求 32 所述的分离的核酸,其中所述人 IgG Fc 的 C 末端赖氨酸缺失。

34. 根据权利要求 26-33 中任一项所述的分离的核酸,其还编码连接抗体的 Fc 部分与人 IL-2 突变蛋白的接头。

35. 根据权利要求 34 所述的分离的核酸,其中所述接头是 GGGGS (SEQ ID NO :5)、GGNGT 或 (SEQ ID NO :6) 和 YGNGT (SEQ ID NO :7)。

36. 根据权利要求 35 所述的分离的核酸,其中所述接头是 GGGGS (SEQ ID NO :5)。

37. 根据权利要求 26-36 中任一项所述的分离的核酸,其中所述 IL-2 突变蛋白还包含当在哺乳动物细胞中表达时改变包含所述 IL-2 突变蛋白的蛋白质的糖基化的氨基酸添加、取代或缺失。

38. 根据权利要求 37 所述的分离的核酸,其中所述 IL-2 突变蛋白包含 T3 取代。

39. 根据权利要求 38 所述的分离的核酸,其中所述 IL-2 突变蛋白包含 T3N 或 T3A 取代。

40. 根据权利要求 39 所述的分离的核酸,其中所述 IL-2 突变蛋白包含 T3N 取代。

41. 根据权利要求 40 所述的分离的核酸,其中所述 IL-2 突变蛋白还包含 S5 突变。

42. 根据权利要求 41 所述的分离的核酸,其中所述 IL-2 突变蛋白还包含 S5T 突变。

43. 一种表达载体,其包含有效地连接于启动子的根据权利要求 25-42 中任一项所述的分离的核酸。

44. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求 25-42 中任一项所述的分离的核酸。

45. 根据权利要求 44 所述的宿主细胞,其中所述分离的核酸有效地连接于启动子。

46. 根据权利要求 44 或 45 所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是原核生物细胞。

47. 根据权利要求 46 所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是大肠杆菌。

48. 根据权利要求 44 或 45 所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是真核生物细胞。

49. 根据权利要求 48 所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

50. 根据权利要求 49 所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系。

51. 一种产生人 IL-2 突变蛋白的方法,其包括在其中表达所述启动子的条件下培养根据权利要求 45 至 50 中任一项所述的宿主细胞和从所述培养物收获所述人 IL-2 突变蛋白。

52. 一种产生 Fc- 融合蛋白的方法,其包括在其中表达所述启动子的条件下培养根据

权利要求 45 至 50 中任一项所述的宿主细胞和从所述培养物收获所述 Fc- 融合蛋白。

53. 一种增加 T 细胞群体中的调节性 T 细胞 (Treg) 对非调节性 T 细胞的比率的方法, 其包括将所述 T 细胞群体与有效量的根据权利要求 1-5 中任一项所述的人 IL-2 突变蛋白接触。

54. 根据权利要求 53 所述的方法, 其中 CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加。

55. 根据权利要求 54 所述的方法, 其中 CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加至少 50%。

56. 一种增加 T 细胞群体中的调节性 T 细胞 (Treg) 对非调节性 T 细胞的比率的方法, 其包括将 T 细胞的群体与有效量的根据权利要求 6-24 中任一项所述的 Fc- 融合蛋白接触。

57. 根据权利要求 56 所述的方法, 其中 CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加。

58. 根据权利要求 57 所述的方法, 其中 CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加至少 50%。

59. 一种增加受试者的外周血中的调节性 T 细胞 (Treg) 对非调节性 T 细胞的比率的方法, 其包括施用有效量的根据权利要求 1-5 中任一项所述的人 IL-2 突变蛋白。

60. 根据权利要求 59 所述的方法, 其中 CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加。

61. 根据权利要求 60 所述的方法, 其中 CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加至少 50%。

62. 一种增加受试者的外周血中的调节性 T 细胞 (Treg) 对非调节性 T 细胞的比率的方法, 其包括施用有效量的根据权利要求 6-24 中任一项所述的 Fc- 融合蛋白。

63. 根据权利要求 62 所述的方法, 其中 CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加。

64. 根据权利要求 63 所述的方法, 其中 CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加至少 50%。

65. 一种增加受试者的外周血中的调节性 T 细胞 (Treg) 对天然杀伤 (NK) 细胞的比率的方法, 其包括施用有效量的根据权利要求 1-5 中任一项所述的人 IL-2 突变蛋白。

66. 根据权利要求 65 所述的方法, 其中 CD3+FoxP3+ 细胞对表达 CD56 和 / 或 CD16 的 CD3-CD19- 淋巴细胞的比率增加。

67. 根据权利要求 66 所述的方法, 其中 CD3+FoxP3+ 细胞对表达 CD56 和 / 或 CD16 的 CD3-CD19- 淋巴细胞的比率增加至少 50%。

68. 一种增加受试者的外周血中的调节性 T 细胞 (Treg) 对天然杀伤 (NK) 细胞的比率的方法, 其包括施用有效量的根据权利要求 6-24 中任一项所述的 Fc- 融合蛋白。

69. 根据权利要求 68 所述的方法, 其中 CD3+FoxP3+ 细胞对表达 CD56 和 / 或 CD16 的 CD3-CD19- 淋巴细胞的比率增加。

70. 根据权利要求 63 所述的方法, 其中 CD3+FoxP3+ 细胞对表达 CD56 和 / 或 CD16 的 CD3-CD19- 淋巴细胞的比率增加至少 50%。

71. 一种治疗具有炎性或自身免疫性疾病的受试者的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求 1-5 中任一项所述的 IL-2 突变蛋白。

72. 一种治疗具有炎性或自身免疫性疾病的受试者的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求 6-21 中任一项所述的 Fc- 融合蛋白。

73. 根据权利要求 71 或 72 所述的治疗具有炎性或自身免疫性疾病的受试者的方法, 其

中施用导致所述疾病的至少一个症状减轻。

74. 根据权利要求 73 所述的方法,其中在所述施用后受试者的外周血中的调节性 T 细胞 (Treg) 对非调节性 T 细胞的比率增加。

75. 根据权利要求 73 所述的方法,其中在所述施用后受试者的外周血中的调节性 T 细胞 (Treg) 对非调节性 T 细胞的比率保持基本相同。

76. 根据权利要求 71-75 中任一项所述的方法,其中所述炎性或自身免疫性疾病是狼疮、移植物抗宿主病、丙型肝炎诱导的脉管炎、I 型糖尿病、多发性硬化、妊娠的自发消失、特应性疾病或炎性肠病。

77. 一种包含人 IgG1 抗体的 Fc 区的多肽,其中所述 Fc 区包含 N297G 突变并且人 IgG1 的所述 Fc 区包含与 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列的至少 90% 同一性。

78. 根据权利要求 77 所述的多肽,其中人 IgG1 的所述 Fc 区包含与 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列的至少 95% 同一性。

79. 根据权利要求 77 所述的多肽,其中人 IgG1 的所述 Fc 区包含 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列。

80. 根据权利要求 77 所述的多肽,其中人 IgG1 的所述 Fc 区还包含一个或多个稳定所述多肽的突变。

81. 根据权利要求 80 所述的多肽,其中 SEQ ID NO:3 中所示的一个或多个氨基酸被半胱氨酸取代。

82. 根据权利要求 81 所述的多肽,其中 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列的 V259、A287、R292、V302、L306、V323 或 I332 被半胱氨酸取代。

83. 根据权利要求 82 所述的多肽,其中所述 Fc 区包含 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列中的 A287C 和 L306C 取代。

84. 根据权利要求 82 所述的多肽,其中所述 Fc 区包含 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列中的 V259C 和 L306C 取代。

85. 根据权利要求 82 所述的多肽,其中所述 Fc 区包含 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列中的 R292C 和 V302C 取代。

86. 根据权利要求 82 所述的多肽,其中所述 Fc 区包含 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列中的 V323C 和 I332C 取代。

87. 一种抗体,其包含根据权利要求 77-86 中任一项所述的 Fc 区。

88. 一种 Fc-融合蛋白,其包含根据权利要求 77-86 中任一项所述的 Fc 区。

89. 一种包含接头的多肽,其中所述接头是 GGNGT (SEQ ID NO:6) 或 YGNGT (SEQ ID NO:7)。

90. 根据权利要求 89 所述的多肽,其中所述接头包含 N-糖基化。

91. 根据权利要求 89 所述的多肽,其中将所述接头插入所述多肽结构中的环或替代所述环。

92. 一种产生含无糖基化 IgG1Fc 的分子的方法,所述方法包括:

a) 在哺乳动物细胞培养物中表达编码根据权利要求 77-86 中任一项所述的多肽的核酸;和

b) 从所述培养物收获含无糖基化 IgG1Fc 的分子。

93. 一种当在哺乳动物细胞中表达时产生无糖基化含 IgG1Fc 的分子的方法,所述方法包括将所述 Fc 区中的 N297 的密码子突变成甘氨酸密码子的步骤。

94. 一种由 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:20 的序列组成的 Fc- 融合蛋白。

95. 一种核酸,其编码根据权利要求 94 所述的 Fc- 融合物。

96. 一种细胞,其包含根据权利要求 95 所述的核酸。

97. 一种产生 Fc- 融合蛋白的方法,其包括在允许其表达所述 Fc- 融合蛋白的条件下繁育根据权利要求 96 所述的细胞。

98. 一种治疗受试者的炎性或自身免疫性病况的方法,其包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求 94 所述的 Fc- 融合蛋白。

99. 根据权利要求 98 所述的方法,其中所述炎性或自身免疫性病况是移植物抗宿主病。

100. 一种监测受试者对利用根据权利要求 1 所述的人白细胞介素-2(IL-2) 突变蛋白、根据权利要求 6 所述的 Fc- 融合蛋白或根据权利要求 94 所述的 Fc- 融合蛋白的治疗的应答的方法,所述方法包括检测所述受试者中的变化,所述变化是:

- a) 体温的升高,
- b) 所述受试者的外周血中的 CRP 的增加,
- c.) 所述受试者的外周血中的血小板的减少,
- d) 所述受试者的外周血中的嗜中性粒细胞的减少,或
- e) 所述受试者的外周血中的白蛋白的减少

其中在检测到所述变化后,终止、暂停所述治疗、减少给药频率或减少给药量。

101. 根据权利要求 100 所述的方法,其中所述变化包括:

- a) 至少 0.5°C 的体温的升高,
- b) 至少 0.2mg/mL 的所述受试者的外周血中的 CRP 的增加,
- c) 至少 0.8 倍的所述受试者的外周血中的血小板的减少,
- d) 至少 0.8 倍的所述受试者的外周血中的嗜中性粒细胞的减少,或
- e) 至少 0.4 倍的所述受试者的外周血中的白蛋白的减少。

用于 T 调节性细胞的扩增的白细胞介素 -2 突变蛋白

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2013 年 3 月 14 日提交的美国临时申请系列 No. 61/784, 669 的利益。上述确定的申请通过引用并入本文。

[0003] 参考序列列表

[0004] 通过 EFS-Web 将本申请连同电子形式的序列列表一起提交。将序列列表作为 2014 年 2 月 25 日创建的标题为 A-1826-W0-PCT_ST25. txt 的文本文件（其大小为 40, 849 个字节）提供。序列列表的电子形式中的信息通过引用整体并入本文。

[0005] 背景

[0006] IL-2 所结合 3 个跨膜受体亚单位：当 IL-2 结合一起活化细胞内信号转导事件的 IL-2R β 和 IL-2R γ ，和用于稳定 IL-2 与 IL-2R β γ 之间的相互作用的 CD25 (IL-2R α)。由 IL-2R β γ 递送的信号包括 PI3- 激酶、Ras-MAP- 激酶和 STAT5 途径的那些信号。

[0007] T 细胞需要 CD25 的表达来响应通常存在于组织中的低浓度的 IL-2。表达 CD25 的 T 细胞包括抑制自身免疫性炎症所必需的 FOXP3⁺ 调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 和已被活化以表达 CD25 的 FOXP3⁻ T 细胞。FOXP3⁻CD25⁺T 效应细胞 (Teff) 可以是 CD4⁺ 或 CD8⁺ 细胞，这两种细胞都可促成炎症、自身免疫、器官移植排斥或移植物抗宿主病。IL-2- 刺激的 STAT5 信号转导对于正常 T-reg 细胞生长和存活以及对于高 FOXP3 表达是至关重要的。

[0008] 在共同拥有的 W0 2010/085495 中，我们描述了 IL-2 突变蛋白用于优先扩增或刺激 Treg 细胞的用途。当施用于受试者时，对 Treg 细胞的作用对于治疗炎症和自身免疫性疾病是有用的。虽然本文中描述的 IL-2 突变蛋白对于在体内使 Treg 细胞扩增超过 Teff 细胞是有用的，但期望产生具有人治疗剂的最佳属性的 IL-2 突变蛋白。

[0009] 概述

[0010] 本文中描述了适于高产量可制造性和具有最佳化的药理活性的 IL-2 突变蛋白。为了努力产生示例性基于 IL-2 突变蛋白的人治疗剂，产生了许多预料之外和不可预测的观察。本文中描述的 IL-2 突变蛋白是该努力的结果。

[0011] 本文中描述的 IL-2 突变蛋白具有最少数目的对 IL-2 的改变，从而减小产生针对 IL-2 突变蛋白和 / 或内源性 IL-2 的免疫应答的可能性，仍然维持 Treg 优先扩增和活化。此外，在某些实施方案中，将 IL-2 突变蛋白融合于当向受试者施用时长血清半衰期的分子，例如抗体 Fc。IL-2 突变蛋白具有短的血清半衰期（对于皮下注射，3 至 5 小时）。本文中描述的示例性 IL-2 突变蛋白 Fc 融合蛋白在人中具有至少 1 天、至少 3 天、至少 5 天、至少 10 天、至少 15 天、至少 20 天或至少 25 天的半衰期。该对 IL-2 突变蛋白的药代动力学的影响允许减少的或更少的 IL-2 突变蛋白治疗剂的给药频率。

[0012] 此外，当产生药物大分子时，必须考虑大量产生大分子的能力，同时使分子的聚集最小化并使分子的稳定性最大化。IL-2 突变蛋白 Fc- 融合分子显示此类属性。

[0013] 此外，在某些实施方案中，IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白含有 IgG1Fc 区。当期望消除 IgG1 的效应子功能（例如，ADCC 活性）时，发现位置 297 上的天冬酰胺至甘氨酸的突变 (N297G ;EU 编号方案) 提供高于导致无糖基化 IgG1Fc 的其它突变的极大改善的纯化效率

和生物物理性质。在优选实施方案中,将半胱氨酸工程化进 Fc 中以允许二硫键形成,所述二硫键增强无糖基化含 Fc 分子的稳定性。无糖基化 Fc 的有用性超过 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的情形。因此,本文中提供了包含 N297G 取代和任选地一个或多个另外的残基对半胱氨酸的取代的含 Fc 分子、Fc- 融合蛋白和抗体。

[0014] 本发明的另一个方面包括糖基化肽接头。适于 N- 糖基化的优选接头肽包括 GGNGT (SEQ ID NO:6) 或 YGNGT (SEQ ID NO:7)。

[0015] 在另一个方面,本发明提供包含 V91K 取代和与 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列的人白细胞介素 -2 (IL-2) 突变蛋白,其中所述 IL-2 突变蛋白优先刺激 T 调节性细胞。在一个实施方案中,人 IL-2 突变蛋白包含与 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述突变蛋白包含 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列。在另一个实施方案中,位置 125 为丙氨酸。在另一个实施方案中,位置 125 为半胱氨酸。

[0016] 在另一个方面,本发明提供含有 Fc 和人 IL-2 突变蛋白的 Fc- 融合蛋白。在一个实施方案中, Fc 为人 IgG1Fc。在另一个实施方案中,人 IgG1Fc 包含一个或多个改变所述 Fc 的效应子功能的突变。在另一个实施方案中,人 IgG1 包含 N297 上的取代。在另一个实施方案中,N297 上的取代为 N297G。在另一个实施方案中,Fc- 融合蛋白包含所述人 IgG Fc 的 C 末端赖氨酸的取代或缺失。在另一个实施方案中,所述人 IgG Fc 的 C 末端赖氨酸缺失。在另一个实施方案中,接头连接所述蛋白的 Fc 与人 IL-2 突变蛋白部分。在另一个实施方案中,接头为 GGGGS、GGNGT 或 YGNGT。在另一个实施方案中,接头为 GGGGS。在另一个实施方案中,IL-2 突变蛋白还包含当在哺乳动物细胞中表达时改变所述 Fc- 融合蛋白的糖基化的氨基酸添加、取代或缺失。在另一个实施方案中,IL-2 突变蛋白包含 T3 取代。在另一个实施方案中,IL-2 突变蛋白包含 T3N 或 T3A 取代。在另一个实施方案中,IL-2 突变蛋白包含 T3N 取代。在另一个实施方案中,IL-2 突变蛋白还包含 S5 突变。在另一个实施方案中,IL-2 突变蛋白还包含 S5T 突变。在另一个实施方案中,所述 Fc- 融合蛋白包含 Fc 二聚体。在另一个实施方案中,所述 Fc- 融合蛋白包含两个 IL-2 突变蛋白。在另一个实施方案中,所述 Fc- 融合蛋白包含单个 IL-2 突变蛋白。

[0017] 在另一个方面,本发明提供编码人 IL-2 突变蛋白或抗体的 Fc 部分和人 IL-2 突变蛋白的分离的核酸。在一个实施方案中,在单一开放阅读框架内编码抗体的所述 Fc 部分和人 IL-2 突变蛋白。在另一个实施方案中, Fc 为人 IgG1Fc。在另一个实施方案中,人 IgG1Fc 包含改变所述 Fc 的效应子功能的一个或多个突变。在另一个实施方案中,人 IgG1 包含 N297 上的取代。在另一个实施方案中, N297 上的取代为 N297G。在另一个实施方案中,人 IgG1Fc 包含 C 末端赖氨酸的取代或缺失。在另一个实施方案中,所述人 IgG Fc 的 C 末端赖氨酸缺失。在另一个实施方案中,核酸分子还编码连接抗体的 Fc 部分与人 IL-2 突变蛋白的接头。在另一个实施方案中,接头为 GGGGS、GGNGT 或 YGNGT。在另一个实施方案中,接头为 GGGGS。在另一个实施方案中,IL-2 突变蛋白还包含当在哺乳动物细胞中表达时改变包含所述 IL-2 突变蛋白的蛋白质的糖基化的氨基酸添加、取代和缺失。在另一个实施方案中,IL-2 突变蛋白包含 T3 取代。在另一个实施方案中,IL-2 突变蛋白包含 T3N 或 T3A 取代。在另一个实施方案中,IL-2 突变蛋白包含 T3N 取代。在另一个实施方案中,IL-2 突变蛋白还包含 S5 突变。在另一个实施方案中,IL-2 突变蛋白还包含 S5T 突变。

[0018] 在另一个方面,本发明提供了包含上述的有效地连接于启动子的分离的核酸的表达载体。

[0019] 在另一个方面,本发明提供包含上述的分离的核酸的宿主细胞。在一个实施方案中,分离的核酸有效地连接于启动子。在另一个实施方案中,所述宿主细胞是原核细胞。在另一个实施方案中,宿主细胞为大肠杆菌 (*E. coli*)。在另一个实施方案中,所述宿主细胞是真核细胞。在另一个实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞。在另一个实施方案中,宿主细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系。

[0020] 在另一个方面,本发明提供产生人 IL-2 突变蛋白的方法,所述方法包括在其中表达所述启动子的条件下培养上述宿主细胞和从所述培养物收获人 IL-2 突变蛋白。在一个实施方案中,所述方法包括在其中表达所述启动子的条件下培养上述宿主细胞和从所述培养物收获 Fc- 融合蛋白。

[0021] 在另一个方面,本发明提供增加 T 细胞群体内的调节性 T 细胞 (Treg) 对非调节性 T 细胞的比率的方法,所述方法包括将 T 细胞群体与有效量的上述人 IL-2 突变蛋白接触。在一个实施方案中, CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加。在另一个实施方案中, CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加至少 50%。

[0022] 在另一个方面,本发明提供增加 T 细胞群体内调节性 T 细胞 (Treg) 对非调节性 T 细胞的比率的方法,所述方法包括将 T 细胞群体与有效量的上述 Fc- 融合蛋白接触。在一个实施方案中, CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加。在另一个实施方案中, CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加至少 50%。

[0023] 在另一个方面,本发明提供增加受试者的外周血中的调节性 T 细胞 (Treg) 对非调节性 T 细胞的比率的方法,所述方法包括施用有效量的上述人 IL-2 突变蛋白。在一个实施方案中, CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加。在另一个实施方案中, CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加至少 50%。

[0024] 在另一个方面,本发明提供了增加受试者的外周血中的调节性 T 细胞 (Treg) 对非调节性 T 细胞的比率的方法,所述方法包括施用有效量的上述 Fc- 融合蛋白。在一个实施方案中, CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加。在另一个实施方案中, CD3+FoxP3+ 细胞对 CD3+FoxP3- 的比率增加至少 50%。

[0025] 在另一个方面,本发明提供增加受试者的外周血中的调节性 T 细胞 (Treg) 对天然杀伤 (NK) 细胞的比率的方法,所述方法包括施用有效量的上述人 IL-2 突变蛋白。在一个实施方案中, CD3+FoxP3+ 细胞对表达 CD56 和 / 或 CD16 的 CD3-CD19- 淋巴细胞的比率增加。在另一个实施方案中, CD3+FoxP3+ 细胞对表达 CD56 和 / 或 CD16 的 CD3-CD19- 淋巴细胞的比率增加至少 50%。

[0026] 在另一个方面,本发明提供增加受试者的外周血中的调节性 T 细胞 (Treg) 对天然杀伤 (NK) 细胞的比率的方法,所述方法包括施用有效量的上述 Fc- 融合蛋白。在一个实施方案中, CD3+FoxP3+ 细胞对表达 CD56 和 / 或 CD16 的 CD3-CD19- 淋巴细胞的比率增加。在另一个实施方案中, CD3+FoxP3+ 细胞对表达 CD56 和 / 或 CD16 的 CD3-CD19- 淋巴细胞的比率增加至少 50%。

[0027] 在另一个方面,本发明提供治疗具有炎性或自身免疫性疾病的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的上述 IL-2 突变蛋白。

[0028] 在另一个方面,本发明提供治疗具有炎性或自身免疫性疾病的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的上述 Fc- 融合蛋白。在一个实施方案中,施用引起疾病的至少一个症状的减轻。在另一个实施方案中,在施用后受试者的外周血中的调节性 T 细胞 (Treg) 对非 - 调节性 T 细胞的比率增加。在另一个实施方案中,在施用后受试者的外周血中的调节性 T 细胞 (Treg) 对非调节性 T 细胞受试者的比率保持基本上相同。在另一个实施方案中,炎性或自身免疫性疾病是狼疮、移植物抗宿主病、丙型肝炎诱导的脉管炎、I 型糖尿病、多发性硬化、妊娠的自发消失、特应性疾病或炎性肠病。

[0029] 在另一个方面,本发明提供了人 IgG1 抗体的 Fc 区域,其中所述 Fc 区域包含 N297G 突变,并且人 IgG1 的所述 Fc 区域包含至少 90% 的与 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列的同一性。在一个实施方案中,人 IgG1 的 Fc 区域包含至少 95% 的与 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列的同一性。在另一个实施方案中,人 IgG1 的 Fc 区域包含 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列。在另一个实施方案中,人 IgG1 的 Fc 区域还包含一个或多个突变来稳定多肽。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:3 中所示的一个或多个氨基酸被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列的 V259、A287、R292、V302、L306、V323 或 I332 被半胱氨酸取代。在另一个实施方案中,Fc 区域包含 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列中的氨基酸序列的 A287C 和 L306C 取代。在另一个实施方案中,Fc 区域包含 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列中的 V259C 和 L306C 取代。在另一个实施方案中,Fc 区域包含 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列中的 R292C 和 V302C 取代。在另一个实施方案中,Fc 区域包含 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列中的 V323C 和 I332C 取代。

[0030] 在另一个方面,本发明提供包含上述 Fc 区域的抗体。

[0031] 在另一个方面,本发明提供包含上述 Fc 区域的 Fc- 融合蛋白。

[0032] 在另一个方面,本发明提供包含接头的多肽,其中所述接头是 GGNGT 或 YGNGT。在一个实施方案中,所述接头包含 N- 糖基化。在另一个实施方案中,所述接头被插入多肽结构或替代多肽结构中的环。

[0033] 在另一个方面,本发明提供产生无糖基化含 IgG1Fc 分子的方法,所述方法包括在哺乳动物培养物中编码表达上述多肽的核酸和从所述培养物收获无糖基化含 IgG1Fc 分子。

[0034] 在另一个方面,本发明提供当在哺乳动物细胞中表达时提供产生无糖基化含 IgG1Fc 分子的方法,所述方法包括将 Fc 区域中的 N297 的密码子突变成氨基酸密码子的步骤。

[0035] 在另一个方面,本发明提供了由 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:20 的序列组成的 Fc- 融合蛋白。在一个实施方案中,本发明提供了编码 Fc- 融合蛋白的核酸。在另一个实施方案中,本发明提供了包含所述核酸的细胞。在另一个实施方案中,本发明提供了产生 Fc- 融合蛋白的方法,所述方法包括在允许其表达所述 Fc- 融合蛋白的条件下孵育所述细胞。在另一个实施方案中,本发明提供了治疗受试者的炎性或自身免疫性病况的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的 Fc- 融合蛋白。在另一个实施方案中,炎性或自身免疫性病况是移植物抗宿主病。

[0036] 在另一个方面,本发明提供监测受试者对利用上述人白细胞介素 -2 (IL-2) 突变蛋白或上述 Fc- 融合蛋白的应答的方法,所述方法包括检测所述受试者中的变化,所述变

化是体温的升高、所述受试者的外周血中的 CRP 的增加、所述受试者的外周血中的血小板的减少、所述受试者的外周血中的嗜中性粒细胞的减少或所述受试者的外周血中的白蛋白的减少,其中在检测到所述变化后,终止、暂停所述治疗、减少给药频率或减少给药量。在一个实施方案中,所述变化包括至少 0.5℃ 的体温的升高、至少 0.2mg/mL 的所述受试者的外周血的 CRP 的增加、至少 0.8 倍的所述外周血中的血小板的减少、至少 0.8 倍的所述受试者的外周血中的嗜中性粒细胞的减少或至少 0.4 倍的受试者的外周血中的白蛋白的减少。

[0037] 附图简述

[0038] 图 1. 在短期刺激测定中,通过与 IgG-Fc 的 C 末端的融合产生的同源二聚化不改变具有减小的效力和具有针对 CD25 的高亲和力的 IL-2 突变蛋白的活性。

[0039] 图 2A 和图 2B. 测试具有指定的突变和融合于 Fc- 异二聚体的一侧的 C 末端的 IL-2 突变蛋白刺激 T 细胞中的 STAT5 磷酸化的能力。这些突变蛋白还含有赋予对于 CD25 的高亲和力的 3 个突变 (V69A、N71R、Q74P)。将它们的活性与无 Fc 融合的 IL-2 的 3 个形式 (空心符号) 相比较: WT IL-2、HaWT (对于 CD25 的高亲和力) (N29S、Y31H、K35R、T37A、K48E、V69A、N71R、Q74P) 和 HaD (对于 CD25 的高亲和力和减小的信号转导活性) (N29S、Y31H、K35R、T37A、K48E、V69A、N71R、Q74P、N88D)。显示了被门控的 FOXP3+CD4+ 和 FOXP3-CD4+ T 细胞的磷 -STAT5 应答。

[0040] 图 3. 响应融合于 Fc- 异二聚体的 IL-2 突变蛋白的滴定的 T 细胞亚组的增殖。将融合蛋白的活性与无 Fc 融合的 IL-2 的 3 个形式 (空心符号): WT IL-2、HaWT (对于 CD25 的高亲和力) (N29S、Y31H、K35R、T37A、K48E、V69A、N71R、Q74P) 和 HaD (对于 CD25 的高亲和力和减小的信号转导活性) (N29S、Y31H、K35R、T37A、K48E、V69A、N71R、Q74P、N88D) 相比较

[0041] 图 4. 响应融合于 Fc- 异二聚体的 IL-2 突变蛋白的滴定的 NK 细胞的增殖。将融合蛋白的活性与无 Fc 融合的 IL-2 的 3 个形式 (空心符号): WT IL-2、HaWT (对于 CD25 的高亲和力) (N29S、Y31H、K35R、T37A、K48E、V69A、N71R、Q74P) 和 HaD (对于 CD25 的高亲和力和减小的信号转导活性) (N29S、Y31H、K35R、T37A、K48E、V69A、N71R、Q74P、N88D) 相比较。

[0042] 图 5. 响应融合于 Fc- 异二聚体 N297G 的 IL-2 突变蛋白的滴定的 T 细胞亚组的增殖。将 Fc. 突变蛋白的活性与 WT IL-2 (空心圆) 和 Fc. WT (实心圆) 相比较。赋予对于 CD25 的高亲和力的突变 (HaMut1) 是 V69A 和 Q74P。

[0043] 图 6. 响应融合于 Fc- 同二聚体 N297G 的 IL-2 突变蛋白的滴度的 NK 细胞的增殖。将 Fc. 突变蛋白的活性与 WT IL-2 (空心圆) 和 Fc. WT (实心圆) 相比较。

[0044] 图 7A 和图 7B. 赋予对于 CD25 的高亲和力的无突变的 Fc. IL-2 突变蛋白促进人源化小鼠中的 Treg 扩增和 FOXP3 上调。

[0045] 图 8. 低周剂量 (每动物 0.5 μg) 的 Fc. IL-2 突变蛋白促进人源化小鼠中的 Treg 扩增和 FOXP3 上调,对于 Fc. V91K 相对于 Fc. N88D 和 Fc. WT 观察到更高的活性。

[0046] 图 9A. Fc. V91K 和 Fc. N88D 通过与 CD25 的缔合保留在活化的 T 细胞的表面上。

[0047] 图 9B. Fc. V91K 和 Fc. N88D 相对于 Fc. WT 的 IL-2R 信号转导的持续。

[0048] 图 10A 和 B. 在食蟹猴中 Fc. V91K 的 2 周与 4 周给药间隔的比较,以及 IV 与 SC 给药途径的比较。

[0049] 图 11A-F. 利用 PROLEUKIN[®]、Fc. V91K 和 Fc. N88D 的不同给药方案处理的食蟹

猴中的细胞应答、体温和血清 CRP 的动力学。

[0050] 图 12A. PROLEUKIN[®]、Fc.V91K 或 Fc.N88D 的递增剂量对食蟹猴中的 Treg 细胞、NK 细胞、CD4⁺FOXP3 T 细胞和 CD8⁺FOXP3 T 细胞的水平的作用。每一个数据点代表 4 只动物的平均峰值应答。

[0051] 图 12B. PROLEUKIN[®]、Fc.V91K 或 Fc.N88D 的递增剂量对食蟹猴中的 Treg 细胞和嗜酸细胞的水平的作用。每一个数据点代表 4 只动物的平均峰值应答。

[0052] 图 12C. PROLEUKIN[®]、Fc.V91K 或 Fc.N88D 的递增剂量对食蟹猴中的 Treg 细胞和 CRP 的水平以及对体温的作用。每一个数据点代表 4 只动物的平均峰值应答。

[0053] 图 12D. PROLEUKIN[®]、Fc.V91K 或 Fc.N88D 的递增剂量对食蟹猴中的 Treg 细胞、血小板、嗜中性粒细胞和白蛋白的水平的作用。每一个数据点代表 4 只动物的平均峰值应答。将右边的 y- 轴倒置以表达相对于给药前样品的血小板、嗜中性粒细胞或白蛋白的倍数减少。

[0054] 图 13. 用 Fc.V91K 处理的食蟹猴的抗药抗体 (ADA) 的发展的动力学。

[0055] 优选实施方案的详述

[0056] 本文中使用的章节标题仅用于组织目的, 并且不应当被解释为限制所描述的主题。本说明书的正文中引用的所有参考文献通过引用整体明确地并入。

[0057] 标准技术可以用于重组 DNA、寡核苷酸合成、组织培养和转化、蛋白纯化等。酶促反应和纯化技术可以按照制造商的说明书或如本领域中通常实现的或如本文中所描述的来进行。以下方法和技术通常可根据本领域熟知的和如在整个说明书中所引用和论述的各种一般和更具体的参考文献中描述的常规方法来进行。参见, 例如, Sambrook 等人, 2001, Molecular Cloning :A Laboratory Manuel, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, cold Spring Harbor, N. Y., 其出于任何目的通过引入本文。除非提供具体的定义, 否则与本文中描述的分析化学、有机化学及医学和药物化学结合使用的命名法, 以及所述学科的实验室方法和技术是本领域中公知的和常用的那些术语和技术。标准技术可用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。

[0058] IL-2

[0059] 本文中描述的 IL-2 突变蛋白是野生型人 IL-2 的变体。如本文中所用, “野生型人 IL-2”、“野生型 IL-2”或“WT IL-2”将意指具有下列氨基酸序列的多肽:

[0060] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEV LNLAQSKNFHLR

[0061] PRDLISNINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT

[0062] 其中 X 为 C、S、V 或 A (SEQ ID NO:2)。

[0063] 变体可含有野生型 IL-2 氨基酸序列中的一个或多个取代、缺失或插入。残基在本文中通过一字母氨基酸代码后跟 IL-2 氨基酸位置来命名, 例如, K35 是 SEQ ID NO:2 的位置 35 上的赖氨酸残基。取代通过一字母氨基酸代码后跟 IL-2 氨基酸位置, 然后后跟取代一字母氨基酸代码来命名, 例如, K35A 是丙氨酸残基对 SEQ ID NO:2 的位置 35 上的赖氨酸残基的取代。

[0064] IL-2 突变蛋白

[0065] 本文中提供优先刺激T调节性(Treg)细胞的人IL-2突变蛋白。如本文中所示,“优先刺激T调节性细胞”意指所述突变蛋白相对于CD3+FoxP3-T细胞优先促进CD3+FoxP3+T细胞的增殖、存活、活化和/或功能。测量优先刺激Treg的能力的方法可通过外周血白细胞的流式细胞术来测量,其中存在观察到的总CD4+T细胞中的FOXP3+CD4+T细胞的百分比的增加、总CD8+T细胞中的FOXP3+CD8+T细胞的百分比的增加、FOXP3+T细胞相对于NK细胞的百分比的增加和/或FOXP3+T细胞的表面上的CD25的表达水平相对其它T细胞上的CD25表达的升高的更大的升高。Treg细胞的优先生长还可被检测为从全血提取的DNA中去甲基化FOXP3启动子DNA(即Treg特异性去甲基化区域或TSDR)相对于去甲基化CD3基因的增加的表达,如通过来自亚硫酸氢盐处理的基因组DNA的聚合酶链式反应(PCR)产物的测序检测的(J. Sehouli, 等人 2011. Epigenetics 6:2, 236-246)。

[0066] 优先刺激Treg细胞的IL-2突变蛋白使受试者或外周血样品中CD3+FoxP3+T细胞相对CD3+FoxP3-T细胞的比率增加至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少150%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%、至少600%、至少700%、至少800%、至少900%或至少1000%。

[0067] 优选IL-2突变蛋白包括但不限于在SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列中包含V91K或N88D取代的IL-2突变蛋白。示例性IL-2突变蛋白示于SEQ ID NO:1中。特别优选的是SEQ ID NO:1中所示的包含C125A取代的氨基酸序列。虽然可有利地减少对野生型IL-2序列的进一步突变的数目,但本发明包括具有截短或除了V91K或N88D取代以外的另外的插入、缺失或取代的IL-2突变蛋白,只要所述突变蛋白维持优先刺激Treg的活性。因此,实施方案包括优先刺激Treg细胞并且包含与SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的具有V91K或N88D的氨基酸序列的IL-2突变蛋白。在特别优选的实施方案中,在特别优选的实施方案中,此类IL-2突变蛋白包含与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0068] 对于氨基酸序列,通过使用本领域已知的标准技术来测定序列同一性和/或相似性,所述技术包括但不限于Smith和Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482的局部序列同一性算法、Needleman和Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443的序列同一性比对算法、Pearson和Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 85:2444的相似性搜索法、这些算法的计算机化实现(Wisconsin Genetics软件包, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. 中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)、由Devereux等人, 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395描述的最佳匹配序列程序(优选地使用默认设置或通过检查)。优选地,百分比同一性通过基于下列参数的FastDB来计算:为1的错配罚分;为1的空位罚分;为0.33的空位大小罚分;和为30的连接罚分,“Current Methods in Sequence Comparison and Analysis,” Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, 第127-149页(1988), Alan R. Liss, Inc.

[0069] 有用的算法的实例是PILEUP。PILEUP使用渐近、双序列比对从一组相关序列产生多重序列比对。其还可绘制显示被用于产生比对的聚类关系的树。PILEUP使用Feng&Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360的渐近比对的简化形式;所述方法与由

Higgins 和 Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153 描述的方法类似。有用的 PILEUP 参数包括 3.00 的默认空位权重、0.10 的默认空位长度权重和加权端隙。

[0070] 有用的算法的另一个实例是 Altschul 等人, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul 等人, 1997, NucleicAcidsRes. 25:3389-3402; 和 Karin 等人, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:5873-5787 中描述的 BLAST 算法。特别有用的 BLAST 程序是从 Altschul 等人, 1996, Methods in Enzymology 266:460-480 获得的 WU-BLAST-2 程序。WU-BLAST-2 使用几个搜索参数, 其大部分被设置为默认值。可调整的参数被设置为下列值: 重叠间隔 = 1, 搭接系数 = 0.125, 字域 (T) = II。HSP S 和 HSP S2 参数是动态值并且取决于特定序列的组成和针对其搜索目标序列的特定数据库的组成, 由程序本身确定; 然而, 可调整所述值以增加灵敏度。

[0071] 另外有用的算法是如由 Altschul 等人, 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 中报导的空位 BLAST。空位 BLAST 使用 BLOSUM-62 取代分数; 设定为 9 的阈值 T 参数; 触发非空位延伸的双击法、为 k 的缺口长度变化 (charges gap length)、为 $10+k$ 的成本; 设定为 16 的 X_{g} , 和设定为 40 (对于数据库搜索阶段) 和 67 (对于算法的输出阶段) 的 X_{g} 。空位比对通过对应于约 22 比特的分数来触发。

[0072] 虽然可预先确定用于引入氨基酸序列变化的位点或区域, 但不必预先确定突变本身。例如, 为了使给定位点上的突变的性能最优化, 可在靶密码子或区域上进行随机诱变, 并且筛选表达的 IL-2 突变蛋白的期望的活性的最佳组合。用于在具有已知序列的 DNA 中的预定位置上产生取代突变的技术是公知的, 例如, M13 引物诱变和 PCR 诱变。突变体的筛选可以例如使用本文中描述的测定来进行。

[0073] 氨基酸取代通常是单个残基; 插入通常将大致为约一 (1) 至约二十 (20) 个氨基酸残基, 尽管显著更大的插入可被耐受。缺失可在约一 (1) 至约二十 (20) 个氨基酸残基的范围内, 尽管在一些情况下缺失可以大得多。

[0074] 取代、缺失、插入或其任意组合可用于获得最终的衍生物或变体。一般地, 对少数氨基酸进行这些变化以使分子的改变, 特别地抗原结合蛋白的免疫原性和特异性的改变最小。然而, 在某些情况下可耐受更大的变化。通常按照如表 1 描绘的图表产生保守取代。

[0075] 表 1

[0076]

原始残基	示例性取代
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[0077] 功能或免疫同一性的显著变化可通过选择不如表 1 中显示的取代保守的取代来产生。例如,可产生更显著地影响如下方面的取代:改变的区域中的多肽主链的结构,例如 α 螺旋或 β 折叠结构;分子在靶位点上的电荷或疏水性;或侧链的大小。一般被预期产生多肽性质的最大变化的取代是其中 (a) 亲水性残基例如丝氨酰基或苏氨酰基取代疏水性残基例如亮氨酰基、异亮氨酰基、苯丙氨酰基、缬氨酰基或丙氨酰基或被所述疏水性残基取代;(b) 半胱氨酸或脯氨酸取代任何其它残基或被所述任何其它残基取代;(c) 具有带正电的侧链的残基例如赖氨酰基、精氨酰基或组氨酰基取代带负电的残基例如,谷氨酰基或天冬氨酰基或被所述带负电的残基取代;或 (d) 具有庞大侧链的残基例如苯丙氨酸取代不具有侧链的氨基酸例如甘氨酸或被所述不具有侧链的氨基酸取代。

[0078] 变体通常展现相同性质的生物活性并且将引发与天然存在的类似物相同的免疫应答,尽管变体也被选择来根据需要改变 IL-2 突变蛋白的特性。或者,可设计变体以使得 IL-2 突变蛋白的生物活性被改变。例如,可如本文中所述改变或除去糖基化位点。

[0079] 具有延长的血清半衰期的 IL-2 突变蛋白

[0080] 因为本文中提供的 IL-2 突变蛋白比例如 Teff 或 NK 细胞优先扩增 Treg, 因此预期当向患者施用安全性特征将与野生型 IL-2 或 PROLEUKIN[®] (阿地白介素; Novartis, Basel, Switzerland) 的安全性特征不同。与野生型 IL-2 或 PROLEUKIN[®] 相关的副作用包括流感样症状、寒战/僵硬、关节痛、发热、皮疹、瘙痒、注射部位反应、低血压、腹泻、恶心、焦虑、困惑和抑郁症。本文中提供的 IL-2 突变蛋白可被改变以包括或融合于延

长突变蛋白的血清半衰期而不增加风险的分子,所述风险是这样的半衰期延长会增加患者的副作用或不利事件的可能性或强度。这样的延长的血清半衰期突变蛋白的皮下给药可允许以更低的全身最大暴露 (C_{max}) 进行长期目标覆盖。延长的血清半衰期可允许突变蛋白的更低或更少频率的给药方案。

[0081] 本文中提供的 IL-2 突变蛋白的血清半衰期可通过本领域中已知的基本上任何方法来延长。此类方法包括改变 IL-2 突变蛋白的序列以包括结合新生 Fc γ 受体或结合具有延长的血清半衰期的蛋白的肽,例如 IgG 或人血清白蛋白。在其它实施方案中,将 IL-2 突变蛋白融合于赋予融合分子延长的半衰期的多肽。此类多肽包括 IgG Fc 或结合新生 Fc γ 受体的其它多肽、人血清白蛋白或结合具有延长的血清半衰期的蛋白的多肽。在优选实施方案中,将 IL-2 突变蛋白融合于 IgG Fc 分子。

[0082] 可将 IL-2 突变蛋白融合于 IgGFc 区的 N 末端或 C 末端。如实施例中显示的,与 IgGFc 区的 C 末端的融合以比当融合于 IgGFc 的 N 末端时更高的程度维持 IL-2 突变蛋白活性。

[0083] 本发明的一个实施方案涉及通过将 IL-2 突变蛋白融合于抗体的 Fc 区产生的包含 2 个 Fc- 融合多肽的二聚体。所述二聚体可通过例如将编码融合蛋白的基因融合物插入适当的表达载体,在利用重组表达载体转化的宿主细胞中表达所述基因,和使表达的融合蛋白装配得非常象抗体分子(由此链间键在 Fc 部分之间形成以产生二聚体)来产生。

[0084] 如本文中所示,术语“Fc 多肽”或“Fc 区域”包括来源于抗体的 Fc 区的多肽的天然和突变蛋白形式。还包括含有促进二聚化的铰链区的此类多肽的截短形式。在某些实施方案中,Fc 区包含抗体的 CH2 和 CH3 结构域。连同延长的血清半衰期一起,包含 Fc 部分的融合蛋白(和由此形成的寡聚物)赋予容易纯化(通过在蛋白 A 或蛋白 G 柱上进行亲和层析)的有利方面。优选的 Fc 区来源于人 IgG,所述 IgG 包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。在本文中,Fc 内的特定残基通过位置来确定。所有 Fc 位置基于 EU 编号方案。

[0085] 抗体的 Fc 部分的功能之一是当抗体结合其靶时与免疫系统连通。这被认为是“效应子功能”。连通导致抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。ADCC 和 ADCP 通过 Fc 对免疫系统的细胞表面上的 Fc 受体的结合来介导。CDC 通过 Fc 与补体系统的蛋白例如 C1q 的结合来介导。

[0086] IgG 亚类在其介导效应子功能的能力上变化。例如,IgG1 在介导 ADCC 和 CDC 上优于 IgG2 和 IgG4 许多。因此,在其中效应子功能是不想要的实施方案中,IgG2 Fc 可以是优选的。然而,已知含 IgG2Fc 分子相较于含 IgG1 Fc 分子更难以制造和具有更少的吸引人的生物物理性质,诸如更短的半衰期。

[0087] 抗体的效应子功能可通过将一个或多个突变引入 Fc 来增强或减弱。本发明的实施方案包括具有经工程改造以增强效应子功能 (U. S. 7, 317, 091 和 Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20 :685-691, 2009 ;两者通过引用整体并入本文) 的 Fc 的 IL-2 突变蛋白 Fc 融合蛋白。具有增强的效应子功能的示例性 IgG1 Fc 分子包括具有下列取代的所述分子:

[0088] S239D/I332E

[0089] S239D/A330S/I332E

[0090] S239D/A330L/I332E

[0091] S298A/D333A/K334A

- [0092] P247I/A339D
- [0093] P247I/A339Q
- [0094] D280H/K290S
- [0095] D280H/K290S/S298D
- [0096] D280H/K290S/S298V
- [0097] F243L/R292P/Y300L
- [0098] F243L/R292P/Y300L/P396L
- [0099] F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
- [0100] G236A/S239D/I332E
- [0101] K326A/E333A
- [0102] K326W/E333S
- [0103] K290E/S298G/T299A
- [0104] K290N/S298G/T299A
- [0105] K290E/S298G/T299A/K326E
- [0106] K290N/S298G/T299A/K326E

[0107] 增强含 IgG Fc 蛋白的效应子功能的另一种方法是通过减少 Fc 的岩藻糖基化。从连接于 Fc 的双触角复合型寡糖除去核心岩藻糖极大地增强 ADCC 效应子功能而不改变抗原结合或 CDC 效应子功能。已知用于减少或消除含 Fc 分子例如抗体的岩藻糖基化的几个方法。这些方法包括在某些哺乳动物细胞系 (FUT8 敲除细胞系、变异 CHO 系 Lec13、大鼠杂交瘤细胞系 YB2/0、包含特异性针对 FUT8 基因的小干扰 RNA 和共表达 β -1,4-N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 III 和高尔基 α -甘露糖苷酶 II 的细胞系) 中的重组表达。或者,可将含 Fc 分子在非哺乳动物细胞诸如植物细胞、酵母或原核细胞例如大肠杆菌中表达。

[0108] 在本发明的优选实施方案中,IL-2 突变蛋白 Fc-融合蛋白包含经工程改造以减弱效应子功能的 Fc。具有减弱的效应子功能的示例性 Fc 分子包括具有下列取代的那些分子:

- [0109] N297A 或 N297Q (IgG1)
- [0110] L234A/L235A (IgG1)
- [0111] V234A/G237A (IgG2)
- [0112] L235A/G237A/F318A (IgG4)
- [0113] H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)
- [0114] C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)
- [0115] C226S/C229S/F233P/L234V/L235A (IgG1)
- [0116] L234F/L235E/P331S (IgG1)
- [0117] S267E/L328F (IgG1)

[0118] 已知人 IgG1 在 N297 (EU 编号系统) 上具有糖基化位点并且糖基化促成 IgG1 抗体的效应子功能。示例性 IgG1 序列提供于 SEQ ID NO :3 中。研究小组已突变 N297 以试图产生无糖基化抗体。所述突变已集中于用在生理化学性质上与天冬酰胺相似的氨基酸诸如谷氨酰胺 (N297Q) 或用模拟天冬酰胺但而无极性基团的丙氨酸 (N297A) 取代 N297。

[0119] 如本文中所示,“无糖基化抗体”或“无糖基化 fc”是指 Fc 的位置 297 上的残基的糖基化状态。抗体或其它分子可在一个或多个其它位置含有糖基化但可以仍然被认为是无

糖基化抗体或无糖基化 Fc- 融合蛋白。

[0120] 为了努力产生无效应子功能的 IgG1 Fc, 已发现人 IgG1 的氨基酸 N297 至基氨酸的突变即 N297G 提供了比在该残基上的其它氨基酸取代优良得多的纯化效率和生物物理性质。参见实施例 8。因此, 在优选实施方案中, IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白包含具有 N297G 取代的人 IgG1 Fc。包含 N297G 取代的 Fc 用于其中分子包含人 IgG1 Fc 的任何背景中, 并且不限于 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合物的背景中的用途。在某些实施方案中, 抗体包含具有 N297G 取代的 Fc。

[0121] 包含具有 N297G 突变的人 IgG1 Fc 的 Fc 还可包含其它插入、缺失和取代。在某些实施方案中, 人 IgG1 Fc 包含 N297G 取代并且与 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列具有至少 90% 同一性、至少 91% 同一性、至少 92% 同一性、至少 93% 同一性、至少 94% 同一性、至少 95% 同一性、至少 96% 同一性、至少 97% 同一性、至少 98% 同一性或至少 99% 同一性。在特别优选实施方案中, C 末端赖氨酸残基被取代或缺失。包含 N297G 取代和 C 末端赖氨酸的缺失的人 IgG1 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:4 中。

[0122] 含无糖基化 IgG1Fc 的分子经显示不如含糖基化 IgG1Fc 分子稳定。Fc 区可被进一步工程化以增强无糖基化分子的稳定性。在一些实施方案中, 一个或多个氨基酸被取代成半胱氨酸以在二聚体状态中形成二硫键。SEQ ID NO:3 中所示的残基 V259、A287、R292、V302、L306、V323 或 I332 可被半胱氨酸取代。在优选实施方案中, 特定的残基对是取代, 以便它们优先地彼此形成二硫键, 从而限制或防止二硫键置乱。优选的对包括但不限于 A287C 和 L306C、V259C 和 L306C、R292C 和 V302C 以及 V323C 和 I332C。

[0123] 本文中提供了其中残基 V259、A287、R292、V302、L306、V323 或 I332 的一个或多个被半胱氨酸取代的含 Fc 分子。优选的含 Fc 分子包括包含 A287C 和 L306C、V259C 和 L306C、R292C 和 V302C、或 V323C 和 I332C 取代的那些分子。

[0124] 可对 IgG1Fc 产生的另外的突变包括促进含 Fc 多肽之间的异二聚体的形成的那些突变。在一些实施方案中, 将 Fc 区工程改造以产生促进两个不同的含 Fc 多肽链 (当在细胞中共表达时) 的异二聚体形成的“把手”和“孔”。U. S. 7, 695, 963。在其它实施方案中, 改变 Fc 区以使用静电转向来促进两个不同的含 Fc 多肽 (当在细胞中共表达时) 的异二聚体形成, 同时阻止同二聚体形成。WO 09/089, 004 (其通过引用整体并入)。优选的异二聚体 Fc 包括其中 Fc 的一条链包含 D399K 和 E356K 取代并且 Fc 的另一条链包含 K409D 和 K392D 取代的那些异二聚体 Fc。在其它实施方案中, Fc 的一条链包含 D399K、E356K 和 E357K 取代并且 Fc 的另一条链包含 K409D、K392D 和 K370D 取代。

[0125] 在某些实施方案中, 可以有利的是 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白是单体的, 即仅包含单个 IL-2 突变蛋白分子。在此类实施方案中, 融合蛋白的 Fc 区可含有一个或多个促进异二聚体形成的突变。将融合蛋白与具有与 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合多肽中的那些互易的突变但不存在 IL-2 突变蛋白的 Fc 共表达。当两个含 Fc 多肽的异二聚体形成时, 所得的蛋白质仅包含单个 IL-2 突变蛋白。

[0126] 产生单体 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的另一个方法是将 IL-2 突变蛋白融合于单体 Fc, 即不二聚化的 Fc 区。稳定的单体 Fc 包含阻止二聚化并且稳定以单体形式存在的分子的突变。优选的单体 Fc 公开于 WO 2011/063348 (其通过引用整体并入本文) 中。在某些实施方案中, IL-2 突变蛋白 Fc 融合蛋白包含含有位置 392 和 409 上的带负电荷的氨基

酸和 Y349、L351、L368、V397、L398、F405 或 Y407 上的苏氨酸取代的 Fc。

[0127] 在某些实施方案中, IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白 Fc 与 IL-2 突变蛋白之间包含接头。许多不同的接头多肽在本领域中是已知的并且可用于 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的背景中。在优选实施方案中, IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白在 Fc 与 IL-2 突变蛋白之间包含一个或多个拷贝的由 GGGGS(SEQ ID NO:5)、GGNGT(SEQ ID NO:6) 或 YGNGT(SEQ ID NO:7) 组成的肽。在一些实施方案中, Fc 区与 IL-2 突变蛋白区之间的多肽区包含单个拷贝的 GGGGS(SEQ ID NO:5)、GGNGT(SEQ ID NO:6) 或 YGNGT(SEQ ID NO:7)。如本文中所示, 当在适当的细胞中表达时接头 GGNGT(SEQ ID NO:6) 或 YGNGT(SEQ ID NO:7) 被糖基化, 并且此类糖基化可在溶液中和 / 或当在体内施用时帮助稳定蛋白质。因此, 在某些实施方案中, IL-2 突变蛋白融合蛋白在 Fc 区与 IL-2 突变蛋白区之间包含糖基化接头。

[0128] 可以预期的是, 当被放置多肽的背景中时, 糖基化接头可以是有用的。本文中提供了包含插入多肽的氨基酸序列中的或替代多肽的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸的 GGNGT(SEQ ID NO:6) 或 YGNGT(SEQ ID NO:7) 的多肽。在优选实施方案中, 将 GGNGT(SEQ ID NO:6) 或 YGNGT(SEQ ID NO:7) 插入多肽三级结构的循环。在其它实施方案中, 环的一个或多个氨基酸被 GGNGT(SEQ ID NO:6) 或 YGNGT(SEQ ID NO:7) 替代。

[0129] Fc 的 C 末端部分和 / 或 IL-2 突变蛋白的氨基末端部分可含有当在哺乳动物细胞中表达时改变 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的糖基化特征谱的一个或多个突变。在某些实施方案中, IL-2 突变蛋白还包含 T3 取代, 例如 T3N 或 T3A。IL-2 突变蛋白还可包含 S5 取代诸如 S5T

[0130] IL-2 的突变蛋白和 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的共价修饰被包括在本发明的范围之内, 并且通常 (但非总是) 在翻译后进行。例如, 将 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的几种类型的共价修饰通过将 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的特定氨基酸残基与有机衍生剂反应来引入所述分子, 所述衍生剂能够与选定的侧链或 N- 或 C- 末端残基反应。

[0131] 半胱氨酰残基最常见地与 α - 卤代乙酸 (和相应的胺), 诸如氯乙酸或氯乙酰胺反应, 以获得羧甲基或羧酰胺甲基衍生物。半胱氨酰残基还通过与溴代三氟丙酮、 α - 溴- β -(5-咪唑基(imidazolyl)) 丙酸、氯乙酰基磷酸、N- 烷基马来酰亚胺、3- 硝基-2- 吡啶基二硫化物、甲基 2- 吡啶基二硫化物、对- 氯汞苯甲酸酯、2- 氯汞基-4- 硝基酚或氯-7- 硝基苯并-2- 氧杂-1, 3- 二唑。

[0132] 通过在 pH 5.5-7.0 与焦碳酸二乙酯反应来衍生组氨酰残基, 因为该试剂对于组氨酰侧链是相对特异的。对- 溴苯甲酰甲基溴也是有用的; 优选在 pH 6.0 的 0.1M 二甲酸钠中进行该反应。

[0133] 赖氨酰和氨基末端残基与琥珀酸酐或其它羧酸酐反应。利用这些试剂的衍生化具有反转赖氨酰残基的电荷的作用。用于衍生含 α - 氨基的残基的其它合适的试剂包括酰亚胺酯诸如甲基吡啶酰亚胺酸甲酯、磷酸吡哆醛、吡哆醛、氯代硼氢化物、三硝基苯磺酸、O- 甲基异脲、2, 4- 戊二酮和转氨酶催化的与乙醛酸酯的反应。

[0134] 精氨酰残基通过与一种或几种常规试剂 (其中有苯乙二醛、2, 3- 丁二酮、1, 2- 环己二酮和茚三酮) 反应来进行修饰。精氨酸残基的衍生化因胍官能团的高 pK_a 而要求在碱性条件下进行反应。此外, 这些试剂还可与赖氨酸的基团以及精氨酸 ϵ - 氨基反应。

[0135] 可进行酪氨酸残基的特异性修饰,特别有兴趣地通过与芳香族重氮盐化合物或四硝基甲烷反应将光谱标记引入酪氨酸残基。最常见的是,N-乙酰咪唑和四硝基甲烷分别被用于形成 O-乙酰基酪氨酸种类和 3-硝基衍生物。酪氨酸残基使用 ^{125}I 或 ^{131}I 来碘化以制备用于放射免疫测定(在上文中被描述为合适的氯胺 T 法)的标记的蛋白质。

[0136] 羧基侧基(天冬氨酸基或谷氨酸基)通过与碳二亚胺($\text{R}'-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$)反应而被选择性修饰,其中 R 和 R' 是任选地不同的烷基,诸如 1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳二亚胺或 1-乙基-3-(4-氮鎓-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺。此外,将天冬氨酸和谷氨酸残基通过与铵离子反应转化为天冬酰胺和谷氨酰胺残基。

[0137] 利用双功能试剂的衍生化用于将抗原结合蛋白与不溶于水的支持基质或表面交联以用于多种方法。通常使用的交联剂包括例如 1,1-双(重氮乙酰基)-2-苯乙烷、戊二醛,N-羟基琥珀酰亚胺酯,例如,与 4-叠氮水杨酸的酯、同双功能酰亚胺酯(包括二琥珀酰亚胺酯诸如 3,3'-二硫代双(琥珀酰亚氨基丙酸酯))和双功能马来酰亚胺诸如双-N-马来酰亚胺-1,8-辛烷。衍生剂诸如甲基-3-[(对-叠氮苯基)二硫代]丙酰亚胺酸酯产生可光活化中间体,其能够在光的存在下形成交联。或者,反应性水不溶性基质诸如溴化氰活化的碳水化合物和美国专利 No. 3,969,287、3,691,016、4,195,128、4,247,642、4,229,537 和 4,330,440 中描述的反应性底物被用于蛋白质固定。

[0138] 谷氨酰胺和天冬酰胺残基分别被频繁地脱酰胺成对应的谷氨酸和天冬氨酸(aspartyl)残基。或者,在温和酸性条件下将这些残基脱酰胺。这些残基的任一形式落在本发明的范围内。

[0139] 其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟化、丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, 第 79-86 页)、N 末端胺的乙酰化和任何 C 末端羧基的酰胺化。

[0140] 包括在本发明的范围内的 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc-融合蛋白的共价修饰的另一种类型包括改变蛋白质的糖基化模式。如在本领域中是已知的,糖基化模式可取决于蛋白质的序列(例如,下文中论述的特定糖基化氨基酸残基的存在或不存在)或其中产生所述蛋白质的宿主细胞或生物体。在下文中描述了特定的表达系统。

[0141] 多肽的糖基化通常是 N 连接的或 O 连接的。N 连接的是指糖类部分至精氨酸残基的侧链的联接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中 X 为除脯氨酸外的任意氨基酸)是用于糖类部分至天冬酰胺侧链的酶促联接的识别序列。因此,多肽中的这些三肽序列的任一个的存在产生潜在的糖基化位点。O 连接的糖基化是指糖 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一至羟氨酸,最常见地丝氨酸或苏氨酸(尽管也可使用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸)的联接。

[0142] 糖基化位点至 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc-融合蛋白的添加可通过改变氨基酸序列以便其含有一个或多个上述三肽序列(用于 N-连接的糖基化位点)来实现。所述改变还可通过一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基至起始序列的添加或被所述残基取代(用于 O 连接的糖基化位点)来产生。为方便起见,优选地通过 DNA 水平上的改变(特别地通过在预选的碱基上突变编码靶多肽的 DNA 以便产生将翻译成期望的氨基酸的密码子)来改变 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc-融合蛋白氨基酸序列。

[0143] 增加 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白上的糖部分的数目的另一种方法是通过糖苷至蛋白质的化学或酶促偶联。这些方法是有利的,因为它们不需要在具有针对 N- 和 O- 连接的糖基化的糖基化能力的宿主细胞中产生蛋白质。取决于所使用的偶联模式,可将糖联接于 (a) 精氨酸和组氨酸、(b) 游离羧基、(c) 游离巯基诸如半胱氨酸的巯基、(d) 游离羟基诸如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的游离羟基、(e) 芳香族残基诸如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的那些芳香基或 (f) 谷氨酰胺的酰胺基。这些方法在 1987 年 9 月 11 日公布的 WO 87/05330 以及 Aplin 和 Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., 第 259-306 页进行了描述。

[0144] 存在于起始 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白上的糖部分的去除可通过化学或酶促方法来实现。化学去糖基化需要将蛋白质暴露于化合物三氟甲磺酸或等同的化合物。该处理导致除连接糖 (N- 乙酰葡萄糖胺或 N- 乙酰半乳糖胺) 外大多数或所有糖的切割,同时保持多肽完整。化学去糖基化由 Hakimuddin 等人, 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 和由 Edge 等人, 1981, Anal. Biochem. 118:131 描述。多肽上的糖部分的酶促切割可通过使用如由 Thotakura 等人, 1987, Meth. Enzymol. 138:350 描述的多种内切和外切糖苷酶来实现。潜在的糖基化位点上的糖基化可通过使用如由 Duskin 等人, 1982, J. Biol. Chem. 257:3105 描述的化合物衣霉素来阻止。衣霉素阻断蛋白质 -N 糖苷键的形成。

[0145] IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的共价修饰的另一个类型包括以美国专利 No. 4, 640, 835、4, 496, 689、4, 301, 144、4, 670, 417、4, 791, 192 或 4, 179, 337 中所示的方式将 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白连接于各种非蛋白质性质的多聚体,包括,但不限于各种多元醇诸如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯。此外,可在 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白内的不同位置上产生氨基酸取代以有利于多聚体诸如 PEG 的添加。因此,本发明的实施方案包括 PEG 化的 IL-2 突变蛋白和 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白。此类 PEG 化蛋白相对于非 PEG 化蛋白可具有增加的半衰期和 / 或减弱的免疫原性。

[0146] 编码 IL-2 突变蛋白和 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的多核苷酸

[0147] 包含在本发明内的是编码 IL-2 突变蛋白和 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的核酸。本发明的方面包括编码本文中描述的氨基酸序列的多核苷酸变体 (例如,因简并性而导致的)。在优选实施方案中,由分离的核酸编码的多肽是 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的组分。

[0148] 待用作用于分离核酸的探针或引物或用作用于数据库搜索的查询序列的对应于本文中描述的氨基酸序列的核苷酸序列可通过从氨基酸序列“回译”来获得。可将公知的聚合酶链式反应 (PCR) 法用于分离和扩增编码 IL-2 突变蛋白和 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的 DNA 序列。界定 DNA 片段的组合的期望的末端的寡核苷酸用作 5' 和 3' 引物。所述寡核苷酸可额外地含有限制性内切核酸酶的识别位点,以促进扩增的 DNA 片段的组合插入表达载体。PCR 技术在 Saiki 等人, Science 239:487 (1988); Recombinant DNA Methodology, Wu 等人, 编辑, Academic Press, Inc., San Diego (1989), 第 189-196 页; 和 PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis 等人, 编辑, Academic Press, Inc. (1990) 中进行了描述。

[0149] 本发明的核酸分子包括以单链和双链形式存在的 DNA 和 RNA, 以及对应的互补序列。“分离的核酸”是在从天然存在的来源分离的核酸的情况下,已从存在于从其分离所述核酸的生物体的基因组中的相邻基因序列分离的核酸。在例如从模板酶促合成或化学合

成的核酸诸如 PCR 产物、cDNA 分子或寡核苷酸的情况下,应理解,由此类方法产生的核酸是分离的核酸。分离的核酸分子是指以单独的片段的形式存在或作为更大核酸构建体的组分的核酸分子。在一个优选实施方案中,核酸大体上不含污染性内源材料。核酸分子优选地来源于以大体上纯的形式并且以使得能够通过标准生物化学法(诸如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) 中概述的那些方法)鉴定、操作和回收其组分核苷酸序列的量或浓度存在的分离至少一次的 DNA 或 RNA。优选以未被通常存在于真核生物基因中的内部非翻译序列或内含子间断的开放阅读框架的形式提供和/或构建此类序列。非翻译 DNA 的序列可出现在开放阅读框架的 5' 或 3', 其中所述非翻译 DNA 不干扰编码区的操作或表达。

[0150] 根据本发明的变体通常通过使用盒式诱变或 PCR 诱变或本领域中公知的其它技术定点诱变编码 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的 DNA 中的核苷酸以产生编码变体的 DNA, 并随后在如本文中概述的细胞培养中表达重组 DNA 来进行制备。然而, IL-2 突变蛋白和 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合物可通过使用已建立的技术体外合成来制备。变体通常展现与天然存在的类似物相同的定性生物活性, 例如 Treg 扩增, 尽管还可选择具有如将在下文中更全面概述的变化的特征的变体。

[0151] 如将由本领域普通技术人员所理解的, 由于遗传密码的简并性, 可产生极大数量的核酸, 其全部编码本发明的 IL-2 突变蛋白和 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白。因此, 在已鉴定特定的氨基酸序列后, 本领域普通技术人员可通过以不改变编码的蛋白质的氨基酸序列的方式简单地改变一个或多个密码子的序列来产生许多不同的核酸。

[0152] 本发明还提供以包含至少一个上述多核苷酸的质粒、表达载体、转录或表达盒的形式存在的表达系统和构建体。此外, 本发明提供包含此类表达系统或构建体的宿主细胞。

[0153] 通常地, 用于任何宿主细胞的表达载体将包含用于质粒维持和用于外源核苷酸序列的克隆和表达的序列。此类序列(在某些实施方案中统称为“侧翼序列”)将通常包括一个或多个下列核苷酸序列: 启动子、一个或多个增强子序列、复制起始点、转录终止序列、含有供体和受体剪接位点的完全内含子序列、编码用于多肽分泌的前导序列的序列、核糖体结合位点、多腺苷酸化序列、用于插入编码待表达的多肽的核酸的多接头区和可选择标记元件。这些序列的每一种在下文中进行论述。

[0154] 任选地, 载体可含有“标签”-编码序列, 即位于 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白编码序列的 5' 或 3' 末端的寡核苷酸分子; 所述寡核苷酸序列编码多聚组氨酸(诸如 hexaHis (SEQ ID NO:21)) 或另一种“标签”诸如 FLAG、HA(血凝素流感病毒) 或 myc, 存在商购可得的针对所述标签的抗体。该标签在多肽表达后通常融合于多肽, 并且可用作用于亲和纯化或检测来自宿主细胞的 IL-2 突变蛋白的工具。可以例如使用针对标签的抗体作为亲和基质, 通过柱层析实现亲和纯化。任选地, 随后可通过各种方法诸如使用某些肽酶进行切割来从纯化的 IL-2 突变蛋白和 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白除去标签。

[0155] 侧翼序列可以是同源的(即, 来自与宿主细胞相同的物种或株系)、异源的(即, 来自除宿主细胞的物种或株系之外的物种)、杂交体(即, 来自不止一个来源的侧翼序列的组合)、合成的或天然的。因此, 侧翼序列的来源可以是任何原核或真核生物、任何脊椎或无脊椎生物体或任何植物, 只要侧翼序列在宿主细胞机器中具有功能, 并且可被宿主细胞机器活化。

[0156] 用于本发明的载体的侧翼序列可通过本领域中公知的几种方法的任何方法来获得。通常地,本文中使用的侧翼序列先前已通过绘制图谱和/或通过限制性内切核酸酶消化来鉴定,并且从而可使用适当的限制性内切核酸酶从适当的组织来源分离。在一些情况下,侧翼序列的完全核苷酸序列可以是已知的。此处,侧翼序列可使用本文中描述的用于核酸合成或克隆的方法来合成。

[0157] 不管所有侧翼序列还是仅有一部分侧翼序列均是已知的,这可使用聚合酶链式反应(PCR)和/或通过用适当的探针诸如来自相同或另一种物种的寡核苷酸和/或侧翼序列片段筛选基因组文库来获得。当侧翼序列未知时,可从可含有例如编码序列或甚至另一个基因的DNA的更大片段分离含有侧翼序列的DNA的片段。分离可通过限制性内切核酸酶消化(以产生适当的DNA片段),随后使用琼脂糖凝胶纯化、Qiagen®柱层析(Chatsworth, CA)或对于本领域普通技术人员来说是已知的其它方法进行分离来实现。实现该目的的适当的酶的选择对于本领域普通技术人员而言是显而易见的。

[0158] 复制起始点通常是那些商购的原核表达载体的部分,并且所述起始点帮助载体在宿主细胞中扩增。如果选择的载体不含有复制起始位点,则可基于已知的序列化学合成复制起始点并将其连接进载体。例如,来自质粒pBR322(NewEngland Biolabs, Beverly, MA)的复制起始点适合于大多数革兰阴性细菌,并且各种病毒来源(例如,SV40病毒、多瘤病毒、原病毒、水疱性口炎病毒(VSV)或乳头状瘤病毒诸如HPV或BPV)对于在哺乳动物细胞中克隆载体是有用的。一般地,复制起始点组件不是哺乳动物表达载体所需的(例如,通常只使用SV40起始点,因为其还含有病毒早期启动子)。

[0159] 转录终止序列通常位于多肽编码序列的末端的3'并且用于终止转录。通常地,原核细胞中的转录终止序列是后跟多聚T序列的富含G-C的片段。虽然所述序列可容易地从文库克隆或甚至作为载体的部分商购获得,但其也可使用核酸合成诸如本文中描述的那些核酸合成来容易地合成。

[0160] 可选择标记基因编码在选择培养基中生长的宿主细胞的存活和生长所必需的蛋白质。常见选择标记基因编码这样的蛋白质,所述蛋白质(a)赋予对抗生素或其它毒素例如氨苄青霉素、四环素或卡那霉素(对于原核宿主细胞而言)的抗性;(b)补充细胞的营养缺陷型不足;或(c)提供不可从复合或限定培养基获得的重要营养物。具体的可选择标记是卡那霉素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因和四环素抗性基因。有利地,新霉素抗性基因还可用于原核和真核宿主细胞的选择。

[0161] 其它可选择基因可用于扩增将被表达的基因。扩增是其中产生对于生长或细胞存活是至关重要的蛋白所需要的基因在重组细胞的连续代的染色体以串联方式重复的过程。用于哺乳动物细胞的适当的选择标记的实例包括二氢叶酸还原酶(DHFR)和无启动子胸苷激酶基因。将哺乳动物细胞转化体置于其中只有转化体才能凭借存在于载体中的可选择基因唯一地适应存活的选择压力下。通过在其中连续增加培养基中的选择剂的浓度,从而导致可选择基因和编码另一种基因诸如IL-2突变蛋白或IL-2突变蛋白Fc-融合蛋白的DNA扩增的条件下培养转化的细胞来施加选择压力。作为结果,从扩增的DNA合成增加量的多肽诸如IL-2突变蛋白或IL-2突变蛋白Fc-融合蛋白。

[0162] 核糖体结合位点通常是mRNA的翻译起始所必需的并且特征在于Shine-Dalgarno序列(原核生物)或Kozak序列(真核生物)。所述元件通常位于启动子的3'和待表达的

多肽的编码序列的 5'。在某些实施方案中,一个或多个编码区可有效地连接于内部核糖体结合位点(IRES),从而允许从单个 RNA 转录物翻译两个开放阅读框架。

[0163] 在一些情况下,诸如当在真核宿主细胞表达系统中期望糖基化时,可操作各种前序列或前导序列(prosequence)来提高糖基化或产量。例如,可改变特定信号肽的肽酶切割位点或添加也可影响糖基化的前导序列。终蛋白质产物可在-1位置(相地于成熟蛋白的第一氨基酸)上具有一个或多个伴随表达的额外氨基酸,所述额外氨基酸可能未被完全除去。例如,终蛋白质产物可具有一个或两个联接于氨基末端在肽酶切割位点中发现的氨基酸残基。或者,一些酶切割位点的使用可导致期望的多肽的少许截短的形式,如果酶在成熟多肽内的这样的区域内切割的话。

[0164] 本发明的表达和克隆性载体通常将含有被宿主生物识别并且有效地连接于编码 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的分子的启动子。启动子是位于结构基因的起始密码子上游(即,5')的控制结构基因的转录的非转录序列(通常在约 100 至 1000bp 内)。启动子被常规地分入两类中的一类:诱导型启动子和组成型启动子。诱导型启动子响应培养条件的一些变化(诸如营养物的存在或不存在或温度的变化)在它们的控制下来起始从 DNA 的转录水平的升高。在另一方面,组成型启动子一致地转录它们所有地连接的基因,即,对基因表达几无或无控制。被多种潜在宿主细胞识别的许多启动子是公知的。

[0165] 与酵母宿主一起使用的适合的启动子在本领域中也是公知的。有利地将酵母增强子与酵母启动子一起使用。与哺乳动物宿主细胞一起使用的合适的启动子是公知的,包括但不限于从病毒诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(诸如腺病毒 2)、牛乳头状瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒以及最优选地猴病毒 40(SV40)的基因组获得的那些启动子。其它合适的哺乳动物启动子包括异源哺乳动物启动子,例如,热激启动子和肌动蛋白启动子。

[0166] 可引起人们的兴趣的另外的启动子包括,但不限于:SV40 早期启动子(Benoist 和 Chambon, 1981, Nature 290:304-310);CMV 启动子(Thorsen 等人,1984, Proc. Natl. Acad. U. S. A. 81:659-663);劳斯肉瘤病毒的 3' 长末端重复中所含的启动子(Yamamoto 等人,1980, Cell 22:787-797);疱疹胸苷激酶启动子(Wagner 等人,1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:1444-1445);来自金属硫蛋白基因的启动子和调控序列 Prinster 等人,1982, Nature 296:39-42);和原核生物启动子诸如 β -内酰胺酶启动子(Villa-Kamaroff 等人,1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75:3727-3731);或 tac 启动子(DeBoer 等人,1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:21-25)。还令人感兴趣的是展现组织特异性并且已用于转基因动物的下列动物转录控制区:在胰腺腺泡细胞中具有活性的弹性蛋白酶 I 基因的控制区(Swift 等人,1984, Cell 38:639-646;Ornitz 等人,1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409;MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515);在胰腺 β 细胞中具有活性的胰岛素基因的控制区(Hanahan, 1985, Nature 315:115-122);在淋巴样细胞中具有活性的免疫球蛋白基因的控制区(Grosschedl 等人,1984, Cell 38:647-658;Adames 等人,1985, Nature 318:533-538;Alexander 等人,1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444);在睾丸、乳腺、淋巴样和肥大细胞中具有活性的小鼠乳腺癌病毒的控制区(Leder 等人,1986, Cell 45:485-495);在肝中具有活性的白蛋白基因的控制区(Pinkert 等人,1987, Genes and Devel. 1:268-276);在肝中具有活性的甲胎蛋白基因的

控制区 (Krumlauf 等人, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648 ;Hammer 等人, 1987, *Science* 253:53-58) ;在肝中具有活性的 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶基因的控制区 (Kelsey 等人, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171) ;在髓系细胞中具有活性的 β 珠蛋白基因的控制区 (Mogram 等人, 1985, *Nature* 315:338-340 ;Kollias 等人, 1986, *Cell* 46:89-94) ;在脑中的少突胶质细胞中具有活性的髓磷脂碱蛋白基因的控制区 (Readhead 等人, 1987, *Cell* 48:703-712) ;在骨骼肌中具有活性的肌球蛋白轻链 -2 基因的控制区 (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286) ;和在下丘脑中具有活性的促性腺激素释放激素基因的控制区 (Mason 等人, 1986, *Science* 234:1372-1378)。

[0167] 可将增强子序列插入载体以增加高等真核生物的转录。增强子是 DNA 的顺式作用元件, 长度通常为约 10-300bp, 其作用于启动子以增加转录。增强子的定向和位置是相对独立的, 其已在转录单位的 5' 和 3' 的位置上被发现。可从哺乳动物基因获得的几个增强子序列是已知的 (例如, 珠蛋白、弹性蛋白、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)。然而, 通常地, 使用来自病毒的增强子。本领域中已知的 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒增强子和腺病毒增强子是用于活化真核启动子的示例性增强元件。虽然增强子在载体中可位于编码序列的 5' 或 3', 但其通常位于启动子 5' 的位点。编码适当的天然或异源信号序列 (前导序列或信号肽) 的序列可被整合进表达载体, 以促进 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的细胞外分泌。信号肽或前导序列的选择取决于将在其中产生所述蛋白质的宿主细胞的类型, 并且异源信号序列可替代天然信号序列。在哺乳动物宿主细胞中具有功能的信号肽的实例包括下列信号肽: 美国专利 No. 4, 965, 195 中描述的内白细胞介素 -7 (IL-7) 的信号肽; Cosman 等人, 1984, *Nature* 312:768 中描述的内白细胞介素 -2 受体的信号肽; EP 专利 No. 0367566 中描述的内白细胞介素 -4 受体的信号肽; 美国专利 No. 4, 968, 607 中描述的 I 型内白细胞介素 -1 受体的信号肽; EP 专利 No. 0460846 中描述的 II 型内白细胞介素 -1 受体的信号肽。

[0168] 载体可含有当被整合进入宿主细胞基因组时促进表达的一个或多个元件。实例包括 EASE 元件 (Aldrich 等人 2003 *Biotechnol Prog.* 19:1433-38) 和基质结合区 (MAR)。MAR 介导染色质的结构组织并且可使整合的载体与“位置”效应隔离。因此, 当载体被用于产生稳定的转染子时 MAR 是特别有用的。许多天然的和合成的含 MAR 核酸在本领域中, 例如在美国专利 No. 6, 239, 328, 7, 326, 567, 6, 177, 612, 6, 388, 066, 6, 245, 974, 7, 259, 010, 6, 037, 525, 7, 422, 874, 7, 129, 062 中是已知的。

[0169] 可从起始载体例如商购可得的载体构建本发明的表达载体。此类载体可以含有或可以不含所有期望的侧翼序列。当本文中描述的侧翼序列的一个或多个序列并非已存在于载体中时, 可单独地获得它们并将其连接进载体中。用于获得每一个侧翼序列的方法对于本领域普通技术人员来说是公知的。

[0170] 在载体已被构建并且编码 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的核酸分子已被插入载体的适当位置后, 可将完全的载体插入适当的宿主细胞以进行扩增和 / 或多肽表达。表达载体至选定的宿主细胞中的转化可通过公知的方法来实现, 所述方法包括转染、感染、磷酸钙共沉淀、电穿孔、显微注射、脂转染、DEAE- 葡聚糖介导的转染或其它已知的技术。所选定的方法将部分是待使用的宿主细胞的类型的函数。这些方法和其它合适的方法对于本领域普通技术人员来说是公知的, 并示于例如 Sambrook 等人, 2001 (同上) 中。

[0171] 宿主细胞,在适当条件下培养时,合成 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白,随后可以从培养基(如果宿主细胞将其分泌入培养基中)或直接从生产其的宿主细胞(如果其不被分泌)收集所述蛋白。适当的宿主细胞的选择将取决于各种因素,诸如所需的表达水平、活性所需或所必需的多肽修饰(诸如糖基化或磷酸化)和折叠成生物活性分子的容易性。宿主细胞可以是真核或原核生物。

[0172] 可作为用于表达的宿主获得的哺乳动物细胞系在本领域中是公知的,并且包括,但不限于可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的永生化细胞,并且用于本领域中已知的表达系统的任何细胞系可用于产生本发明的重组多肽。一般地,用编码所需的 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合物的 DNA 的重组表达载体转化宿主细胞。可使用的宿主细胞中有原核细胞、酵母或高等真核细胞。原核生物包括革兰阴性或革兰阳性生物体,例如大肠杆菌或杆菌。高等真核细胞包括昆虫细胞和已建立的哺乳动物来源的细胞系。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包括猴肾细胞的 COS-7 系(ATCC CRL 1651)(Gluzman 等人,1981,Cell 23:175)、L 细胞、293 细胞、C127 细胞、3T3 细胞(ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,或它们的衍生物诸如 V Reggie CHO 及在无血清培养基中生长的相关细胞系(Rasmussen 等人,1998,Cytotechnology 28 :31)、HeLa 细胞、BHK(ATCC CRL 10)细胞系以及如由 McMahan 等人,1991,EMBO J. 10 :2821 所描述的从非洲绿猴肾细胞系 CV1(ATCC CCL 70)衍生的 CV1/EBNA 细胞系、人胚胎肾细胞诸如 293、293EBNA 或 MSR 293、人表皮 A431 细胞、人 Colo205 细胞、其它转化的灵长类动力细胞系、正常二倍体细胞、来源于灵长类动物组织的体外培养物的细胞株、原代外植体、HL-60、U937、HaK 或 Jurkat 细胞。任选地,哺乳动物细胞系诸如 HepG2/3B、KB、NIH 3T3 或 S49,例如,当期望在各种信号转导或报告基因测定中使用多肽时,可用于多肽的表达。

[0173] 或者,可能在低等真核生物诸如酵母或在原核生物诸如细菌中产生多肽。合适的酵母包括酿酒酵母、裂殖酵母(*Schizosaccharomyce pombe*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyce*) 株、念珠菌属(*Candida*) 或能够表达异源多肽的任何酵母菌株。合适的细菌菌株包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*),或能够表达异源多肽的任何细菌菌株。如果在酵母或细菌中产生多肽,则期望例如通过适当位点的磷酸化或糖基化来修饰其中产生的多肽,以获得功能性多肽。此类共价联接可使用已知的化学或酶促方法来实现。

[0174] 所述多肽还可通过将本发明的分离的核酸有效地连接于一个或多个昆虫表达载体中的合适的控制序列,并应用昆虫表达系统来产生。用于杆状病毒/昆虫细胞表达系统的材料和方法可以以试剂盒形式从例如 Invitrogen, San Diego, Calif., U. S. A. (**MaxBac®**试剂盒) 商购获得,并且此类方法在本领域中是公知的,如在 Summers 和 Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987) 以及 Luckow 和 Summers, Bio/Technology 6:47(1988) 中描述的。无细胞翻译系统还可被用于使用来源于本文中公开的核酸构建体的 RNA 产生多肽。与细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主一起使用的适当的克隆性和表达载体由 Pouwels 等人(*Cloning Vectors:A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985) 进行了描述。包含本发明的分离的核酸(优选地有效地连接于至少一个表达控制序列)的宿主细胞是“重组宿主细胞”。

[0175] 在某些方面,本发明包括编码人 IL-2 突变蛋白的分离的核酸,所述人 IL-2 突变蛋

白优先刺激 T 调节性细胞并且包含 V91K 取代和与 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的氨基酸序列。所述分离的核酸可编码本文中提供的示例性 IL-2 突变蛋白的任一个。

[0176] 还包括的是编码本文中描述的示例性 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的任一个的分离的核酸。在优选实施方案中,在单一开放阅读框架(任选地具有在 Fc 区与 IL-2 突变蛋白之间编码的接头)内编码抗体的 Fc 部分和人 IL-2 突变蛋白。

[0177] 在另一个方面,本文中提供包含有效地连接于启动子的上述 IL-2 突变蛋白编码核酸或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白编码核酸的表达载体。

[0178] 在另一个方面,本文中提供包含编码上述 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的分离的核酸的宿主细胞。宿主细胞可以是原核细胞,诸如大肠杆菌,或可以是真核细胞,诸如哺乳动物细胞。在某些实施方案中,宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

[0179] 在另一个方面,本文中提供了产生人 IL-2 突变蛋白的方法。所述方法包括在其中表达有效地连接于人 IL-2 突变蛋白的启动子的条件下培养宿主细胞。随后,从所述培养物收获人 IL-2 突变蛋白。可从培养基和 / 或宿主细胞裂解物收获 IL-2 突变蛋白。

[0180] 在另一个方面,本文中提供产生人 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的方法。所述方法包括在其中表达有效地连接于人 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的启动子的条件下培养宿主细胞。随后,从所述培养物收获人 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白。可从培养基和 / 或宿主细胞裂解物收获人 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白。

[0181] 药物组合物

[0182] 在一些实施方案中,本发明提供包含治疗有效量的 IL-2 突变蛋白与药用有效稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和 / 或佐剂的药物组合物。在某些实施方案中,IL-2 突变蛋白在 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白的背景内。本发明的药物组合物包括但不限于液体、冷冻和冻干组合物。

[0183] 优选地,配方材料在所使用的剂量和浓度上对于受者是无毒的。在具体实施方案中,提供包含药物有效量的含 IL-2 突变蛋白治疗分子例如 IL-2 突变蛋白 Fc 融合物的药物组合物。

[0184] 在某些实施方案中,药物组合物可含有用于修饰、维持或保持例如 pH、同渗溶摩、粘度、澄明度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放的速率、组合物的吸附或渗透的配方材料。在这此类实施方案中,合适的配方材料包括,但不限于氨基酸(诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸、脯氨酸或赖氨酸);抗微生物剂;抗氧化剂(诸如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(例如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其它有机酸);膨胀剂(诸如甘露醇或甘氨酸);螯合剂(诸如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(诸如如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精);填充剂;单糖;二糖;和其它糖类(诸如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、调味剂和稀释剂;乳化剂;亲水聚合物(诸如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;形成盐的抗衡离子(诸如钠);防腐剂(诸如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢);溶剂(诸如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(诸如甘露醇或山梨醇);悬浮剂;表面活性剂或湿润剂(如

普朗尼克、PEG、脱水山梨醇酯、聚山梨醇酯诸如聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯、曲拉通、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊)；稳定性增强剂(例如蔗糖或山梨醇)；张力增强剂(例如碱金属卤化物，优选氯化钠或氯化钾、甘露醇、山梨醇)；递送媒介物；稀释剂；赋形剂和/或药用佐剂。参见，REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第 18 版，(A. R. Genrmo, 编辑), 1990, Mack Publishing Company。

[0185] 在某些实施方案中，最佳药物组合物将由本领域普通技术人员根据例如期望的施用途径、递送形式和期望的剂量来确定。参见，例如，REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 同上。在某些实施方案中，此类组合物可影响本发明的抗原结合蛋白的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。在某些实施方案中，在药物组合物中的主要媒介物或载体在性质上可以是含水的或不含水的。例如，合适的媒介物或载体可以是注射用水、生理盐水溶液或人工脑脊液，可能补充有在用于胃肠外施用的组合物中常用的其它材料。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是另外的示例性媒介物。在具体的实施方案中，药物组合物包括约 pH 7.0-8.5 的 Tris 缓冲液，或 pH 约 4.0-5.5 的乙酸盐缓冲液，并且还可包含山梨醇或其合适的替代物。在本发明的某些实施方案中，可通过将具有所需纯度的选定的组合物与以冻干的饼状物或水溶液形式存在的任何配制剂(REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 同上)混合来制备 IL-2 突变蛋白组合物，以用于贮存。此外，在某些实施方案中，可使用适当的赋形剂诸如蔗糖将 IL-2 突变蛋白产物配制成冻干物。

[0186] 本发明的药物组合物可被选择用于肠胃外递送。或者，所述组合物可被选择用于吸入或用于通过消化道(诸如口服)递送。此类药理学上可接受的组合物的制备在本领域普通技术人员的能力范围内。制剂组分优选以对于施用部位是可接受的浓度存在。在某些实施方案中，缓冲液被用来将组合物维持在生理 pH 或稍低的 pH 值，通常在约 5 至约 8 的 pH 范围内。

[0187] 当考虑胃外施用，可以以无热原、胃肠外可接受的水溶液(在药理学上可接受的媒介物中包含所需的 IL-2 突变蛋白组合物)形式提供用于本发明治疗组合物。用于胃肠外注射的特别有合适的媒介物是其中将 IL-2 突变蛋白组合物配制为适当地保存的无菌等渗溶液的无菌蒸馏水。在某些实施方案中，配制可包括用试剂诸如可注射微球体、生物蚀解颗粒、聚合化合物(诸如聚乳酸或聚乙醇酸)、珠粒或脂质体配制所需的分子，所述试剂可提供可通过积存注射递送的产品的受控或持续释放。在某些实施方案中，还可使用透明质酸，其在循环中具有促进持续的持续时间的的作用。在某些实施方案中，可植入的药物递送装置可用于引入 IL-2 突变蛋白组合物。

[0188] 另外的药物组合物对于本领域普通技术人员来说是显而易见的，包括牵涉持续或受控递送制剂中的 IL-2 突变蛋白组合物的制剂。用于配制多种其它持续或受控递送装置诸如脂质体载体、生物可侵蚀的微粒或多孔珠和贮库注射剂的技术对于本领域普通技术人员来说是已知的。参见，例如，国际专利申请 No. PCT/US93/00829, 其通过引用并入并且描述了用于递送药物组合物的多孔聚合微粒的受控释放。持续释放制剂可包括以成形制品诸如薄膜或微胶囊形式存在的半透性聚合物基质。持续释放基质可包括聚酯、水凝胶、聚乳酸(如公开在美国专利 No. 3, 773, 919 和欧洲专利申请公开 No. EP 058481 中描述的，其每一个通过引用并入本文)、L-谷氨酸与 γ -乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman 等人, 1983, Biopolymers 2:547-556)、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer 等人, 1981, J.

Biomed. Mater. Res. 15:167-277 和 Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105)、乙烯醋酸乙烯酯 (Langer 等人, 1981, 同上) 或聚 -D(-)-3- 羟基丁酸 (欧洲专利申请公开 No. EP 133, 988)。持续释放组合物还可包括可通过本领域中已知的几种方法的任何方法来制备的脂质体。参见, 例如, Eppstein 等人, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82:3688-3692; 欧洲专利申请公开 No. EP 036, 676、EP 088, 046 和 EP 143, 949 (通过引用并入)。

[0189] 用于体内施用的药物组合物通常提供为无菌制剂。灭菌可以利用通过无菌过滤膜的过滤来实现。当冷冻干燥组合物时, 使用这种方法的灭菌可在冷冻干燥和重建之前或之后进行。用于肠胃外施用的组合物可以以冷冻干燥的形式存在或存在于溶液中。通常将胃肠外组合物置于具有无菌入口的容器, 例如具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶中。

[0190] 本发明的方面包括自缓冲的 IL-2 突变蛋白制剂, 其可以用作药物组合物, 如在国际专利申请 WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599) (其通过引用整体并入本文) 中描述的。

[0191] 如上所述, 某些实施例提供了 IL-2 突变蛋白组合物, 特别是药物 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白, 所述组合物除了 IL-2 突变蛋白成分外还包含一种或多种赋形剂诸如在本节中和本文中其它地方说明性描述的那些赋形剂。在这方面, 出于众多目的, 诸如调整制剂的物理、化学或生物性质 (诸如粘度的调整)、和 / 或本发明的提高效率 and / 或稳定此类制剂的方法以及抵抗因例如在制造、装运、贮存、使用前制备、施用和此后的过程中发生的应激而引起的降解和腐败的方法, 可在本发明中使用赋形剂。

[0192] 关于蛋白质稳定化和在这方面有用的配方材料和方法的各种阐述是可获得的, 诸如 Arakawa 等人, "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3):285-91 (1991); Kendrick 等人, "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," 于: RATIONALE DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter 和 Manning, 编辑 Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), 和 Randolph 等人, "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13:159-75 (2002) (其每一个在通过引用整体并入本文), 特别是在关于用于根据本发明的自缓冲蛋白制剂的赋形剂和所述赋形剂的处理, 特别是关于用于兽医学和 / 或人医学用途的蛋白质药品和方法的部分中。

[0193] 可按照本发明的某些实施方案将盐用于例如调整制剂的离子强度和 / 或等渗性和 / 或改善根据本发明的组合物的蛋白质或其它成分的溶解度和 / 或物理稳定性。

[0194] 正如众所周知的, 离子可通过结合于蛋白质表面上的带电荷的残基, 以及通过屏蔽蛋白质中的带电荷基团和极性基团, 和减少它们的静电相互作用、吸引力和排斥相互作用的强度来稳定蛋白质的天然状态。离子还可通过特别地结合于蛋白质的变性肽键 (—CONH) 来稳定蛋白质的变性状态。此外, 离子与蛋白质中的带电荷基团和极性基团的相互作用还可减弱分子间静电相互作用, 并且由此防止或减少蛋白质聚集和不溶性。

[0195] 离子种类在它们对蛋白质的作用上显著不同。已经开发了可用于配制根据本发明的药物组合物的离子及其对蛋白质的作用的多种分类评级。一个实例是 Hofmeister 系列, 其通过它们对蛋白质在溶液中的构象稳定性的作用来对离子和非离子溶质进行评级。稳定溶质被称为“亲液的”。去稳定的溶质被称为“离液的”。亲液剂通常被用来在高浓度 (例如, >1 摩尔硫酸铵) 从溶液沉淀蛋白质 (“盐析”)。离液剂通常用于使蛋白质变性和 / 或

增溶（“盐溶”）。离子“盐溶”和“盐析”的相对效力确定它们在 Hofmeister 系列中的位置。

[0196] 游离氨基酸可在根据本发明的各种实施方案的 IL-2 突变蛋白制剂中用作填充剂、稳定剂和抗氧化剂，以及其它标准用途。赖氨酸、脯氨酸、丝氨酸和丙氨酸可用于在制剂中稳定蛋白质。甘氨酸在冻干中用于确保正确的饼状物结构和性能。精氨酸可用于在液体和冻干制剂中抑制蛋白质聚集。甲硫氨酸用作抗氧化剂。

[0197] 多元醇包括糖，诸如甘露糖醇、蔗糖和山梨糖醇及多羟醇，诸如，例如，甘油和丙二醇，以及，为了本文中的讨论的目的，聚乙二醇（PEG）和相关物质。多元醇是亲液剂。它们在液体和冻干制剂中是有用的稳定剂，以保护蛋白质免受物理和化学降解过程。多元醇也可用于调节制剂的张力。

[0198] 在选择本发明的实施方案中是有用的多元醇有甘露醇，常用用于确保冻干制剂中的饼状物的结构稳定性。其确保饼状物结构稳定性。其通常与冻干保护剂例如蔗糖一起使用。山梨醇和蔗糖属于用于调整张力的优选试剂，并且作为在制造中主体的运输或制备过程中抵抗冻融应激的稳定剂。还原糖（其含有游离醛基或酮基），诸如葡萄糖和乳糖，可以糖化表面赖氨酸和精氨酸残基。因此，它们通常不属于根据本发明使用的优选多元醇。此外，形成此类反应性种类的糖，诸如蔗糖（其在酸性条件下被水解成果糖和葡萄糖，并因此引起糖化），在这方面也不属于本发明的优选的多元醇。PEG 对于稳定蛋白质是有用的并且作为冷冻保护剂，并且可在这方面用于本发明。

[0199] IL-2 突变蛋白制剂的实施方案还包含表面活性剂。蛋白质分子可易于吸附在表面上并且易于变性，并从而在气-液、固-液和液-液界面上聚集。这些效应通常与蛋白质浓度成反比。这些有害相互作用通常与蛋白质浓度成反比，并且通常被物理搅拌（诸如在产品的装运和操作过程中产生的）加剧。

[0200] 表面活性剂被常规地用于阻止表面吸附，使表面吸附最少化或减少表面吸附。本发明中的有用的表面活性剂在这方面包括聚山梨酯 20、聚山梨酯 80、聚氧乙烯脱水山梨糖醇的其它脂肪酸酯、和泊洛沙姆 188。

[0201] 表面活性剂也通常用于控制蛋白质构象稳定性。表面活性剂在这方面的用途是蛋白质特异性的，因为任何给定的表面活性剂通常将稳定一些蛋白质和使其它蛋白质去稳定。

[0202] 聚山梨醇酯对氧化降解易感，并且通常如所提供的，含有足够量的过氧化物来使蛋白质残基侧链、尤其是甲硫氨酸氧化。因此，应当小心地使用聚山梨醇酯，并且当使用时，应当以它们的最低有效浓度使用其。在这方面，聚山梨醇酯举例说明了应当以它们的最低有效浓度使用赋予剂的一般法则。

[0203] IL-2 突变蛋白制剂的实施方案还包含一种或多种抗氧化剂。通过维持适当水平的环境氧和温度以及通过避免暴露于光可在一定程度上防止的药物制剂中的蛋白质的有害氧化。抗氧化剂赋形剂也可用于防止蛋白质的氧化降解。在这方面有用的抗氧化剂有还原剂、氧/自由基清除剂和螯合剂。用于根据本发明的治疗性蛋白质制剂的抗氧化剂优选是水溶性的，并且在整个产品的贮存期中保持它们的活性。EDTA 在这方面是根据本发明的优选的抗氧化剂。

[0204] 抗氧化剂可破坏蛋白质。例如，还原剂，诸如特别地谷胱甘肽，可破坏分子内二硫

键。因此,用于本发明的抗氧化剂被选择来,除其它以外,消除或充分减少它们本身在制剂中损害蛋白质的可能性。

[0205] 根据本发明的制剂可包括为蛋白质辅因子并且是形成蛋白质配位络合物所必需的金属离子,诸如形成某些胰岛素悬浮液所必需的锌。金属离子还可抑制一些降解蛋白质的过程。然而,金属离子也催化降解蛋白质的物理和化学过程。

[0206] 镁离子(10-120mM)可用于抑制天冬氨酸至异天冬氨酸的异构化。 Ca^{+2} 离子(高达100mM)可增强人脱氧核糖核酸酶的稳定性。然而, Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 和 Zn^{+2} 可使 rhDNA 酶去稳定。类似地, Ca^{+2} 和 Sr^{+2} 可稳定因子 VIII,其可通过 Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 和 Zn^{+2} 、 Cu^{+2} 和 Fe^{+2} 来去稳定,并且其聚集可通过 Al^{+3} 离子来增加。

[0207] IL-2 突变制剂的实施方案还包含一种或多种防腐剂。当开发包括来自相同容器的一个以上提取的多剂量胃肠外制剂时,防腐剂是必需的。它们的主要功能是抑制微生物的生长,并在药品的整个贮存期或使用期中确保药品无菌。常用防腐剂包括苯甲醇、苯酚和间甲酚。虽然防腐剂具有与小分子胃肠外药物一起使用的悠久历史,但包含防腐剂的蛋白质制剂的开发可具有挑战性。防腐剂几乎总是具有对蛋白质的去稳定作用(聚集),并且这已成为限制它们用于多剂量蛋白质制剂的主要因素。迄今为止,大部分蛋白质药物已被配制仅用于单次使用。然而,当多剂量制剂是可能时,它们具有使患者方便的额外有利方面和提高的可销售性。一个很好的实例是人生长激素(hGH)的实例,其中防腐制剂的发展导致更方便的可重复使用的注射笔展示的商业化。至少4种含有hGH的防腐制剂的此类笔装置目前可在市场上获得。Norditropin(液体,Novo Nordisk)、Nutropin AQ(液体,Genentech)和 Genotropin(冻干的一双室药筒,Pharmacia&Upjohn)含有苯酚,而 Somatropin(Eli Lilly)用间-甲酚进行配制。

[0208] 在一个实施方案中,将 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白的 Fc- 融合物,诸如例如 Fc. IL-2(V91K) 或 Fc. IL-2(N88D) 在 10mM L- 谷氨酸,3.0% (w/v) L- 脯氨酸, pH 5.2 中配制成 10mg/mL。在另一个实施方案中,在 10mM KPi, 161mM L- 精氨酸, pH 7.6 中配制 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白的 Fc- 融合物,诸如例如 Fc. IL-2(V91K) 或 Fc. IL-2(N88D)。

[0209] 在防腐剂型的配制和开发过程中需要考虑几个方面。必须优化药品中的有效的防腐剂浓度。这需要以赋予抗微生物效力而不削弱蛋白质稳定性的浓度范围测试所述剂型中的给定的防腐剂。

[0210] 在另一个方面,本发明以冻干制剂的形式提供 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白的 Fc- 融合物。可在无防腐剂的情况下冷冻干燥经冻干的产物,并在使用时用含防腐剂的稀释剂进行重建。这缩短了防腐剂与所述蛋白质接触的时间,从而显著地使相关的稳定性风险降至最低。对于液体制剂,应当在整个产品贮存期(约 18 至 24 个月)中维持防腐剂的效力和稳定性。要指出的重要点是防腐剂的效力应当在含有活性药物和所有赋形剂组分的终制剂中得以显示。

[0211] 通常将针对(除其它以外)特定的施用途径和方法、特定的施用剂量和施用频率、特定疾病的特定治疗、针对生物利用度的范围和持久性设计 IL-2 突变蛋白制剂。因此可根据本发明设计制剂以用于通过任何合适的途径(包括但不限于口服、经耳、经眼、经直肠和经阴道,以及通过胃肠外途径(包括静脉内和动脉内注射、肌肉注射和皮下注射))进行递送。

[0212] 在所述药物组合物已被配制后,可将其作为溶液、混悬液、凝胶、乳剂、固体、晶体或作为脱水或冻干的粉末贮存在无菌小瓶中。可将此类制剂以即用形式或以在施用前被重建的形式(例如,冻干形式)贮存。本发明还提供用于产生单剂量施用单位的试剂盒。本发明的试剂盒可各自含有具有干燥的蛋白质的第一容器和具有含水制剂的第二容器。在本发明的某些实施方案中,提供了含有单室和多室预充式注射器(例如,液体注射器和冻干注射器(lyosyringe))的试剂盒。

[0213] 待使用的含 IL-2 突变蛋白的药物组合物的治疗有效量可取决于例如治疗情境和目标。本领域普通技术人员将理解,用于治疗的适当剂量水平将部分地取决于被递送的分子、将对其使用 IL-2 突变蛋白的适应症、施用途径和患者的大小(体重,体表面或器官的大小)和/或状况(年龄和一般健康状况)而变化。在某些实施方案中,临床医生可滴定剂量并修改施用途径以获得最佳疗效。典型的剂量范围可为约 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 1mg/kg 或更多,这取决于上述因素。在具体的实施方案中,剂量范围可以是 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,任选地 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0214] 治疗有效量的 IL-2 突变蛋白优选地导致疾病症状的严重度的减轻、无疾病症状期的频率或持续时间的增加,或因疾病折磨而导致的损伤或失能的预防。

[0215] 可使用医学装置施用药物组合物。用于施用药物组合物的医学装置的实例描述于美国专利 No. 4,475,196、4,439,196、4,447,224、4,447,233、4,486,194、4,487,603、4,596,556、4,790,824、4,941,880、5,064,413、5,312,335、5,312,335、5,383,851 和 5,399,163(全部通过引用并入本文)中。

[0216] 治疗自身免疫性或炎性病症的方法

[0217] 在某些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白用于治疗自身免疫性或炎性病症。在优选实施方案中,使用 IL-2 突变蛋白 Fc-融合蛋白。

[0218] 特别适合于用本文中公开的 IL-2 突变蛋白治疗的病症包括,但不限于炎症、自身免疫性疾病、特应性疾病、副肿瘤性自身免疫性疾病、软骨炎症、关节炎、类风湿关节炎、幼年型关节炎、幼年型类风湿关节炎、少关节幼年型类风湿性关节炎、多关节幼年型类风湿性关节炎、全身发作幼年型类风湿性关节炎、幼年强直性脊柱炎、幼年型肠病性关节炎、幼年型反应性关节炎、幼年型 Reiter 氏综合征、SEA 综合征(血清阴性、末端病、关节病综合征)、幼年型皮炎、幼年型银屑病关节炎、少年硬皮病、幼年型系统性红斑狼疮、幼年型脉管炎、少关节类风湿性关节炎、多关节炎类风湿性关节炎、全身发病类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、肠病性关节炎、反应性关节炎、幼年型 Reiter 氏综合征、SEA 综合征(血清阴性、肌腱端病、关节病综合征)、皮炎、牛皮癣关节炎、硬皮病、脉管炎、脊髓炎、多发性肌炎、皮肤肌炎、结节性多动脉炎、韦格纳肉芽肿病、动脉炎、风湿性多肌痛、肉状瘤病、硬化症、原发性胆汁性硬化、硬化性胆管炎、斯耶格伦氏综合征、银屑病、牛皮癣、斑块状银屑病、滴状银屑病、皮褶银屑病、脓疱型银屑病、红皮病型银屑病、皮炎、特应性皮炎、动脉粥样硬化、狼疮、Still 病、系统性红斑狼疮(SLE)、重症肌无力、炎性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、腹腔疾病、多发性硬化症(MS)、哮喘、COPD、鼻窦炎、鼻窦炎伴鼻息肉、嗜酸性粒细胞性食管炎、嗜酸性粒细胞性支气管炎、格林巴利病、I 型糖尿病、甲状腺炎(例如,Grave 病)、阿狄森氏病、雷诺氏现象、自身免疫性肝炎、GVHD、移植排斥、肾损害、丙型肝炎引起的脉管炎、妊娠的自发消失等。

[0219] 在优选实施方案中,自身免疫性或炎性病征是狼疮、移植物抗宿主病、丙型肝炎诱导的脉管炎、I 型糖尿病、多发性硬化、妊娠的自发消失、特应性疾病和炎性肠病。

[0220] 在另一个实施方案中,具有自身免疫性或炎性病征或处于发生所述病征的风险中的患者用 IL-2 突变蛋白(例如,本文中公开的 IL-2 突变蛋白,诸如本文中公开的 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合物,或本领域中已知的另一种 IL-2 突变蛋白或野生型 IL-2,任选地作为本文中描述的类型 Fc- 融合分子的部分)来治疗,并且监测所述患者对所述治疗的应答。被监测的患者的应答可以是患者对所述治疗的任何可检测的或可测量的应答,或此类应答的任意组合。例如,所述应答可以是患者的生理状态的变化,诸如体温或发热、性欲、发汗、头痛、恶心、疲劳、饥饿、口渴、精神敏锐度等的变化。或者,所述应答可以是例如采自患者的外周血的样品中的细胞类型或基因产物(例如,蛋白质、肽或核酸)的量的变化。在一个实施方案中,如果患者具有可检测的或可测量的对治疗的应答或如果此类应答越过特定阈值,则改变患者的治疗方案。所述改变可以是给药频率的减少或增加,或每剂量施用的 IL-2 突变蛋白的量的减少或增加,或来自给药的“假期”(即,治疗的暂时停止,持续指定的时期或直至治疗医生确定治疗应继续进行,或直至监视的患者应答表明治疗应当或可以继续),或治疗的终止。在一个实施方案中,所述应答是患者的温度或 CRP 水平的变化。例如,所述应答可以是患者的体温的升高,或外周血的样品中的 CRP 水平的升高或这两种变化。在一个具体的实施方案中,如果患者的体温升高 0.1°C、0.2°C、0.3°C、0.4°C、0.5°C、0.7°C、1°C、1.5°C、2°C 或 2.5°C,则减少、暂停或终止患者的治疗。在另一个具体的实施方案中,如果患者的外周血的样品中的 CRP 的浓度在治疗过程中增加至少 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.7、1、1.5 或 2mg/mL,则减少、暂停或终止患者的治疗。可被监测和用于决定是否修改、减少、暂停或终止治疗的其它患者反应包括毛细血管渗漏综合征(低血压和心血管不稳定)的发展或恶化、受损的嗜中性粒细胞功能(例如,导致或检测感染的发展或恶化)、血小板减少症、血栓性血管病、注射部位反应、脉管炎(诸如丙型肝炎病毒脉管炎)或炎性症状或疾病。可被监测和用于决定是否修改、减少、暂停或终止治疗的其它患者反应包括 NK 细胞、Treg 细胞、FOXP3⁺CD4⁺ T 细胞、FOXP3⁺CD4⁺ T 细胞、FOXP3⁻CD8⁺ T 细胞或嗜酸性粒细胞的数量增加。这些细胞类型的增加可被检测例如为每单位外周血的此类细胞的数目的增加(例如,表示为每毫升血液的细胞的增加)或为此种细胞类型相较于血液样品中的另一类型的细胞的百分比的增加。可被监测的另一患者反应是患者的外周血样品中的 CD25⁺细胞上的细胞表面结合的 IL-2 突变蛋白的量的增加。

[0221] 扩增 Treg 细胞的方法

[0222] IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白可用于扩增受试者或样品中的 Treg 细胞。本文中提供增加 Treg 细胞对非调节性 T 细胞的比率的方法。所述方法包括将一组人 T 细胞与有效量的人 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合物接触。所述比率可通过测定 T 细胞的群体内 CD3⁺FOXP3⁺ 细胞对 CD3⁺FOXP3⁻ 细胞的比率来测量。人血液中的常见 Treg 频率为 5-10% 的总 CD4⁺CD3⁺T 细胞,然而,在上文中所列的疾病中,该百分比可以更低或更高。在优选实施方案中,Treg 的百分比增加至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 100%、至少 200%、至少 300%、至少 400%、至少 500%、至少 600%、至少 700%、至少 800%、至少 900% 或至少 1000%。对于特定疾病,Treg 的最大倍数增加可变化;然而,可通过 IL-2 突变蛋白处理获得的最大 Treg

频率为 50% 或 60% 的总 CD4+CD3+T 细胞。在某些实施方案中, 向受试者施用 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白, 受试者的外周血中的调节性 T 细胞 (Treg) 对非调节性 T 细胞的比率增加。

[0223] 因为 IL-2 突变蛋白和 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白相较于其它细胞类型优先扩增 Treg, 因此它们还用于增加受试者的外周血中的调节性 T 细胞 (Treg) 对天然杀伤 (NK) 细胞的比率。所述比率可通过测定 CD3+FOXP3+ 细胞对为 CD19- 和 CD3- 的 CD16+ 和 / 或 CD56+ 淋巴细胞的比率来测量。

[0224] 设想 IL-2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白 Fc- 融合蛋白可具有对患者中的疾病或病症的疗效而无不显著扩大患者的外周血中的 Treg 对非调节性 T 细胞或 NK 细胞的比率。所述疗效可由 IL-2 突变蛋白或 IL-2Fc- 融合蛋白在炎症或自身免疫的部位上的局部活性产生。

实施例

[0225] 下列实施例 (实际和预示的) 被提供用于举例说明本发明的特定实施方案或特性, 并且无意限制其范围。

[0226] 实施例 1—减少赋予对于 CD25 的高亲和力的突变的数目

[0227] 具有增强的对于 CD25 的亲合力和减弱的通过 IL-2R β γ 的信号转导强度的 IL-2 突变蛋白优先促进 Treg 的生长和功能。为了减弱潜在的免疫原性, 寻求需要实现对于 CD25 的高亲合力所需的突变的最少数目。与其 3 个受体 (PDB 代码 -2B5I) 复合的 IL-2 的晶体结构显示 V69A 和 Q74P 位于与 CD25 相互作用的螺旋结构中。这可解释在两个独立的针对高 CD25 结合亲和力的 IL-2 诱变筛选中频繁地分离出 V69A 和 Q74P 的原因 (Rao 等人 2005; Thanos 等人 2006)。本实施例探查在 Rao 等人的筛选中鉴定的 IL-2 突变蛋白“2-4”中的哪一个另外的突变对于使亲合力增加高于对于单独的 V69A 和 Q74P 观察到的亲合力是最重要的。通过流式细胞术筛选下列蛋白质的对活化的 T 细胞表面上的 CD25 的结合。所有构建体还包括 C 末端 FLAG 和多 His 标签以用于纯化和检测。在括弧中提供具体的突变。

[0228] HaMut1D (V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO :8)

[0229] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEA
LNLAPSKN

[0230] FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

[0231] HaMut2D (N30S, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO :9)

[0232] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINSYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEA
LNLAPSKN

[0233] FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

[0234] HaMut3D (K35R, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO :10)

[0235] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPRLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEA
LNLAPSKN

[0236] FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

[0237] HaMut4D (T37A, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO :11)

[0238] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLARMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEA
LNLAPSKN

- [0239] FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
- [0240] HaMut5D (K48E, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO :12)
- [0241] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPEKATELKHLQCLEELKPLEEA
LNLAPSKN
- [0242] FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
- [0243] HaMut6D (E68D, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO :13)
- [0244] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQCLEELKPLEDA
LNLAPSKN
- [0245] FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
- [0246] HaMut7D (N71R, V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO :14)
- [0247] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEA
LRLAPSKN
- [0248] FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
- [0249] HaMut8D (K35R, K48E, E68D, N88D, C125A) (SEQ ID NO :15)
- [0250] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPRLTRMLTFKPYMPEKATELKHLQCLEELKPLEDV
LNLAQSKN
- [0251] FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

[0252] HaMut7D 以与最初分离物“2-4”几乎相同的亲和力 ($\sim 200\text{pM}$) 结合 CD25, 从而表明突变 N71R 能够极大地增强亲和力, 高于对于单独 V69A、Q74P 观察到的亲和力 (HaMut1D, $\sim 2\text{nM}$)。除其亲和力仅比 WT IL-2 的亲和力稍高的 HaMut8D 外, 其它构建体具有与 HaMut1D 相似或稍高的亲和力。

[0253] 实施例 2—融合于 IgG1-Fc 结合域以延长半衰期的 IL-2 突变蛋白

[0254] 为了减少利用 IL-2 突变蛋白实现 Treg 富集所需的给药频率, 评价各种 IL-2 与 IgG1-Fc 结构域之间的融合蛋白。Fc 结合域含有消除由 IgG1 介导的效应子功能诸如靶细胞裂解的突变。所利用的 Fc 效应子功能突变是 A327Q、AlaAla (L234A+L235A) 或 N297G。因为 Treg- 选择性 IL-2 突变蛋白在 IL-2 效力上具有部分减弱, 因此重要地以不显著影响 IL-2R 信号转导的方式将 IL-2 融合于 Fc。因此, 在 Fc 融合存在或不存在的条件下测试 IL-2 突变蛋白的 IL-2R 活化。

[0255] 为了确定通过 Fc 融合产生的 IL-2 二聚化是否可因增强的对 IL-2R 的亲合力而增加 IL-2R 信号转导强度, 将更弱的 IL-2 突变蛋白 (haD5) (US20110274650) 融合于 Fc 的氨基末端, 由 GGGGS (SEQ ID NO :5) 接头序列间隔。该突变蛋白具有 3 个影响 IL-2R 信号转导的突变 (E15Q、H16N、N88D)、8 个赋予对于 CD25 的高亲和力的突变 (N29S、Y31H、K35R、T37A、K48E、V69A、N71R、Q74P) (Rao 等人 2005) 和阻止半胱氨酸错配和聚集的 C125S。以该方式至 Fc 的融合完全消除了 haD5 的生物活性, 然而其对于细胞表面 CD25 的高亲和力结合得以增强, 可能归因于来自二聚化的增强的亲合力。

[0256] 还将 IL-2 突变蛋白融合于 Fc 异二聚体的 N 或 C 末端, 以便只有 Fc 二聚体的一条链钻入 IL-2 结构域。两个不对称 Fc 链之间的异源二聚体配对通过一条 Fc 链上的引入的赖氨酸与另一条 Fc 链上的引入的天冬酰胺之间的静电相互作用来促进。如果一个构型是优选的, 则将 IL-2 突变蛋白 haD6 融合于一条 Fc 链或另一条链的 N 末端, 从而导致称为

haD6.FcDD 和 haD6.FcKK 的两个蛋白质构建体。还将突变蛋白 haMut7D 通过一个或两个 GGGGS (SEQ ID NO :5) 接头 (FcKK (G4S)haMut7D、FcKK (G4S) 2haMut7D) 融合于 Fc 异二聚体的 C 末端。IL-2 突变蛋白 haD6 至 Fc 异二聚体的 N 末端的融合在 pSTAT5 和 T 细胞增殖实验中导致相对于游离 haD6 的活性的部分丢失。相反地, haMut7D 通过一个或两个 GGGGS (SEQ ID NO :5) 接头至 Fc 异二聚体的 C 末端的融合不改变 haMut7D 的效力。

[0257] 还调查了 IL-2 突变蛋白至 Fc 同二聚体的 C 末端的融合。利用 100ng/ml 抗-CD3 (OKT3) 以每 100ml 3 亿个细胞在 T75 组织培养瓶中活化总 PBMC。在培养的第 3 天, 洗涤细胞 3 次, 将其在新鲜培养基中静置 3 天。随后以 50 μ l 的终体积, 以在 1pM 至 10nM 的范围内的 10x 剂量滴定用 IL-2 刺激细胞。使用 BD phosflow 缓冲液试剂盒测量 STAT5 磷酸化的水平。简言之, 添加 1ml 的 BD 裂解液 / 固定 phosflow 缓冲液以终止刺激。将细胞在 37°C 固定 20 分钟, 并在对 CD4、CD25、FOXP3 和 pSTAT5 染色之前在冰上用 1x BD phosflow perm 缓冲液透化细胞。

[0258] 如可在图 1 中看到的, 至 Fc 同二聚体的 C 末端的融合不改变突变蛋白 haMut1D 和 haMut7D 的生物活性。因此, IL-2 的 N 末端与 Fc 的 C 末端之间的融合甚至在 Fc. IL-2 同二聚体的背景中削弱 IL-2 突变蛋白的激动剂活性。在这些构建体中, 将 C125A 突变用于替代 C125S 以改善制造。

[0259] 实施例 3—调整 IL-2 突变蛋白的效力以实现优先 Treg 生长

[0260] 初始小组的 IL-2 突变蛋白含有单独或具有 1 或 2 个影响 IL-2R 信号转导的突变的 N88D。设计第二小组的突变蛋白, 其全都具有单个点突变, 目的是鉴定具有与 N88D 系列的激动作用相似或比其稍微更强的激动作用的突变蛋白。基于预测的 IL-2R β - 相互作用氨基酸 (晶体结构, PDB 代码 - 2B5I) 鉴定一小组 24 个信号转导突变。基于预测的突变蛋白与 IL-2R β 之间的结合自由能的减小选择特定取代。使用 EGAD 计算机算法 (Handel's Laboratory, San Diego 的 University of California, USA) 计算结合自由能。突变体的自由能被定义为 $\Delta \Delta G_{mut} = \mu (\Delta G_{mut} - \Delta G_{wt})$ 。其中, μ (一般 = 0.1) 是用于标准化结合亲和力的预测的变化以当与实验能量相比较时具有为 1 的斜率的换算系数 (Pokala 和 Handel 2005)。解离的自由能 (ΔG) 被定义为复合 ($\Delta G_{结合}$) 与游离状态 ($\Delta G_{游离}$) 之间的能量差。计算每一个取代的解离自由能 ΔG_{mut} 。

[0261] 将一小组具有下列取代 (H16E、H16Q、L19K、D20R、D20K、D20H、D20Y、M23H、D84K、D84H、S87Y、N88D、N88K、N88I、N88H、N88Y、V91N、V91K、V91H、V91R、I92H、E95K、E95R 或 E95I) 的 IL-2 突变蛋白表达为与 Fc 异二聚体的 C 末端融合物。这些构建体还含有针对高 CD25 结合亲和力的 haMut7 突变 (V69A、N71R、Q74P) 和针对高效折叠的 C125A。

[0262] 在实施例 2 的 T 细胞 STAT5 磷酸化测定中筛选所述小组的效力, 发现 H16E、D84K、V91N、V91K 和 V91R 具有比野生型 IL-2 低但比 N88D 高的活性 (图 2)。

[0263] H16E、D84K、V91N、V91K 和 V91R 具有比野生型 IL-2 低但比 N88D 高的活性。

[0264] 也在 T 细胞和 NK 生长测定中检测选定的突变蛋白。

[0265] 对于 T 细胞测定, 利用 100ng OKT3 以 300 万 /ml 活化总 PBMC。在第 2 天, 洗涤细胞 3 次, 并将其在新鲜培养基中静置 5 天。随后用 CFSE 标记细胞, 并在 FACS 分析之前将其以 50 万 / 孔在含 IL-2 的培养基中于 24 孔板中进一步培养 7 天。T 细胞亚组的增殖在图 3 中显示为 CFSE 稀释物 (中位 CFSE 荧光)。

[0266] 对于 NK 细胞测定,将 MACS 分选的 CD16+NK 细胞以 10 万 / 孔在含 IL-2 的培养基中于 96 孔板中培养 3 天。在最后的 18 小时孵育过程中将 0.5 μ Ci 3 H- 胸苷添加至每一个孔。结果示于图 4 中。

[0267] 突变体 H16E、D84K、V91N、V91K 和 V91R 突变体能够刺激与 WT IL-2 相似的 Treg 生长,但对其它 T 细胞的效力降至约 1/10 (图 3),并且对 NK 细胞的效力降至约 1/100 (图 4)。

[0268] 设计单独小组的 Fc. IL-2 融合蛋白,其中通过一系列单个氨基酸截短缩短 Fc 异二聚体与突变蛋白 haMut7 (V69A、N71R、Q74P、C125A) 之间的距离。

[0269] Fc. haMut 7 Fc... TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LN... haMut7

[0270] (SEQ ID NO :22)

[0271]

```

Trunc1 Fc... TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LN... haMut7 (SEQ ID NO: 23)
Trunc2 Fc... TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LN... haMut7 (SEQ ID NO: 24)
Trunc3 Fc... TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LN... haMut7 (SEQ ID NO: 25)
Trunc4 Fc... TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LN... haMut7 (SEQ ID NO: 26)
Trunc5 Fc... TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LN... haMut7 (SEQ ID NO: 27)
Trunc6 Fc... TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LN... haMut7 (SEQ ID NO: 28)
Trunc7 Fc... TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LN... haMut7 (SEQ ID NO: 29)
Trunc8 Fc... TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LN... haMut7 (SEQ ID NO: 30)

```

[0272] Trunc1-Trunc4 具有与全长亲代构建体 Fc. haMut7 相同的效力,如通过图 2、3 和 4 中描述的 STAT5 磷酸化以及 T 细胞和 NK 细胞增殖测量的。Trunc5 和 Trunc6 刺激更弱的应答,但该应答仍然比由 N88D 突变 (haD 和 haMut7D) 刺激的应答强并且与由 V91K 刺激的应答非常相似。Trunc7 比 N88D 突变蛋白弱, Trunc8 几乎无活性。然而,当对 NK 细胞测试时, Trunc5 和 Trunc6 是比 V91K 更强的激动剂,这表明通过信号转导突变比由近端 Fc 结构域产生的位阻更容易实现 Treg 选择性。

[0273] 实施例 4-Fc 同二聚体的背景中的高 CD25 亲和力突变

[0274] 赋予高 CD25 结合亲和力的突变被认为是有利的,因为它们增加对 CD25⁺ 高 T 细胞的向性,并且因为它们促进长期 CD25⁺ : IL-2 突变蛋白缔合和延长的信号转导。然而,减少突变数目可降低免疫原性潜能。具有和不具有 haMut1 高亲和力突变 V69A 和 Q74P 的 N88D 或 V91K 突变蛋白表达为至 Fc 同二聚体的 C 末端的融合物,并比较其生物活性。在 pSTAT5 刺激测定中,同源二聚化相对于单体突变蛋白对信号强度没有影响。高亲和力突变 V69A 和 Q74P 的回复也不影响 pSTAT5 信号转导。在 T 细胞生长测定中,高亲和力突变减小对常规 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞的活性但不减小对调节性 T 细胞的活性 (图 5)。高亲和力突变也不改变 NK 细胞的增殖应答 (图 6)。

[0275] 为了确定高亲和力突变是否在体内影响 T 细胞应答,利用 Fc. IL-2 突变蛋白融合蛋白对人源化小鼠 (利用人 CD34⁺ 造血干细胞重建的 NOD. SCID. Il2rg⁻ 裸鼠) 给药并监测 Treg 扩增。将 7 周龄 NOD. SCID. Il2rg⁻ null (NSG) 小鼠 (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) 进行辐照 (180rad) 并用 94,000 个胎儿肝 CD34⁺ 造血干细胞进行重建。在第 21 周,基于百分比嵌合状态的等同分布 (通过 PBL 的流式细胞术测定的) 将小鼠分配至 6 个组中,并在第 0

天和第7天对所述小鼠施用1 μg的指定的Fc。突变蛋白融合蛋白或PBS的皮下注射。在第11天,通过流式细胞术测定血液中的T细胞亚组频率。在每动物1 μg的低剂量上,高亲和力突变未使Treg扩增提高超过对于单独的N88D或V91K突变观察到的Treg扩增(图7)。

[0276] Treg表达是选择性的,因为FOXP3⁻CD4⁺T细胞相对于包括人B细胞和T细胞以及小鼠骨髓细胞的混合物的总外周血白细胞(PBL)在丰度上未增加。此外,在更高的剂量上,高亲和力突变促进CD25⁺FOXP3⁻T细胞的增加,从而减小Treg选择性。因此,在Fc同二聚体的背景中,高亲和力突变被认为不是促进优先Treg生长所必需的。

[0277] Fc.WT IgG1Fc(N297G_de1K) : :G4S : :huIL-2(C125A) (SEQ ID NO :16)

[0278] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY

[0279] RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

[0280] WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0281] GGGGS

[0282] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI

[0283] SNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

[0284] Fc.haMut1V91K IgG1Fc(N297G_de1K) : :G4S : :huIL-2(V69A, Q74P, V91K, C125A) (SEQ ID NO :17)

[0285] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY

[0286] RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

[0287] WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNMYTQKSLSLSPG

[0288] GGGGS

[0289] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLI

[0290] SNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

[0291] Fc.V91K(或Fc.IL-2(V91K)) IgG1Fc(N297G_de1K) : :G4S : :huIL-2(V91K, C125A) (SEQ ID NO :18)

[0292] DKHTHTCPPcPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY

[0293] RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

[0294] WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0295] GGGGS

[0296] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI

[0297] SNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

[0298] Fc.haMut1N88D IgG1Fc (N297G_de1K) : :G4S : :huIL-2 (V69A, Q74P, N88D, C125A)
(SEQ ID NO :19)

[0299] DKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYGSTY

[0300] RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVE

[0301] WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0302] GGGGS

[0303] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEA
LNLAPSKNFHLRPRDLI

[0304] SDINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

[0305] Fc. N88D (或 Fc. IL-2 (N88D)) IgG1Fc (N297G_de1K) : :G4S : :huIL-2 (N88D, C125A)
(SEQ ID NO :20)

[0306] DKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYGSTY

[0307] RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVE

[0308] WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0309] GGGGS

[0310] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV
LNLAQSKNFHLRPRDLI

[0311] SDINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

[0312] 实施例 5--Fc. IL-2 突变蛋白的延长的细胞表面 CD25 缔合

[0313] 来自人源化小鼠研究的预料之外的结果是尽管它们减弱信号转导的能力,但所述突变蛋白相对于 Fc. WT IL-2 诱导更强劲的 Treg 富集。在 1 μ g/小鼠 (图 7) 的剂量上和和 0.5 μ g/小鼠 (图 8) 的更低剂量上观察到相对于针对 Fc. WT 看到的 Treg 富集和 FOXP3 上调更大的 Treg 富集和 FOXP3 上调。该增强的体内效力可由减少的 T 细胞造成的消耗 (从而使得可获得更多的 Fc. IL-2 突变蛋白用于延长的信号转导) 导致。

[0314] 然而体外和体内 PK 研究未能显示 Fc. V91K 或 Fc. N88D 相对于 Fc. WT 在来自活化的 T 细胞培养物的上清液或来自被给药的小鼠的血清中的显著增加的持续。因为 Fc 融合物钻入 2 个 IL-2 突变蛋白结构域,因此增加的内体再循环可因增加的对于 CD25 的亲合力而导致延长的细胞表面缔合。事实上,已发现在融合蛋白的短暂暴露后, Fc. V91K 和 Fc. N88D 比 Fc. WT 更高效地保持在先前活化的 T 细胞的表面上 (图 9A 和 B)。

[0315] 用 100ng/ml OKT3 预刺激原代 PBMC,进行 2 天。收获细胞,洗涤 4 次,将其在培养基中静置过夜。随后在 37 $^{\circ}$ C 用 400pM Fc. IL-2 泳冲细胞 30 分钟。脉冲后,在 1 次洗涤后收获细胞用于 T0,将细胞在 12ml 的温培养基中再洗涤另外 3 次,并培养 4 小时。为了检测细胞结合的 Fc. IL-2,用抗-人 IgG-FITC (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) 和抗-CD25-APC 对细胞进行染色 (图 9A)。

[0316] 在相同的时间点通过磷-STAT5 的免疫检测观察利用 Fc. V91K 和 Fc. N88D 相对于

Fc.WT 的 IL-2R 信号转导的持续。显示了针对 FOXP3+CD4+T 细胞的磷 -STAT5MFI (图 9B)。

[0317] 实施例 6—融合序列的优化

[0318] 在小鼠中进行的临床前研究中,当将完整分子的血清浓度与仅人 Fc 部分(表示循环人 Fc 分解代谢产物)的血清浓度相比较时,Fc. IL-2 突变蛋白显示差异暴露。为了优化 Fc. IL-2 突变蛋白的体内稳定性和药代动力学,表征融合序列修饰的在全身性循环中和在通过网状内皮系统的再循环过程中对 Fc. IL-2 突变蛋白的蛋白水解性降解的影响。在体外和体内评价下列构建体的蛋白水解性降解。

[0319]

```
{Ala_Ala}_G4S      ...TQKSLSPGGGGGSAPTSSSTKKTQLQ... ba7N88D (SEQ ID NO: 31)
{N297G_de1K}_G4S  ...TQKSLSPGGGGGSAPTSSSTKKTQLQ... ha1V91K (SEQ ID NO: 32)
{N297G_KtoA}_AAPT ...TQKSLSPGGGGGSAPTSSSTKKTQLQ... ha1V91K (SEQ ID NO: 33)
{N297G_KtoA}_AAPA ...TQKSLSPGGGGGSAPTSSSTKKTQLQ... ha1V91K (SEQ ID NO: 34)
```

[0320] 通过比较总的人 Fc 的随时间过去的浓度与完整 Fc. IL-2 突变蛋白的随时间过去的浓度的定量免疫测定测量稳定性。Fc. IL-2 突变蛋白的蛋白水解利用抗 -IL-2 和抗 -人 Fc 抗体通过免疫印迹分析来确认,随后免疫捕获代谢产物,并通过质谱进行表征。利用质谱对来自体外和体内样品的 (Ala_Ala)_G4S 的分解代谢产物的表征将 Fc 结构域的 C 末端 Lys 鉴定为蛋白水解切割位点。Fc 结构域的 C 末端赖氨酸的缺失或突变 ((N297G_de1K)_G4S 和 (N297G_KtoA)_AAPT) 相较于具有 C 末端赖氨酸 ((Ala_Ala)_G4S) 的 Fc 构建体在 37°C 导致在小鼠血清中的延长的体外稳定性。该延长的体外血清稳定性在小鼠中被转化成更大的暴露,如通过 Fc. IL-2 突变蛋白血清浓度相对时间曲线的曲线下面积 (AUC) 测量的。也在体外在来自食蟹猴和人的血清中观察到缺乏 C 末端 Fc 赖氨酸的 Fc. IL-2 突变蛋白的该延长的稳定性。IL-2 的 Thr-3 至 Ala 的突变 ((N297G_KtoA)_AAPA) 在 37°C 在小鼠血清中和在利用重组人组织蛋白酶 D 和 L 的单独的孵育中导致降低(相较于 (N297G_KtoA)_AAPT) 的体外稳定性。相较于 (N297G_KtoA)_AAPT, (N297G_KtoA)_AAPA 该降低的体外血清稳定性在体内在小鼠中转化成更低的暴露 (AUC)。通过质谱法进行的来自体外和体内样品的 (N297G_KtoA)_AAPA 的分解代谢产物的表征将 IL-2 突变蛋白结构域的 Lys 8 和 Lys 9 鉴定为对蛋白水解易感的残基,对于 (N297G_KtoA)_AAPT 的等同样品未观察到该现象。相对于 (N297G_KtoA)_AAPT,在来自食蟹猴和人的血清中体外也观察到 (N297G_KtoA)_AAPA 在 37°C 的稳定性下降。

[0321] 由于该区域中糖基化的重要性和为了潜在地改善融合蛋白的可制造性,如下改变融合序列以促进 N- 连接而非 O- 连接的糖基化。

[0322] 初始的

[0323] IgG1Fc(N297G_de1K): :G4S: :hulL-2(V91K,C125A)
TQKSLSPGGGGGSAPTSSSTKKTQLQ(SEQ ID NO:32)

[0324] 改变的

[0325]


```

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(T3N,V91K,C125A)  NQKSSLSLSPKQKSTAPKSSSTKKTQLQ (SEQ
ID NO: 35)

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(T3N,55T,V91K,C125A)  NQKSSLSLSPKQKSTAPKSSSTKKTQLQ (SEQ
ID NO: 36)

IgG1Fc(N297G_delK)::GGNGT::huIL-2(T3A,V91K,C125A)  NQKSSLSLSPKQKSTAPKSSSTKKTQLQ (SEQ
ID NO: 37)

IgG1Fc(N297G_delK)::YGNGT::huIL-2(T3A,V91K,C125A)  NQKSSLSLSPKQKSTAPKSSSTKKTQLQ (SEQ
ID NO: 38)

```

[0326] 实施例 7 - 食蟹猴 PK/PD 测定

[0327] 标准 IL-2 免疫刺激疗法在给药周期之间需要无药物假期（无暴露）来避免不希望副作用。相反地，Treg 扩增或刺激疗法可能需要以对于 Treg 刺激是足够的持续谷药物水平（血清 C_{min} ）而非低于导致免疫活化的药物水平的最大暴露（血清 C_{max} ）进行的延长的暴露。本实施例演示为获得延长的靶覆盖（血清 C_{min} ）同时维持低于预期是促炎免疫活化所必需的谷药物水平的最大暴露（血清 C_{max} ）在食蟹猴中进行的半衰期延长的突变蛋白的给药策略。

[0328] 在 4 个组 (A-D) 中用 Fc.V91K(IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(V91K,C125A)) 对食蟹猴给药,对 3 个组 (A-C) 皮下给药,对一个组 (D) 静脉内给药。对于每一个组,按照下文中概述的给药策略对 4 只生物学上首次接触实验的雄性食蟹猴给药。半衰期延长的突变蛋白的皮下给药可允许更大的淋巴吸收,从而导致更低的最大暴露（血清 C_{max} ）和 / 或更强劲的药理学应答 (Treg 扩增)。组 A 的给药策略由在第 0、2 和 4 天的 3 个连续的 10 微克 / 千克的剂量（用于第 1 周期）和在第 14 天的 10 微克 / 千克组成,从而允许与 50 微克 / 千克的更高初始剂量相似的延长的靶覆盖,同时维持更低的最大暴露 (C_{max})。用于组 B 的给药策略是在第 0 和 14 天以 50 微克 / 千克给药,与组 A 相比较。组 C 的给药策略是在第 0 和 28 天以 50 微克 / 千克给药。允许确定谷覆盖是否是维持 Treg 富集所需要的或给药周期之间的无药物假期是否是有益的。用于静脉内给药臂组 D 的给药策略是在第 0 天以 50 微克 / 千克给药,从而允许最大暴露 (C_{max}) 和 Treg 富集差异与皮下给药的最大暴露和 Treg 富集差异相比较。

[0329] 在下列时间点测量每一个指定的剂量组的药代动力学（用于完整分子和总的人 Fc 的定量免疫测定）、抗药物抗体、溶于水的 CD25 和血清细胞因子 (IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、IL-5、IL-4 和 IL-13)：

[0330] 组 A:给药前（第一周期；剂量 1）、48（给药前第一周期；剂量 2）、96 小时（给药前第一周期；剂量 3）、100 小时、104 小时、120 小时、168 小时、216 小时、264 小时、336 小时（给药前第二周期）、340 小时、344 小时、360 小时、408 小时、456 小时、504 小时、576 小时、672 小时、744 小时、840 小时和 1008 小时。

[0331] 组 B:给药前（第一周期）、4 小时、8 小时、24 小时、72 小时、120 小时、168 小时、240 小时、336 小时（给药前第二周期）、340 小时、344 小时、360 小时、408 小时、456 小时、504 小时、576 小时、672 小时、744 小时、840 小时和 1008 小时。

[0332] 组 C:给药前（第一周期）、4 小时、8 小时、24 小时、72 小时、120 小时、168 小时、240 小时、336 小时、408 小时、504 小时、672 小时（给药前第二周期）、676 小时、680 小时、696 小时、744 小时、792 小时、840 小时、912 小时、1008 小时、1080 小时和 1176 小时。

[0333] 组D:给药前(第一周期)、0.25小时、1小时、4小时、8小时、24小时、72小时、120小时、168小时、240小时、336小时、408小时、504小时和672小时。

[0334] 在下列时间点测量每一个指定的剂量组的药效学(外周血 Treg、非调节性 CD4 和 CD8 T 细胞以及 NK 细胞的免疫表型分型和计数):

[0335] 组A:给药前(第一周期;剂量1)、96(给药前第一周期;剂量3)、168小时、336小时(给药前第二周期)、456小时和576小时。

[0336] 组B:给药前(第一周期)、120小时、240小时、336小时(给药前第二周期)、456小时和576小时。

[0337] 组C:给药前(第一周期)、120小时、240小时、672小时(给药前第二周期)、792小时和912小时。

[0338] 组D:给药前(第一周期)、120和240小时。

[0339] 评估给药前和每剂量组初始给药后24小时所有动物和剂量组的血液学和临床化学。评价下列参数。

[0340] 血液学:

[0341] ●白细胞计数(总差示和绝对差示)

[0342] ●红细胞计数

[0343] ●血红蛋白

[0344] ●血细胞比容

[0345] ●平均红细胞血红蛋白、平均红细胞容积、平均红细胞血红蛋白浓度(计算的)

[0346] ●绝对网织红细胞

[0347] ●血小板计数

[0348] ●血细胞形态学

[0349] ●红细胞分布宽度

[0350] ●平均血小板体积

[0351] 临床化学:

[0352] ●碱性磷酸酶

[0353] ●总胆红素(如果总胆红素超过1mg/dL,则以直接胆红素计) ●天冬氨酰氨基转移酶

[0354] ●丙氨酸氨基转移酶

[0355] ● γ 谷氨酰转移酶

[0356] ●尿素氮

[0357] ●肌酸酐

[0358] ●总蛋白

[0359] ●白蛋白

[0360] ●球蛋白和A/G(白蛋白/球蛋白)比率(计算的)

[0361] ●葡萄糖

[0362] ●总胆固醇

[0363] ●甘油三酯

[0364] ●电解质(氯化钠、氯化钾)

[0365] ●钙

[0366] ●磷

[0367] 实施例 8 - 无糖基化 IgG1Fc

[0368] 天然存在的 IgG 抗体在重链 (CH2) 的恒定结构域 2 中具有糖基化位点。例如, 人 IgG1 抗体具有位于位置 Asn297 (EU 编号) 的糖基化位点。迄今为止, 用于产生无糖基化抗体的策略包括用在物理化学性质方面与 Asn 相似的氨基酸 (例如, Gln) 或用模拟不具有极性基团的 Asn 侧链的 Ala 残基替代 Asn 残基。本实施例显示了用甘氨酸替代 Asn (N297G) 的益处。N297Gfc 是具有更好的生物物理学性质和可制造性属性 (例如, 纯化过程中的回收) 的无糖基化分子。

[0369] Fc 片段和 IgG 抗体的多个已知的晶体结构的检查显示相当大的围绕糖基化环区段, 特别地在被糖基化的位置 Asn297 上的构象柔性。在许多已知的晶体结构中, Asn297 适合正主链两面角。Gly 因不存在侧链原子而具有适合正主链两面角的高倾向性。因此, 基于该构象和结构原因, Gly 可以是比 N297Q 或 N297A 更好的对 Asn 的替代。

[0370] 用 Gly 突变 Asn297 导致具有很大改善的回收 (或效率) (在纯化过程中) 和生物物理学性质的无糖基化分子。例如, 相较于对于 N297Q 的 45.6% 和对于 N297A 的 39.6%, 对于 N297G 突变, 来自蛋白质 A 库的回收的百分比 (终产率) 为 82.6%。SPHP 柱分析显示的对于 N297Q 和 N297A 突变体的更低的回收百分比归因于拖尾峰, 所述拖尾峰表明高分子量聚集和 / 或错误折叠的种类。在更大的 2L 规模的运行中再确认该结果。

[0371] 在生物制药产业中, 评估具有大规模生产的潜在需要 (例如, 可能作为药物销售) 的分子的许多属性来降低所述分子不适合于大规模生产和纯化的风险。在可制造性评估中, N297G 显示对 pH 变化的稳健性。N297G 没有聚集问题; 然而 N297Q 和 N297A 分别具有 20% 和 10% 的聚集的增加。虽然 N297G 具有更好的可制造性属性, 但其在所有其中测试其的功能测定中与 N297Q 和 N297A 相似。例如, 在 ADCC 测定中, 类似于 N297Q 和 N297A, N297G 缺乏细胞毒性。

[0372] 实施例 9 - 稳定的无糖基化 IgG1Fc

[0373] 本实施例描述了通过引入工程化二硫键提高 IgG 抗体支架的稳定性的方法。天然存在的 IgG 抗体是稳定的分子。然而, 对于一些治疗应用, 可能必需产生突变或生成无糖基化分子。例如, 无糖基化 IgG 分子可用于其中需要避免 ADCC 并且结合于 Fc γ 受体的治疗适应症。然而, 无糖基化 IgG1 具有比糖基化 IgG1 低得多的解链温度 (CH2 结构域的解链温度下降约 10°C; 70°C 至 60°C)。观察到的更低的解链温度负面地影响无糖基化 IgG1 的各种生物物理学性质。例如, 无糖基化 IgG1 在低 pH 相较于糖基化 IgG1 具有升高水平的聚集。

[0374] 为了工程化二硫键, 最初使用包括 C- α 原子之间的距离计算的基于结构的方法来鉴定 Fc 区中的 54 个残基对以用于至 Cys 的突变。将这 54 个位点进一步向下缩窄至 4 个残基对 (V259C-L306C、R292C-V302C、A287C-L306C 和 V323C-I332C)。所使用的标准包括 (i) CH2 结构域内的位置, (ii) 远离环、转角和糖类, (iii) 远离 Fc γ 受体和 FcRn 相互作用位点, (iv) 溶剂可及性 (优选埋藏的位置) 等。

[0375] 在无糖基化 N297Gfc 的背景中生成配对的半胱氨酸取代。非还原肽作图分析显示 4 个工程化位点中的 3 个形成如所预期的和在该背景中设计的二硫键。V259C-L306C 突变未正确地形成二硫键, 从而导致与已存在于 CH2 结构域中的天然二硫化物的错配。另

外 3 个设计 R292C-V302C、A287C-L306C 和 V323C-I332C 如所预期和设计的, 正确形成二硫键。将二硫键添加至 N297G 突变导致相对于单独的 N297G 突变约 15°C 的热稳定性的提高。在 R292C-V302C、A287C-L306C 和 V323C-I332C 二硫化物变体当中, 当向大鼠施用, R292C-V302C 和 A287C-L306C 具有良好的药代动力学 (分别地 11 天和 9 天的 $t_{1/2}$)。这与在大鼠中针对先前公开的具有 5 天的 $t_{1/2}$ 的 CH2 结构域二硫键 (Gong 等人, J. Biol. Chem. 2009284:14203-14210) 观察到的药代动力学特征谱相反。

[0376] 工程化 CH2 结构域中的二硫键提高无糖基化分子的稳定性 (与糖基化 IgG1 分子相当) (10°C 至 15°C 的解链温度的提高, 如通过差示扫描量热法测定的)。本文中描述的工程化位点不导致二硫化物混乱, 并且如所预期的在约 100% 的群体中形成二硫化物。更重要地, 与 CH2 结构域中公开的二硫键位点不同, 本文中描述的二硫键不影响大鼠 PK。

[0377] 实施例 10

[0378] 体外比较 V91K 与 N88D 突变对来自食蟹猴和人的 T 和 NK 细胞中的应答的作用。在 CD25 存在的条件下 (全血 pSTAT5 应答中的 CD4⁺CD25⁺ 门控的 T 细胞), V91K 突变对食蟹猴 IL-2R 信号转导的作用, 相较于其减小的对人 IL-2R 的活性, 可被忽略。然而, 在 CD25 不存在的情况下 (全血 pSTAT5 应答和 NK 细胞增殖中的两种 CD25⁻ 门控的 T 细胞), V91K 突变更显著地减弱食蟹猴的 IL-2R 信号转导。相反地, Fc. N88D 显示与 Fc. V91K 在人全血中的 T 细胞中的信号转导作用更相似的食蟹猴全血中的 CD25⁺ T 细胞中的减弱的信号转导。表 2 中概述的体外数据表明在食蟹猴中对于更弱的激动剂 Fc. N88D 观察到的治疗窗将预测 Fc. V91K 在人受试者中的作用。

[0379] 表 2. V91K 或 N88D 突变对人和犬细胞的体外应答的作用的概述

[0380]

	全血 pSTAT5		NK 细胞增殖
	CD25 ⁺ T 细胞	CD25 ⁻ T 细胞	
V91K 对犬	∅	↓	↓
V91K 对人	↓	↓↓	↓↓
N88D 对犬	↓	↓↓	↓↓
N88D 对人	↓↓	↓↓	↓↓↓

[0381] 实施例 -11

[0382] 在食蟹猴中进行 2 个体内研究。第一食蟹猴研究被设计来比较 Fc. V91K 的两周与四周给药间隔, 以确定完全或部分药代动力学 (PK) 和药效学 (PD) 谷是否改变对第二剂量的应答的量级 (图 10A 和 B)。使用经预测产生强 Treg 应答的第一剂量 (50 μg/kg) 和探测治疗窗的下限的第二剂量 (10 μg/kg)。因为未显示 10 μg/kg 是否太低, 在第 1、3 和 5 天提供剂量以增加应答的可能性。该给药方案在第 5 天后提供与利用单次 50 μg/kg 皮下 (SC) 剂量实现的暴露相同的暴露, 但具有更低的 C_{max}。在淋巴对比血液腔中, 取决于更高的药物暴露, 50 μg/kg 的静脉内 (IV) 组也被包含来调查 PD 的潜在差异。本研究的结果确定每一个剂量水平诱导强 Treg 生长应答而无有害事件 (AE) 或 T_{eff} 或 NK 生长, 并且在第 14 天或第 28 天对第二剂量的应答是等同的。

[0383] 表 3. 用于第一食蟹猴研究的研究设计

[0384]

组	动物数量	给药 (天数)	剂量 Fc. V91K
1	4	1, 3, 5, 15	10 μ g/kg SC
2	4	1, 15	50 μ g/kg SC
3	4	1, 29	50 μ g/kg SC
4	4	1	50 μ g/kg IV

[0385] 第二食蟹猴研究被设计来探查利用 1、3、100、200 μ g/kg (SC) 的 Fc. V91K 剂量的治疗窗的边际, 并且将该边际与剂量为 3、10、100、200 μ g/kg (SC) 的更弱的激动剂 Fc. N88D 和剂量为 3、10、30、100 μ g/kg (SC QDx5) 的 PROLEUKIN[®] 相比较。基于公开的人和非人灵长类动物研究 (Hartemann 等人, 2013, Lancet Diabetes Endocrin 1:295-305 ; Saadoun 等人, 2011, NEJM 365:2067-77 ; Aoyama 等人, 2012, Am J Transplantation 12:2532-37) 选择 PROLEUKIN[®] 的剂量, 并将所述剂量进行 QDx5 施用以模拟 HCV 脉管炎和 1 型糖尿病 (T1D) 的低剂量 IL-2 临床试验。

[0386] 表 4. 用于第二食蟹猴研究的研究设计

[0387]

组	动物数量	检品	第 1 周期处理 处理天: 剂量(SC)	第 2 周期处理 处理天: 剂量(SC)
1	4	PROLEUKIN [®]	第 1-5 天: 3 μ g/kg	第 14-18 天: 30 μ g/kg
2	4	PROLEUKIN [®]	第 1-5 天: 10 μ g/kg	第 14-18 天: 100 μ g/kg
3	4	Fc.V91K	第 1 天: 1 μ g/kg	第 14 天: 100 μ g/kg
4	4	Fc.V91K	第 1 天: 3 μ g/kg	第 14 天: 200 μ g/kg
5	4	Fc.N88D	第 1 天: 3 μ g/kg	第 14 天: 100 μ g/kg
6	4	Fc.N88D	第 1 天: 10 μ g/kg	第 14 天: 200 μ g/kg

[0388] 在图 11A-F 中, 显示了细胞应答、体温和血清 CRP 的动力学。x- 轴上的时间轴始于第 0 天而非第 1 天作为施用第一剂量的当天。

[0389] 在组合中, 两个食蟹猴研究显示 IL-2 突变蛋白以更宽的治疗窗诱导比利用 PROLEUKIN[®] 实现的 Treg 富集更大的 Treg 富集 (图 12A 和 B)。对于 PROLEUKIN[®], Treg 富集与 NK 和嗜酸性粒细胞的生长同步。不受限于任何特定理论, 嗜酸性粒细胞的生长是公知的对 IL-2 疗法的应答, 并且可能是 IL-2 诱导的来自 CD25⁺ 先天淋巴样细胞的 IL-5 的结果。CD4 和 CD8 T_{eff} 的生长在使 Treg 增至 25-35% 的 CD4 T 细胞的剂量上发生。相反地, Fc. V91K 和 Fc. N88D 以相对于 NK 细胞和嗜酸性粒细胞更大的选择性诱导 Treg 生长, 并且促进 T_{eff} 生长的剂量高于将 Treg 富集至 >40% 的 CD4 T 细胞的那些剂量。

[0390] 在文献中报导的低剂量 IL-2 临床试验中, 发生的第一 AE 是流感样病症和发热。因此, 除了比较治疗窗以外, 本研究的目的是发现先于发热的生物标志物。如图 12C 中显示的, 对于 PROLEUKIN[®] 的两个更高剂量, 发现 CRP 水平与体温同步。对于 Fc. V91K, 在最

高剂量上检测到体温的适度升高,并且在次低剂量上观察到 CRP 的少量增加。因此,CRP 可用于监测受试者对利用本发明的分子的治疗的应答和 / 或用于在患者中确定剂量递增的上限。

[0391] 在 PROLEUKIN[®] - 处理的动物中还观察到某些毒性,所述毒性在 Fc. V91K- 或 Fc. N88D- 处理的动物中不太明显或不存在于其中 (图 12D)。已发现血小板、嗜中性粒细胞和白蛋白的水平全被利用 PROLEUKIN[®] 的治疗降低,然而导致相似或更大的 Treg 富集的 Fc. V91K 或 Fc. N88D 的剂量几乎不减小或不减小这些参数。综上所述,这些数据表明利用 Fc. V91K- 或 Fc. N88D 对患者的治疗的治疗窗预期显著大于利用 PROLEUKIN[®] 的治疗的治疗窗。

[0392] 实施例 -12

[0393] 在选定的时间点上,测试来自实施例 11 的第一食蟹猴研究的血清的抗药物抗体 (ADA) (图 13)。显示了其中通过竞争确认 Fc. V91K 特异性的样品的 ADA 信噪比数据。用 x- 轴上方的垂直线显示其中测试 ADA 的时间点。在组 1 中,一只动物在最后一个剂量后至少 15 天产生 ADA,在组 2 中,所有动物经测试不为 ADA 阳性,在组 3 中,ADA 在第一剂量后 15 或更多天一致地出现在 3 只动物中。当在第 162 天以 50 μ g/kg 重复组 1 和组 2 的给药时,4 周后 (第 190 天) 所有另外的动物经测试不是 ADA 阳性的。产生最强 ADA 信号 (210, 212) 的组 3 中的 2 个动物展现减弱的 PD 应答,与在第二剂量后在这些动物中观察到的减小的 C-max 一致。第 4 组 (50 μ g/kg IV) 中的所有动物经测试是 ADA 阳性的。ADA 对于 IL-2 和 Fc 结构域是特异性的,这可能预期归因于食蟹猴 IL-2 与人 IL-2 (V91K, C125A) 之间的 8 个氨基酸的差异。未测试 ADA 的中和活性。

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Xaa Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 2

<211> 133

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD_RES

<222> (125)..(125)

<223> Cys, Ser, Val 或 Ala

<400> 2

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

[0003]

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Xaa Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 3

<211> 227

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

[0004]

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

[0005]

Pro Gly Lys

225

<210> 4

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1

5

10

15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20

25

30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35

40

45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50

55

60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr

65

70

75

80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85

90

95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100

105

110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

[0006]

	115		120		125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser					
130		135		140	
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu					
145		150		155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro					
	165		170		175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val					
	180		185		190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met					
	195		200		205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser					
	210		215		220
Pro Gly					
225					
<210> 5					
<211> 5					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 人工序列的描述: 合成肽					
<400> 5					
Gly Gly Gly Gly Ser					
1		5			

[0007]

<210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 6
 Gly Gly Asn Gly Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 7
 Tyr Gly Asn Gly Thr
 1 5

<210> 8
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 8
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

[0008]

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 9
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 9
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Ser Tyr Lys
20 25 30

[0009]

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 10

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 10

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

[0010]

Asn Pro Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 11
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 11
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

[0011]

Asn Pro Lys Leu Ala Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 12

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 12

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

[0012]

	20		25		30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Glu	35	40	45		
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys	50	55	60		
Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu	65	70	75	80	
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu	85	90	95		
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala	100	105	110		
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile	115	120	125		
Ile Ser Thr Leu Thr	130				
<210> 13					
<211> 133					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 人工序列的描述: 合成多肽					
<400> 13					
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His	1	5	10	15	

[0013]

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Asp Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 14

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 14

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

[0014]

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Arg Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 15

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

[0015]

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Glu
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Asp Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 16

<211> 364

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 16

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

[0016]

1	5	10	15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	20	25	30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	35	40	45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	50	55	60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr	65	70	75
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	85	90	95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile	100	105	110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	115	120	125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser	130	135	140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	145	150	155
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			

[0017]

	180		185		190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met					
	195		200		205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser					
	210		215		220
Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys					
225		230		235	240
Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu					
	245		250		255
Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr					
	260		265		270
Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln					
	275		280		285
Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala					
	290		295		300
Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile					
305		310		315	320
Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys					
	325		330		335
Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp					
	340		345		350
Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr					

[0018]

355

360

<210> 17

<211> 364

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 17

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

[0019]

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
 225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
 245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
 260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala
 290 295 300

[0020]

Pro Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
 305 310 315 320

Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
 325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
 340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 355 360

<210> 18

<211> 364

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 18

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

[0021]

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
245 250 255

[0022]

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
 260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
 290 295 300

Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
 305 310 315 320

Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
 325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
 340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 355 360

<210> 19

<211> 364

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 19

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

[0023]

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

[0024]

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
 225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
 245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
 260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
 275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala
 290 295 300

Pro Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile
 305 310 315 320

Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
 325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
 340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 355 360

<210> 20

<211> 364

[0025]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 20

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

[0026]

145	150	155	160	
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	165	170	175	
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val	180	185	190	
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	195	200	205	
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser	210	215	220	
Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys	225	230	235	240
Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu	245	250	255	
Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr	260	265	270	
Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln	275	280	285	
Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala	290	295	300	
Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile	305	310	315	320
Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys				

[0027]

<210> 23
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 23
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25 30

<210> 24
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 24
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

<210> 25
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 25

[0029]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 28

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20 25

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 29

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
1 5 10 15

Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
 20

<210> 30

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 30

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
1 5 10 15

[0031]

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20

<210> 31
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 31
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20 25

<210> 32
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 32
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala
1 5 10 15

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20 25

<210> 33
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

[0032]

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 33

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Pro Thr Ser Ser
1 5 10 15

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20

<210> 34

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 34

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Pro Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20

<210> 35

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 35

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala
1 5 10 15

Pro Asn Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

[0033]

<210> 36

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 36

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Ala
1 5 10 15

Pro Asn Ser Thr Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

<210> 37

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 37

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Asn Gly Thr Ala
1 5 10 15

Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

<210> 38

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

[0034]

<400> 38

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Tyr Gly Asn Gly Thr Ala
1 5 10 15

Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 20 25

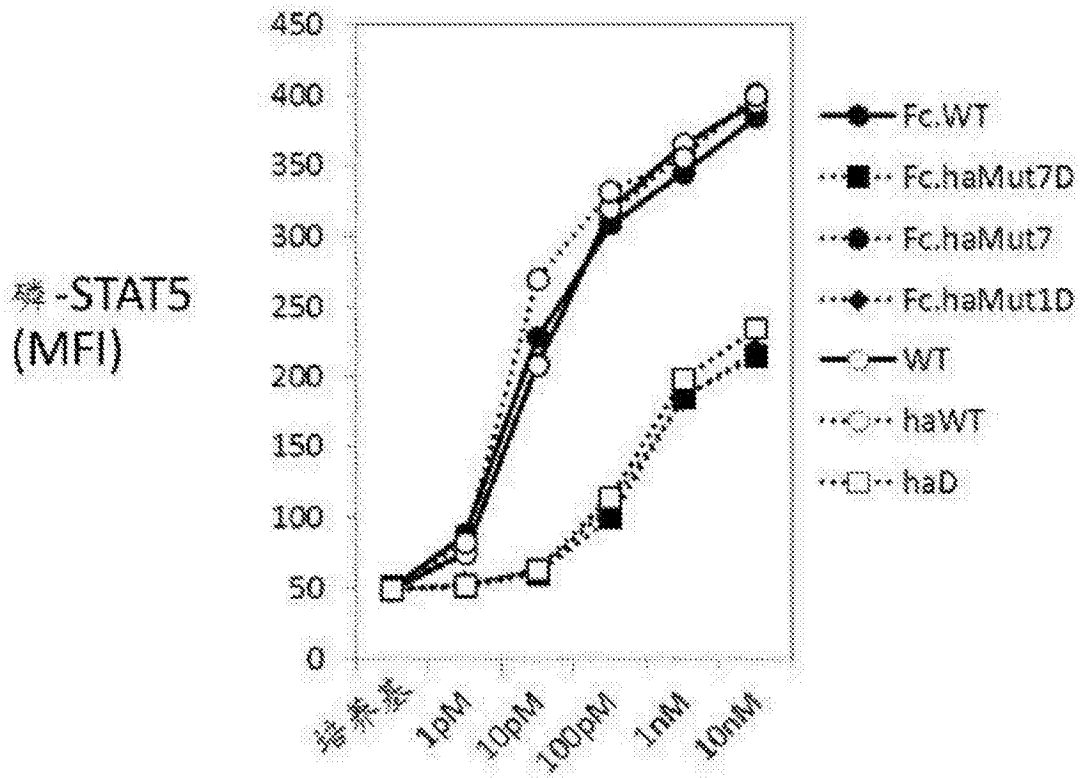


图 1

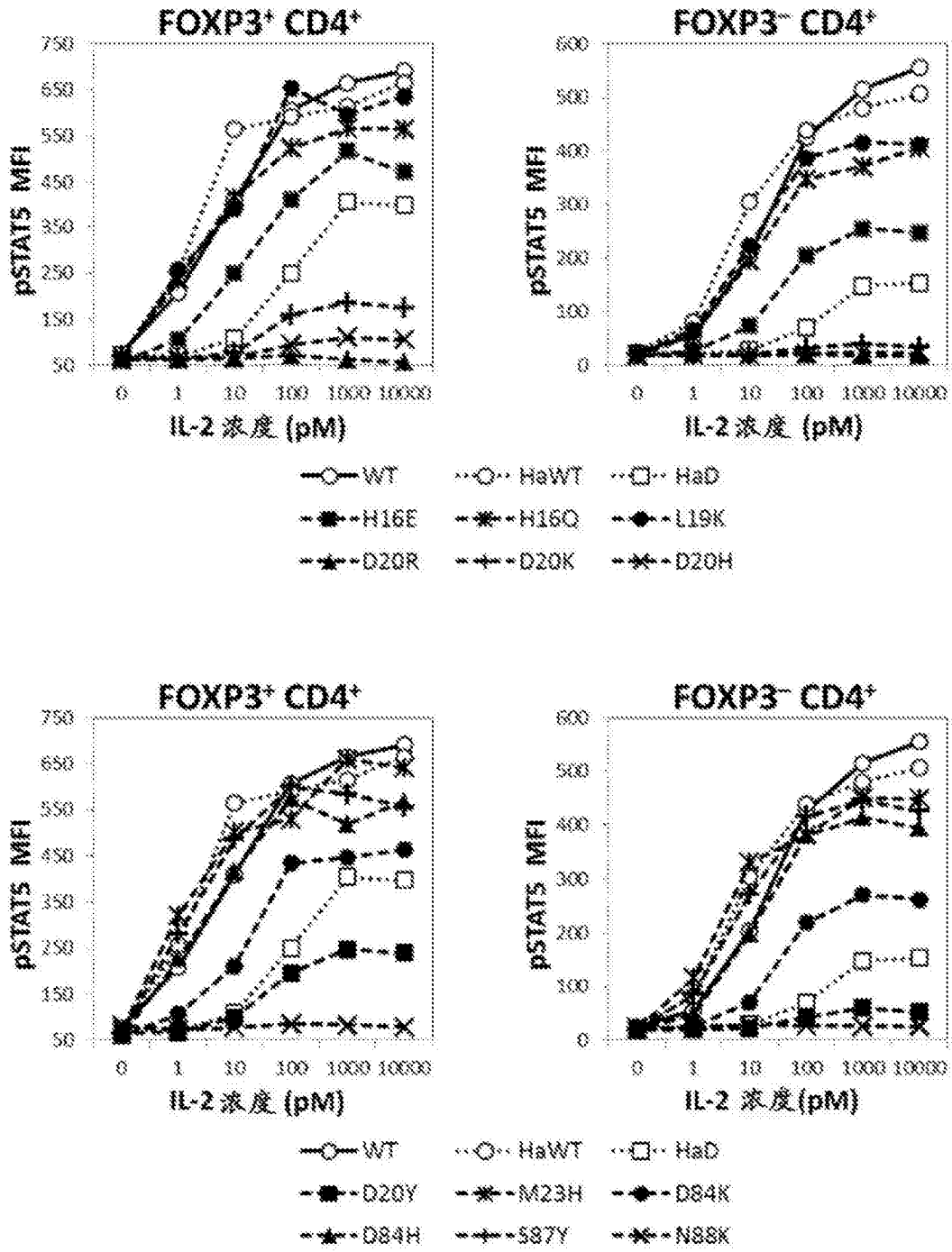


图 2A

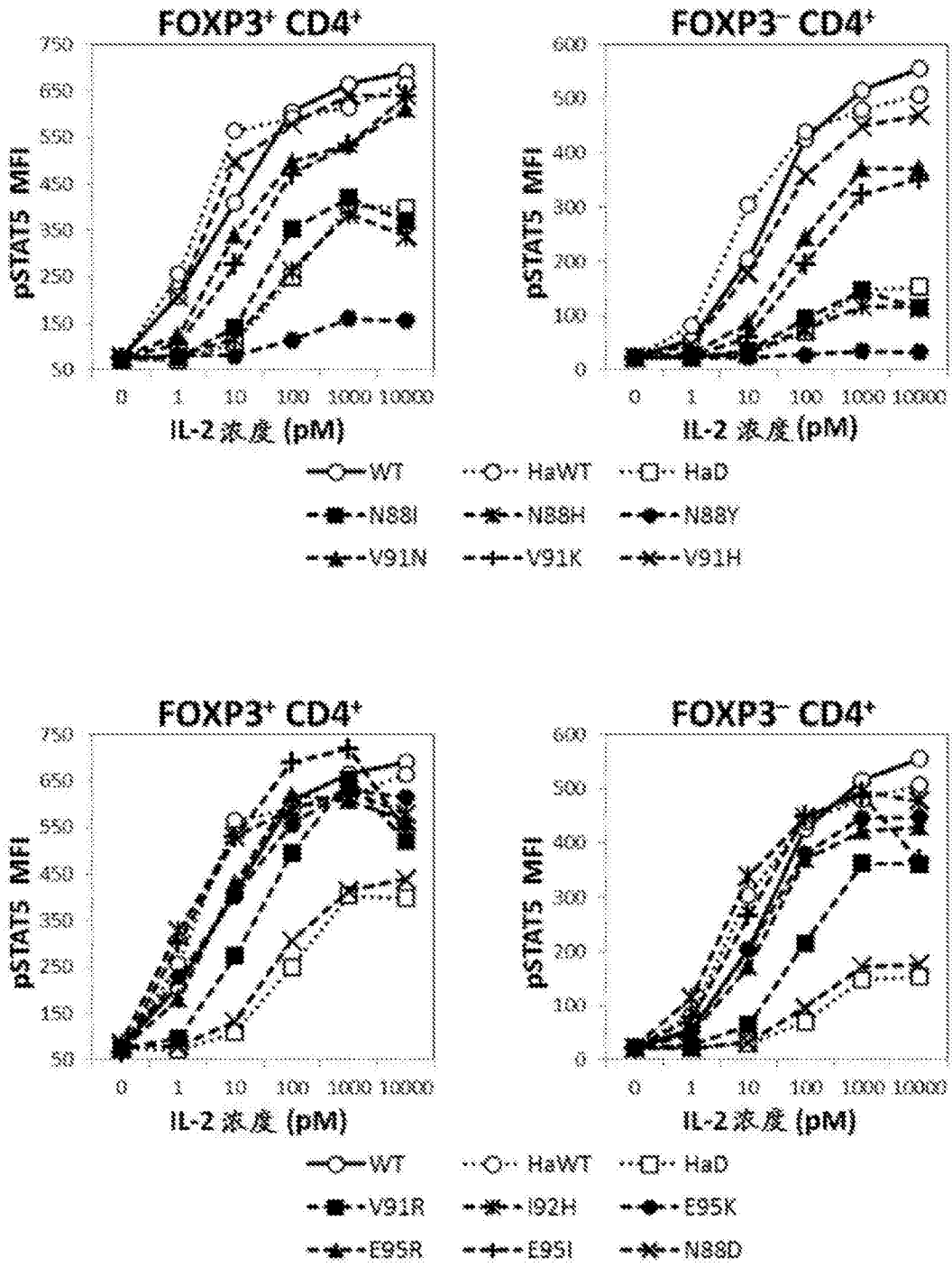


图 2B

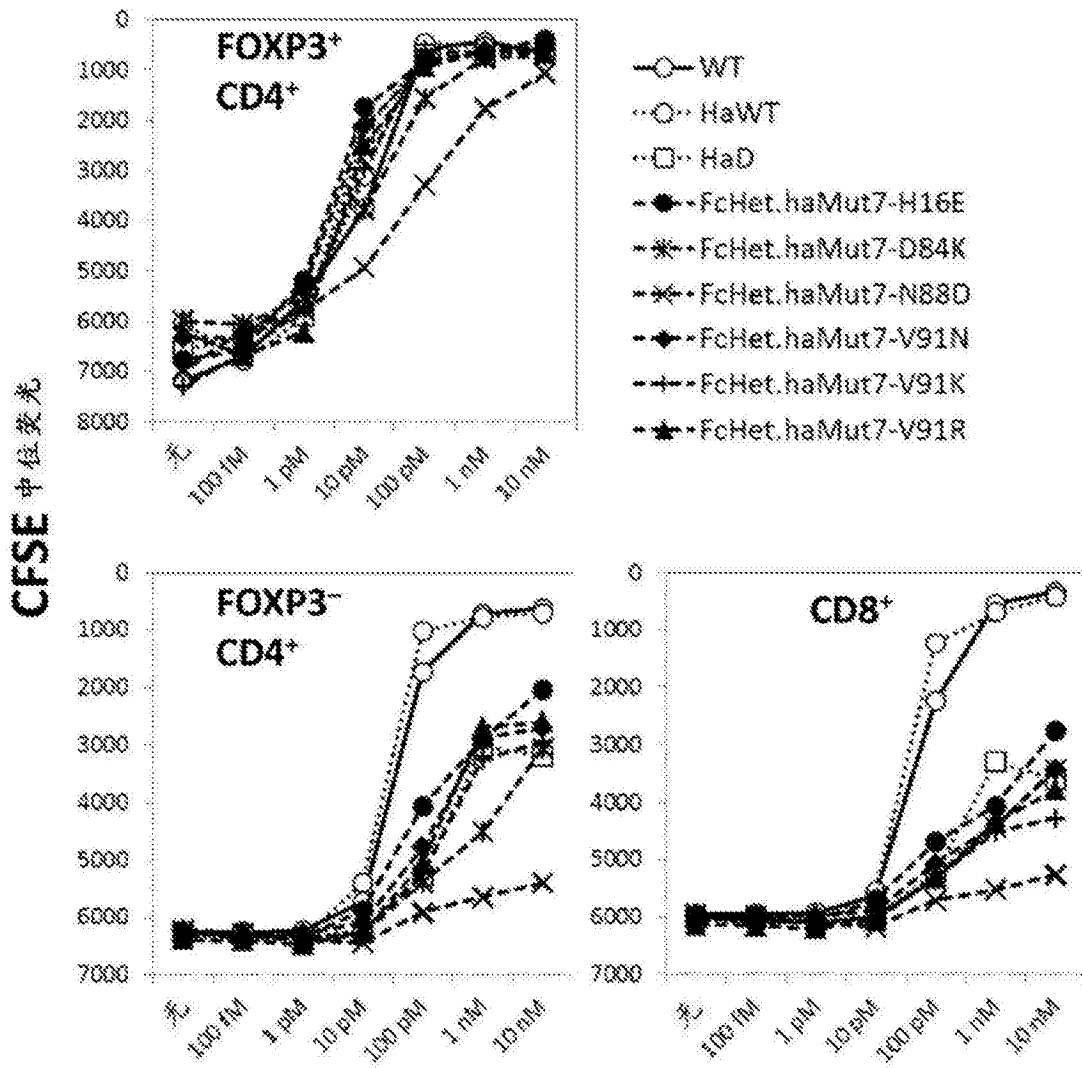


图 3

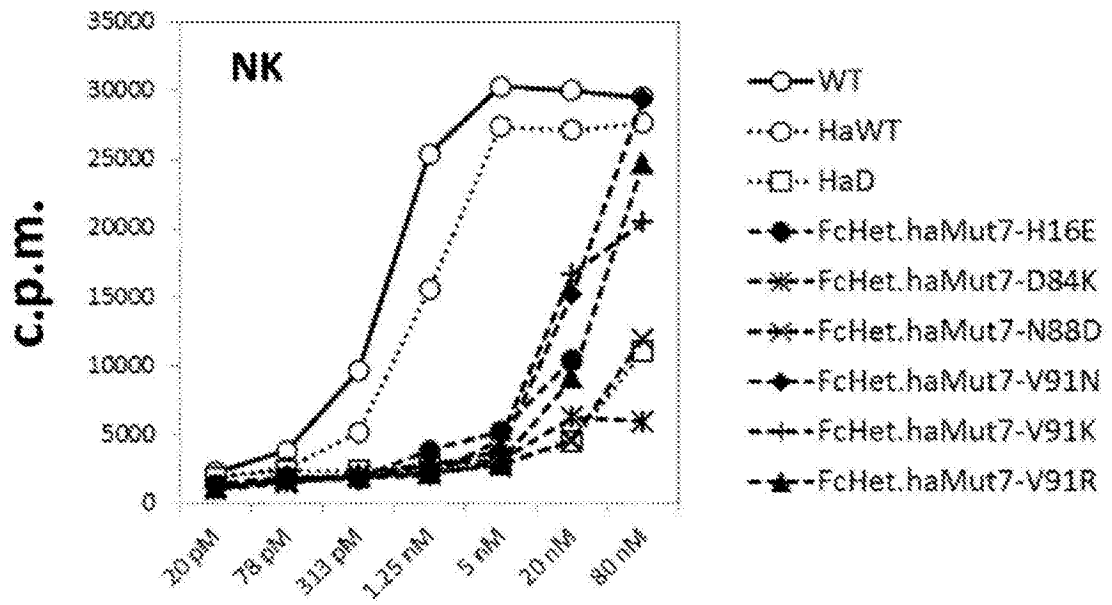


图 4

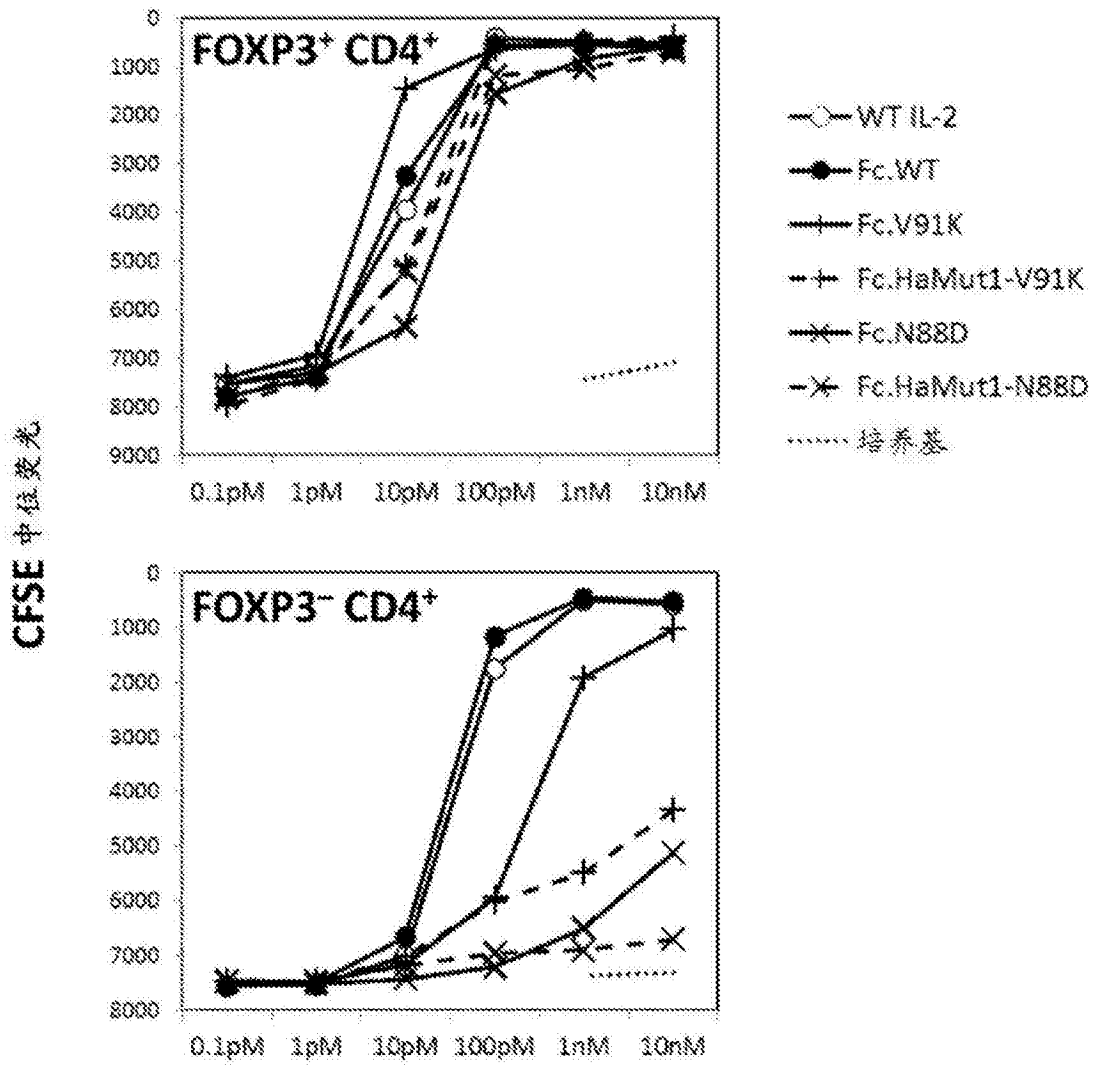


图 5

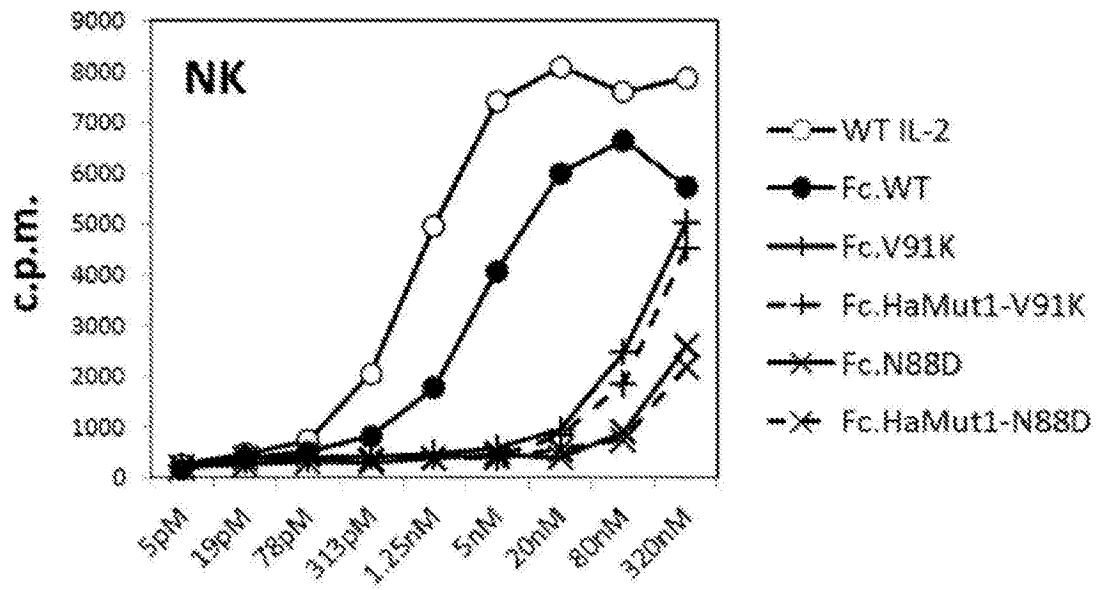


图 6

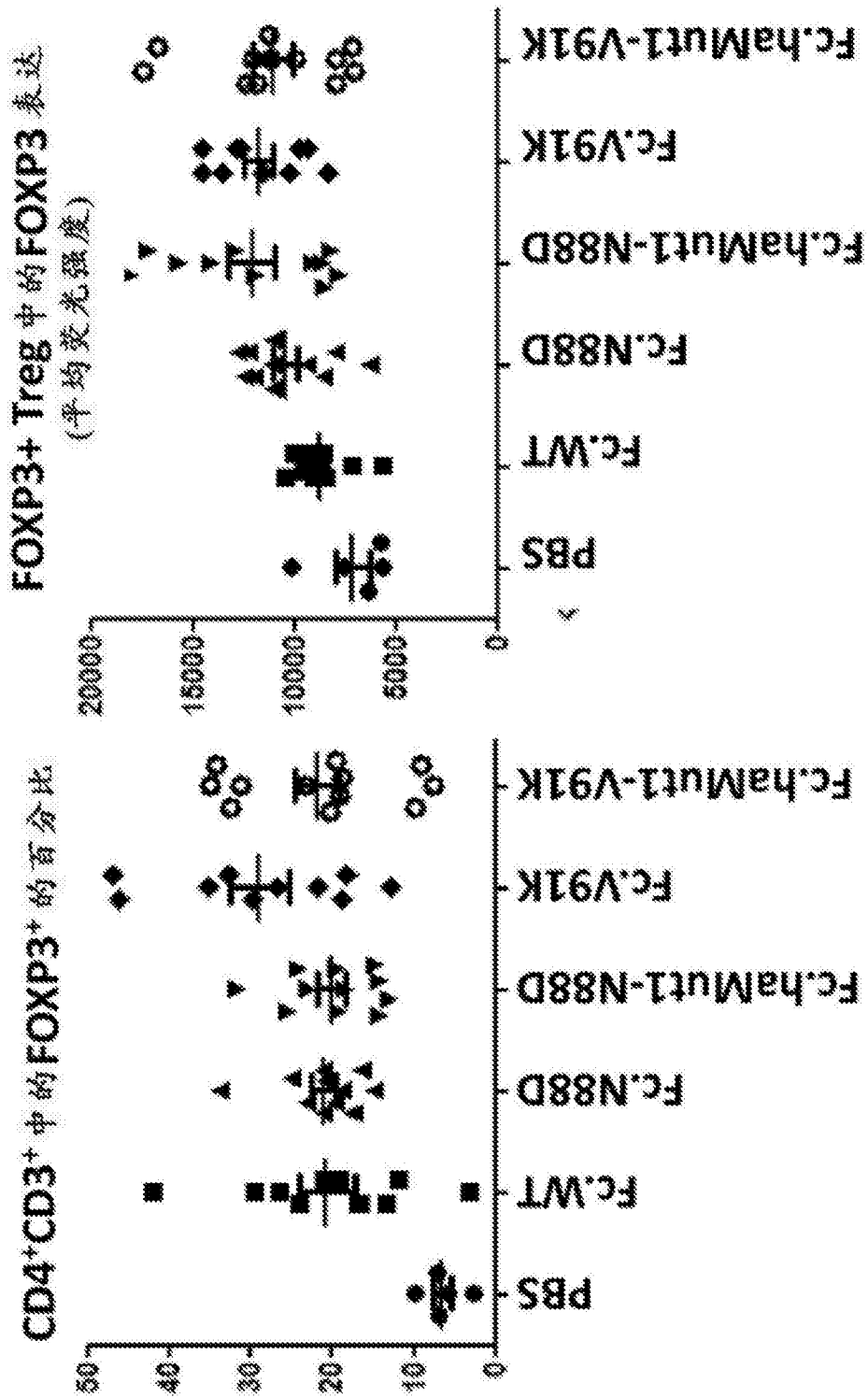


图 7A

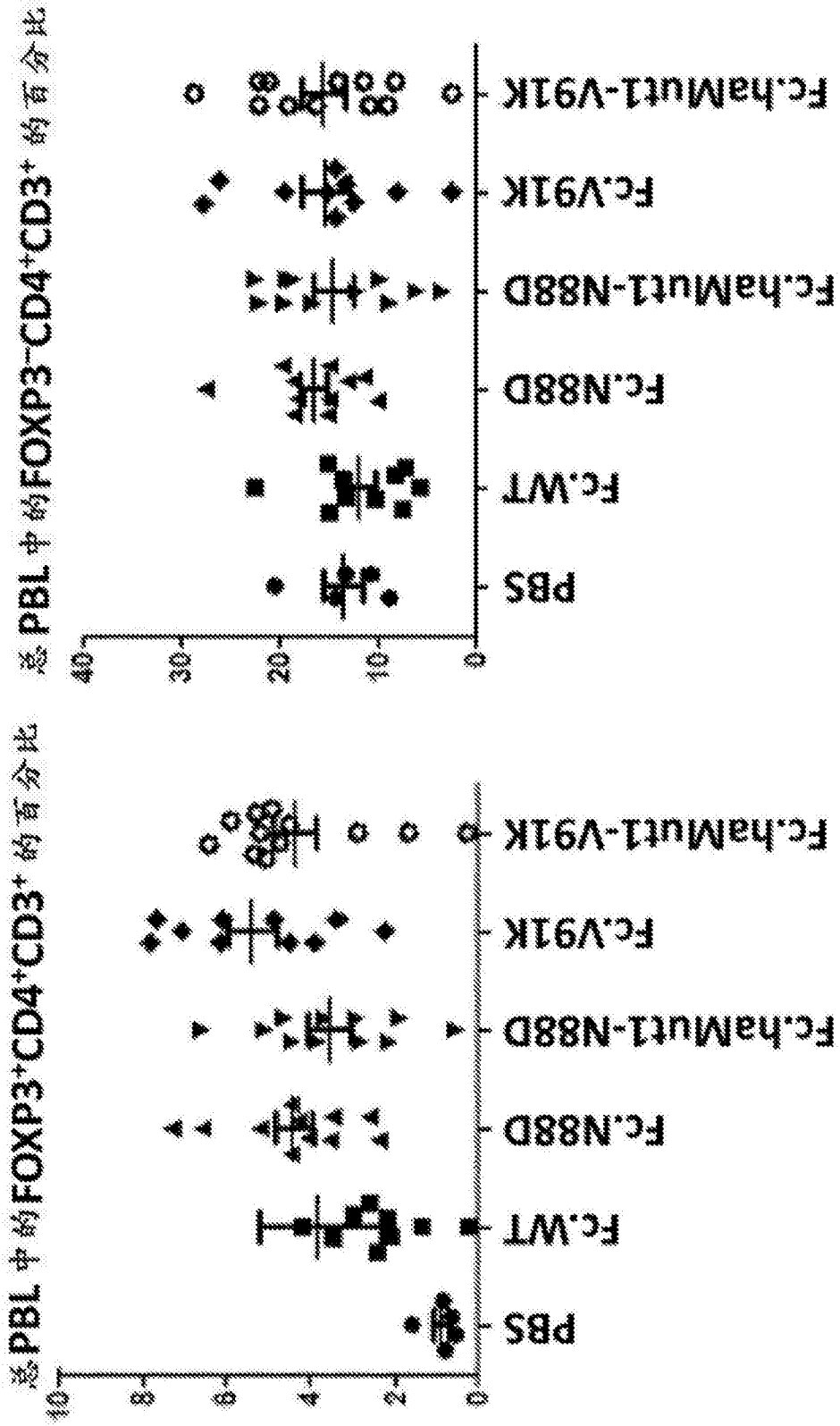


图 7B

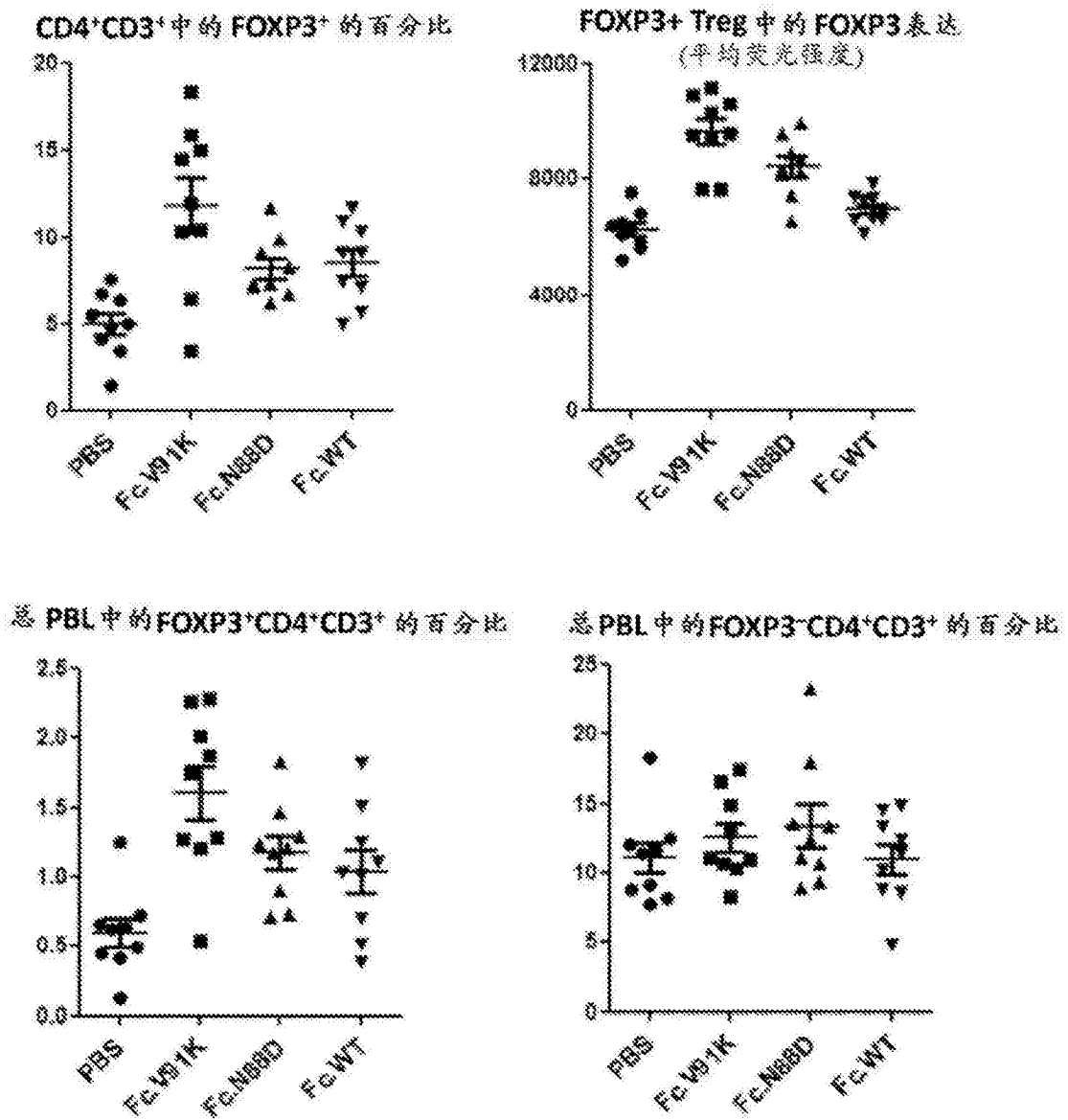


图 8

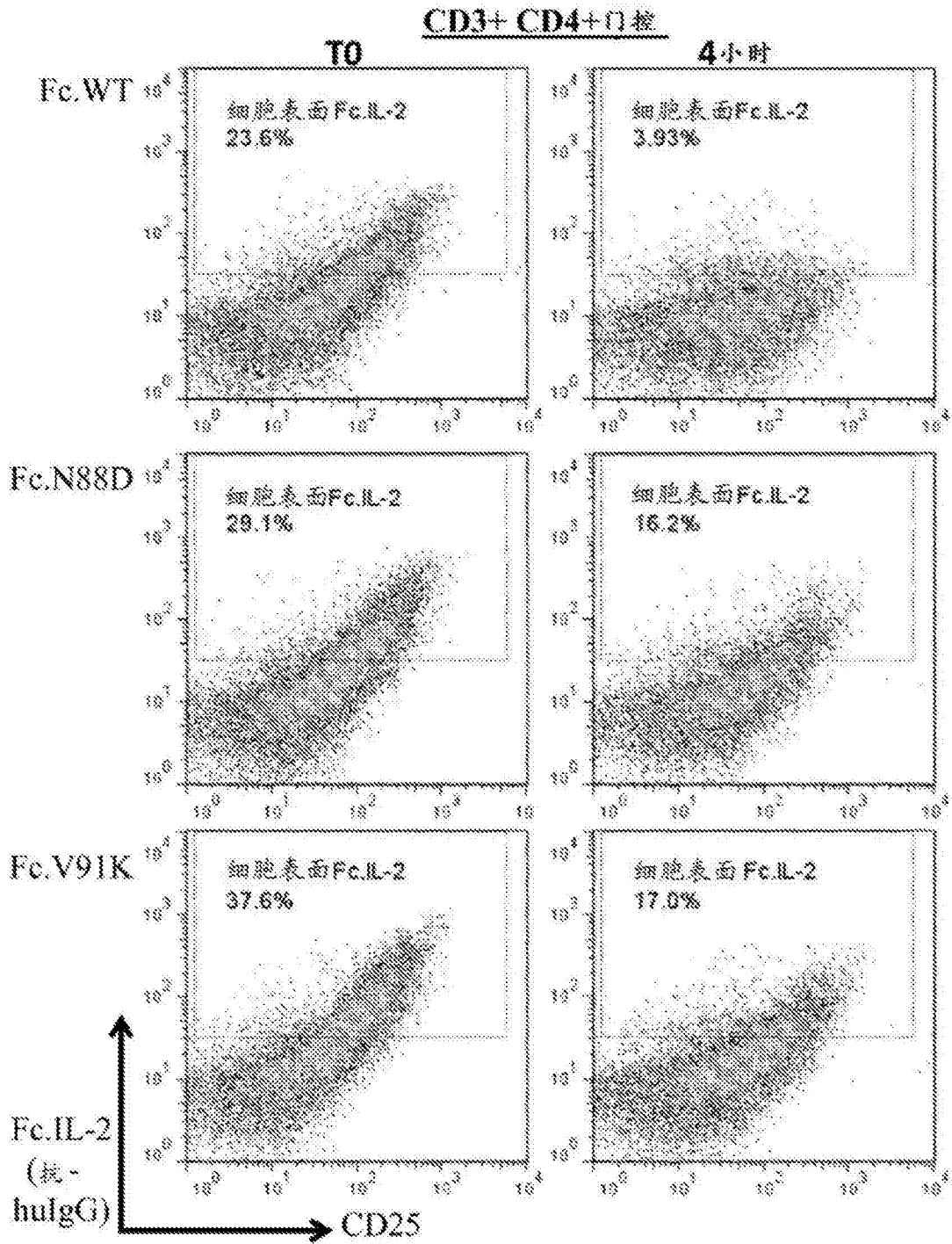


图 9A

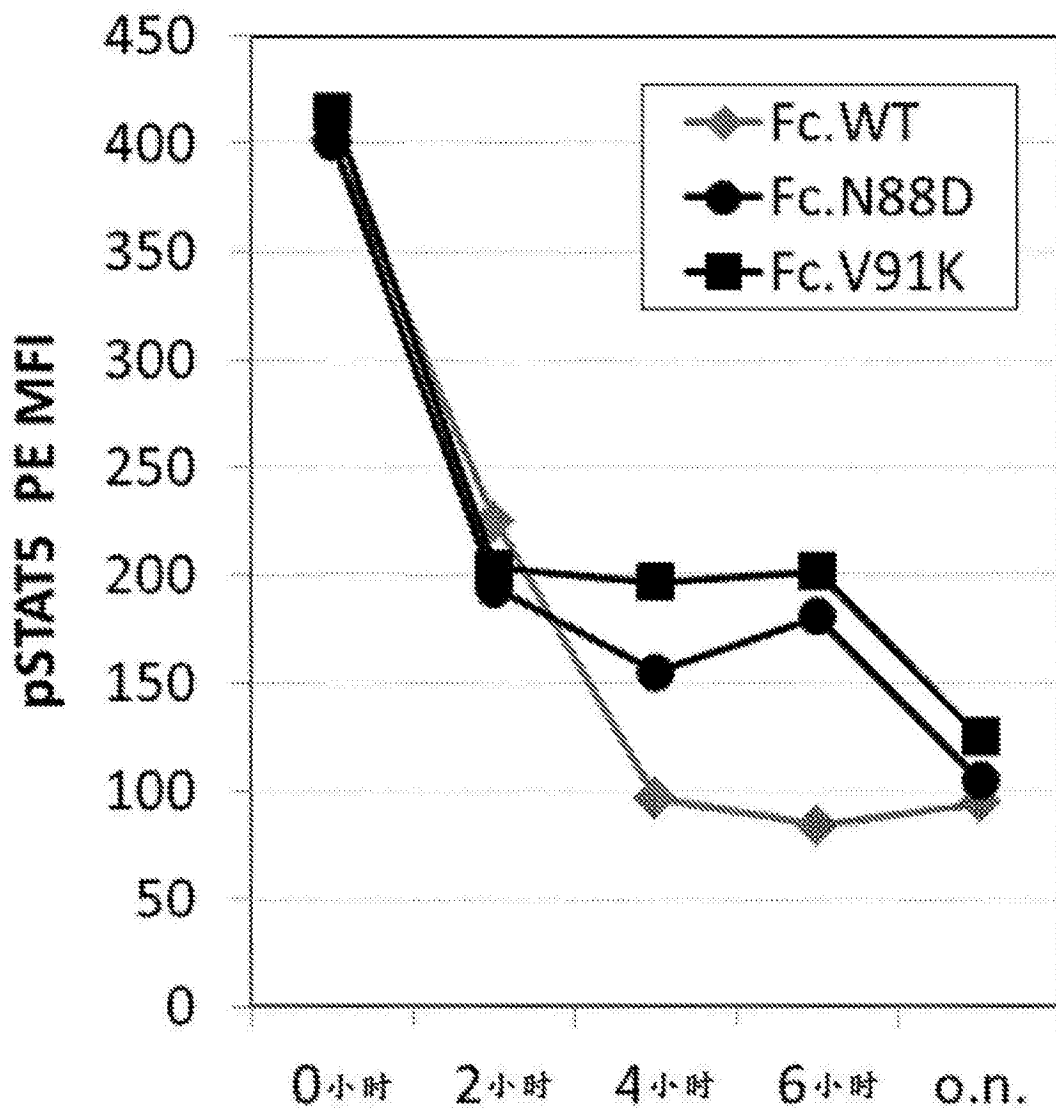


图 9B

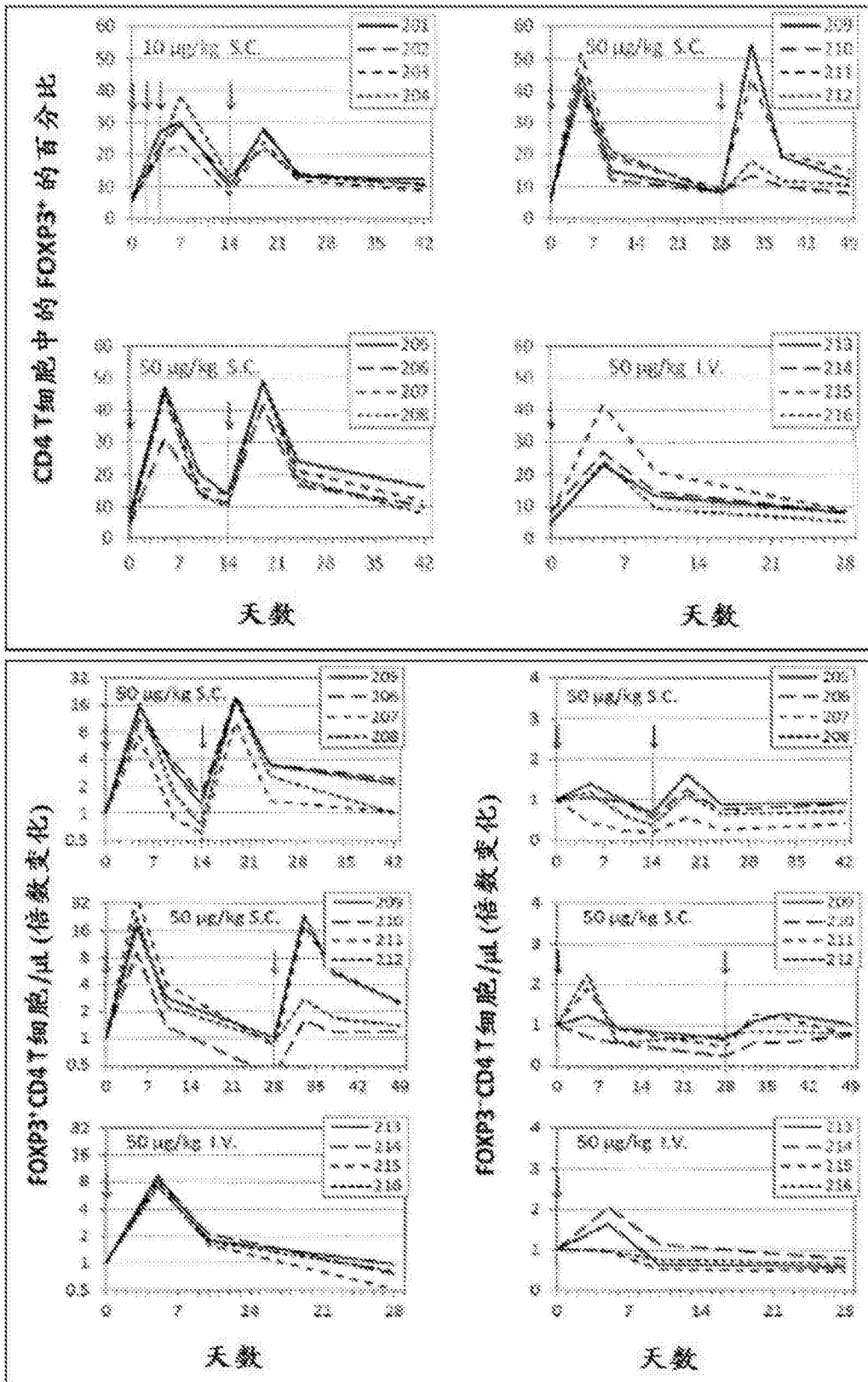


图 10A

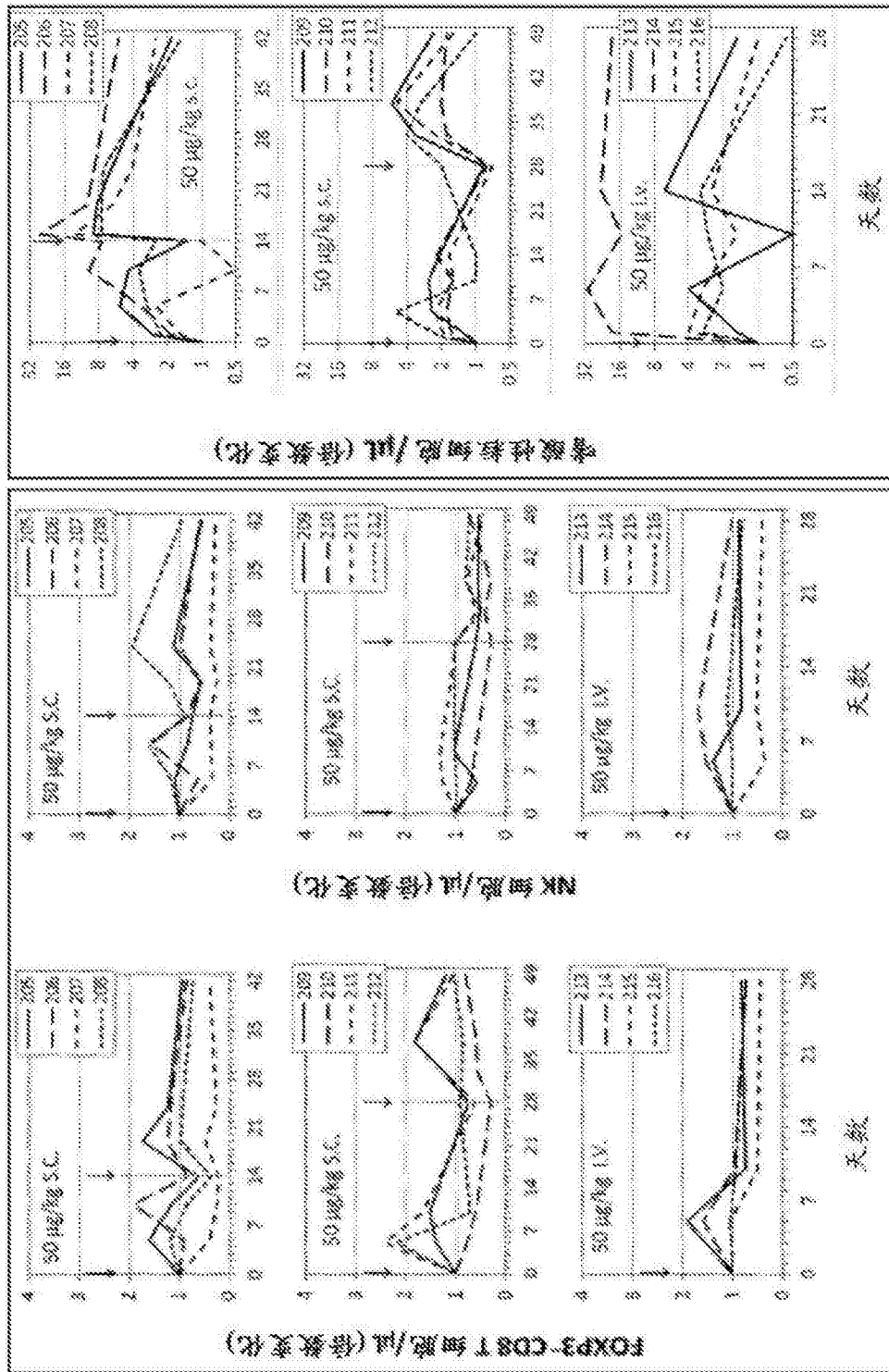


图 10B

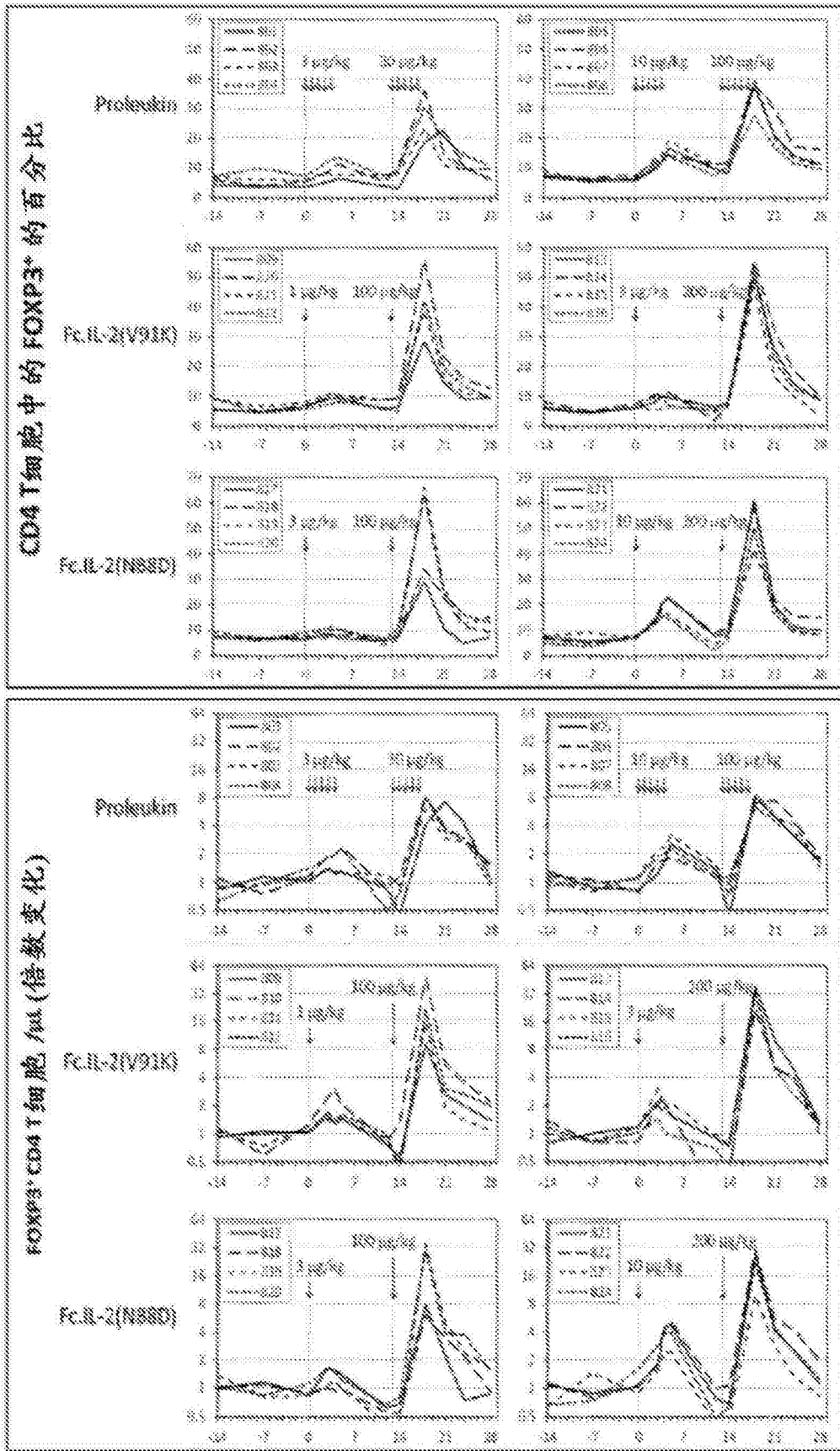


图 11A

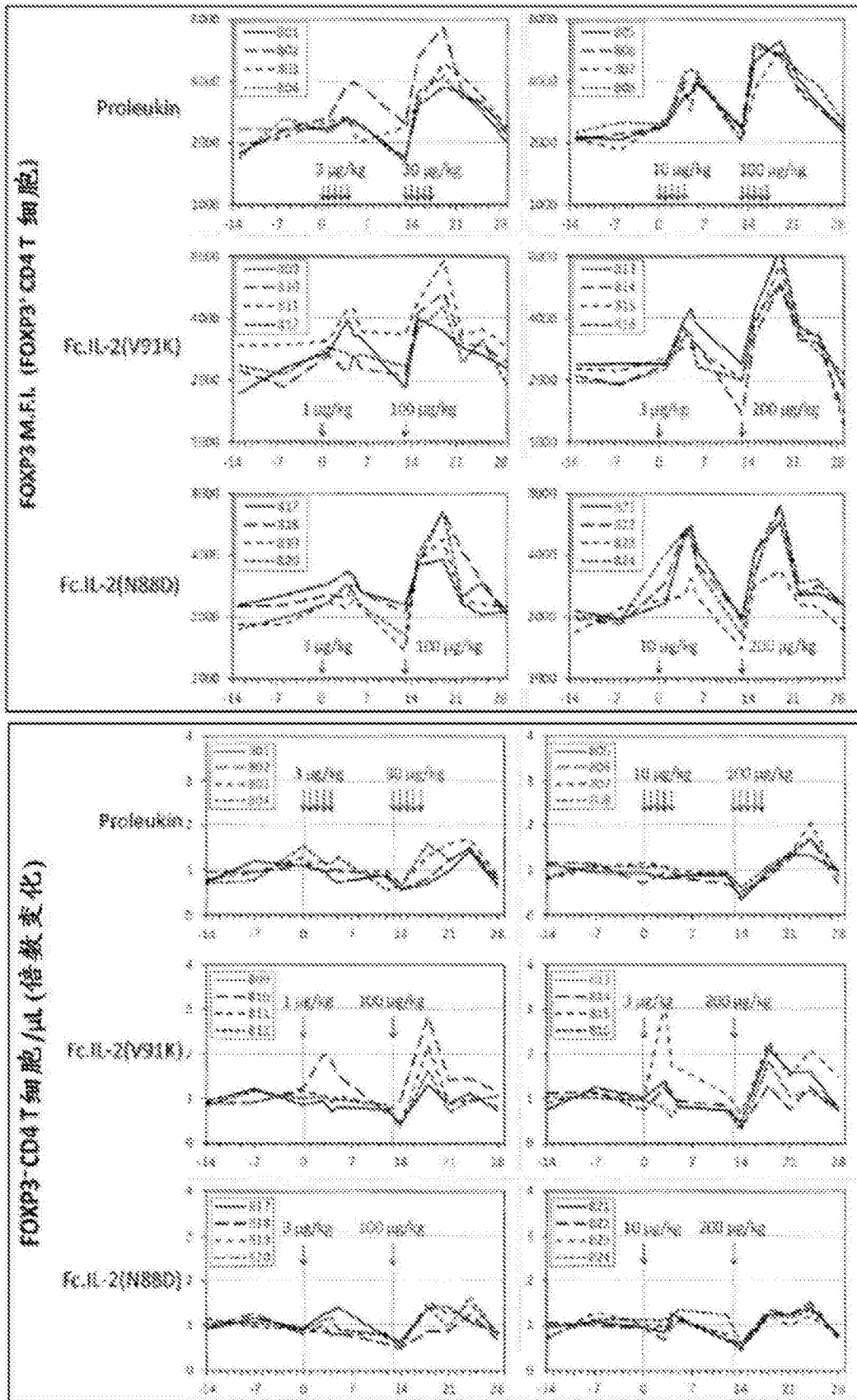


图 11B

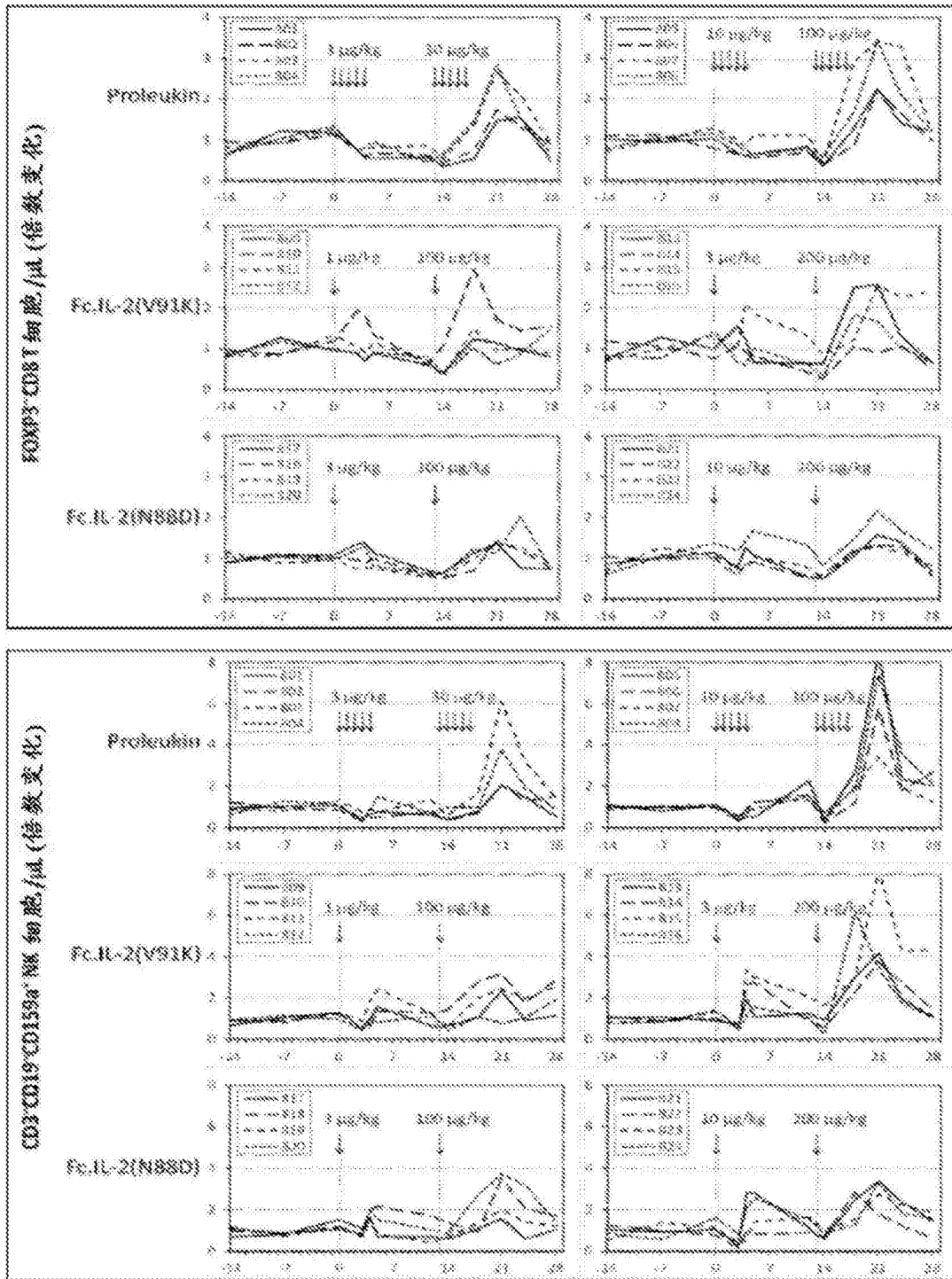


图 11C

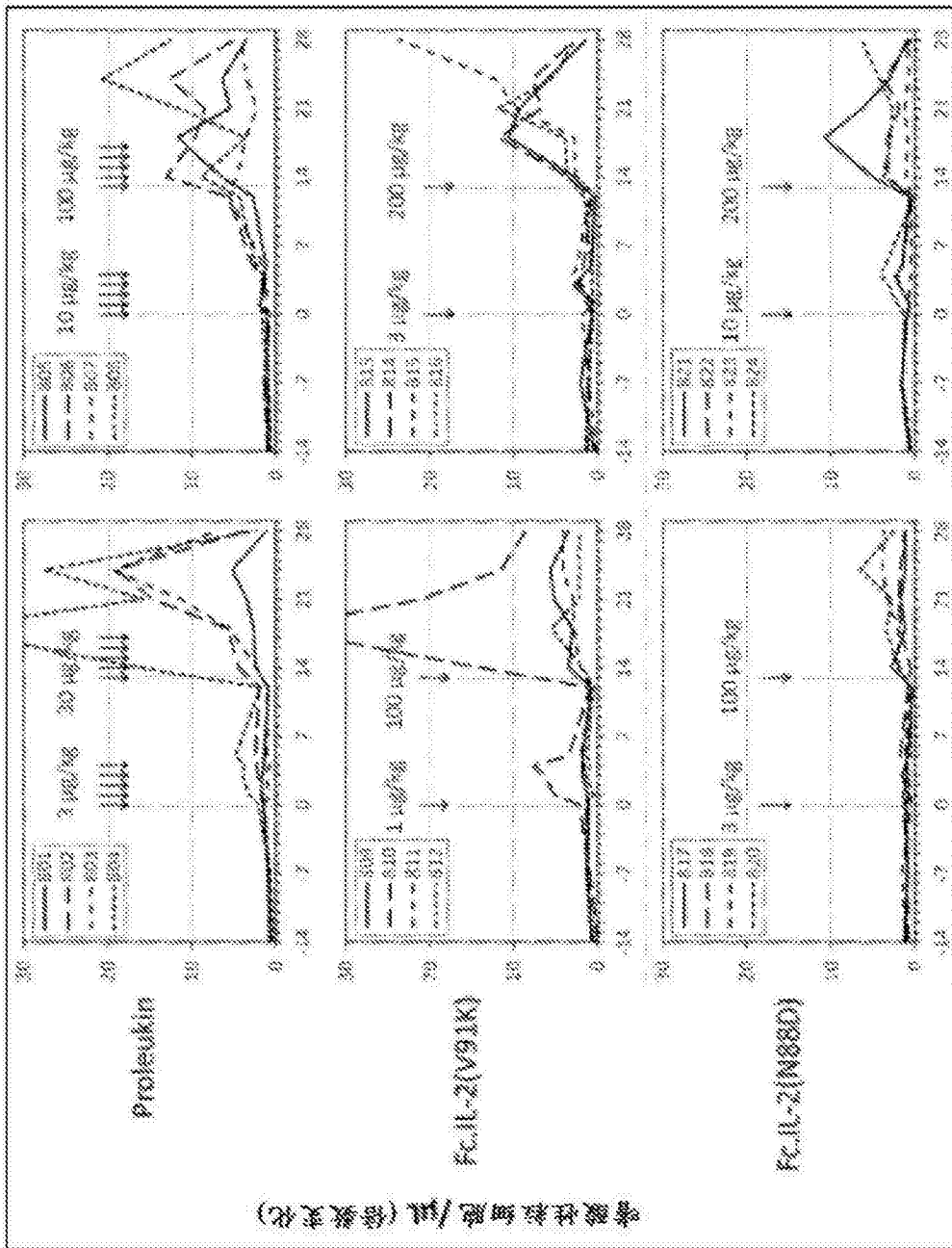


图 11D

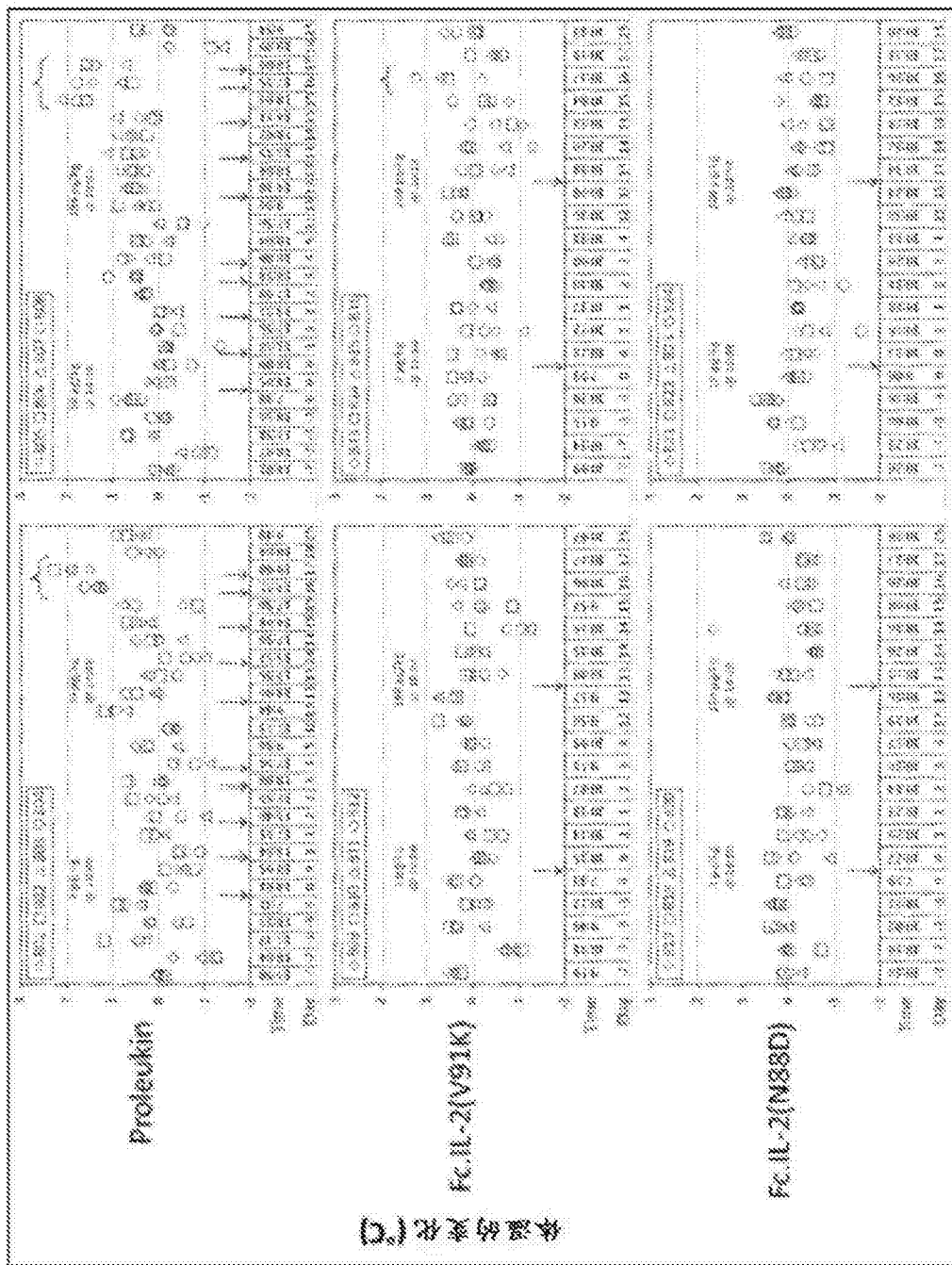


图 11E

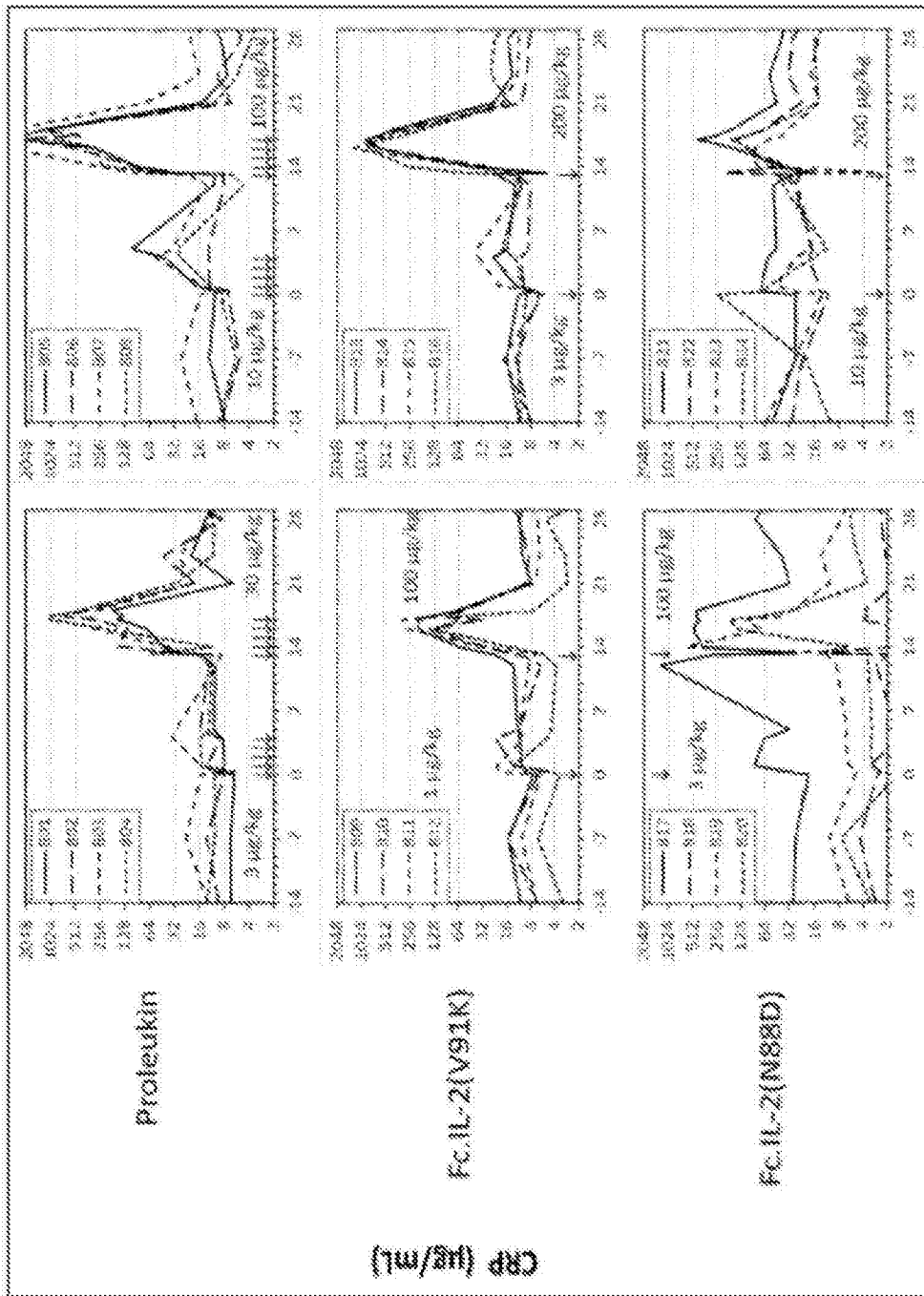


图 11F

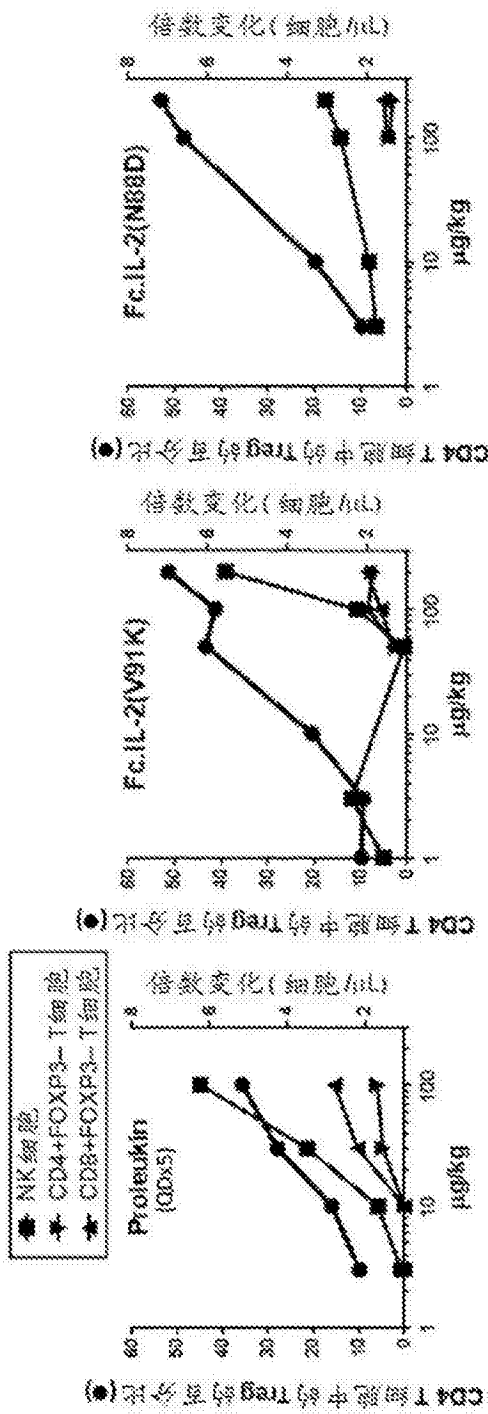


图 12A

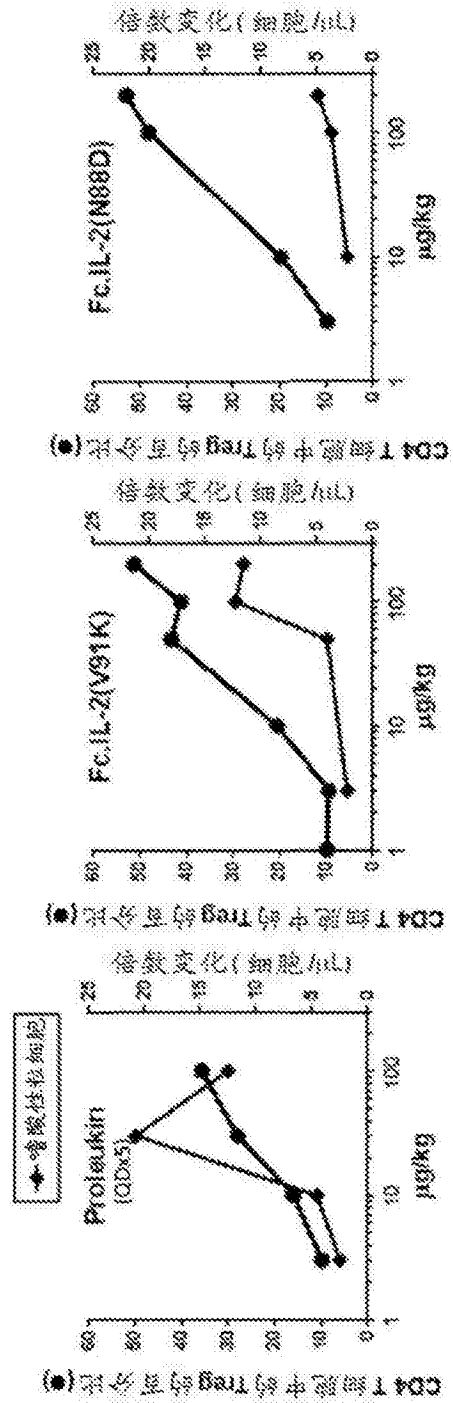


图 12B

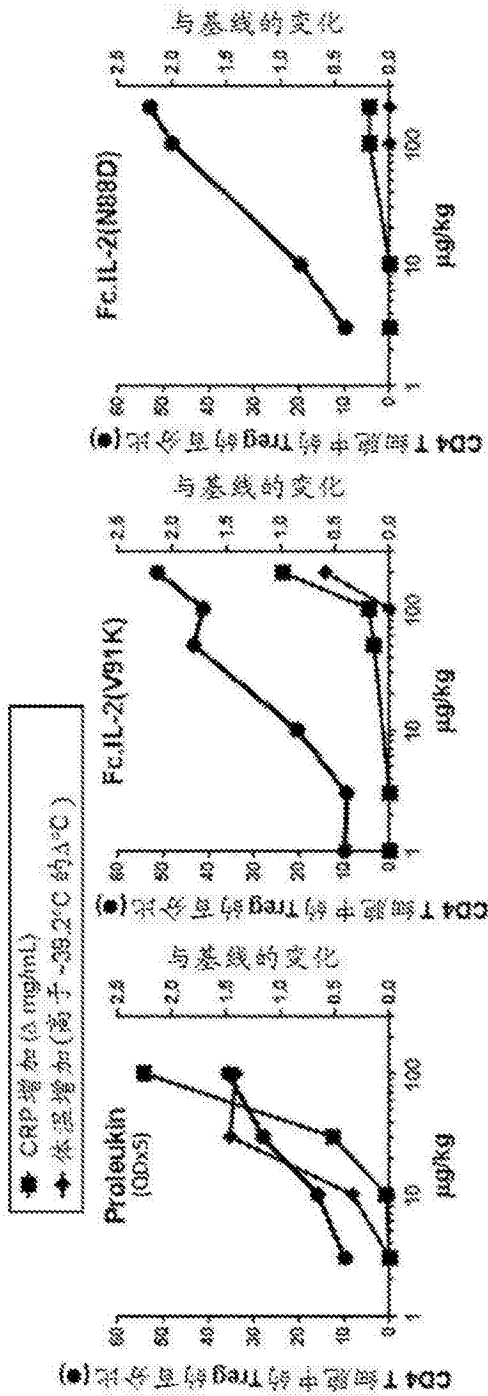


图 12C

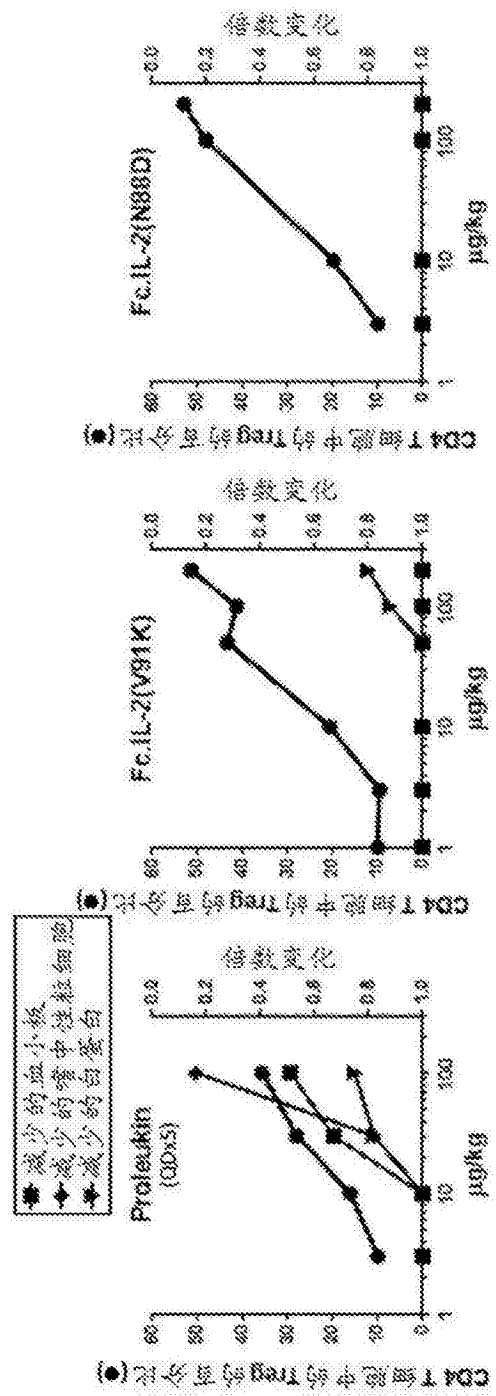


图 12D

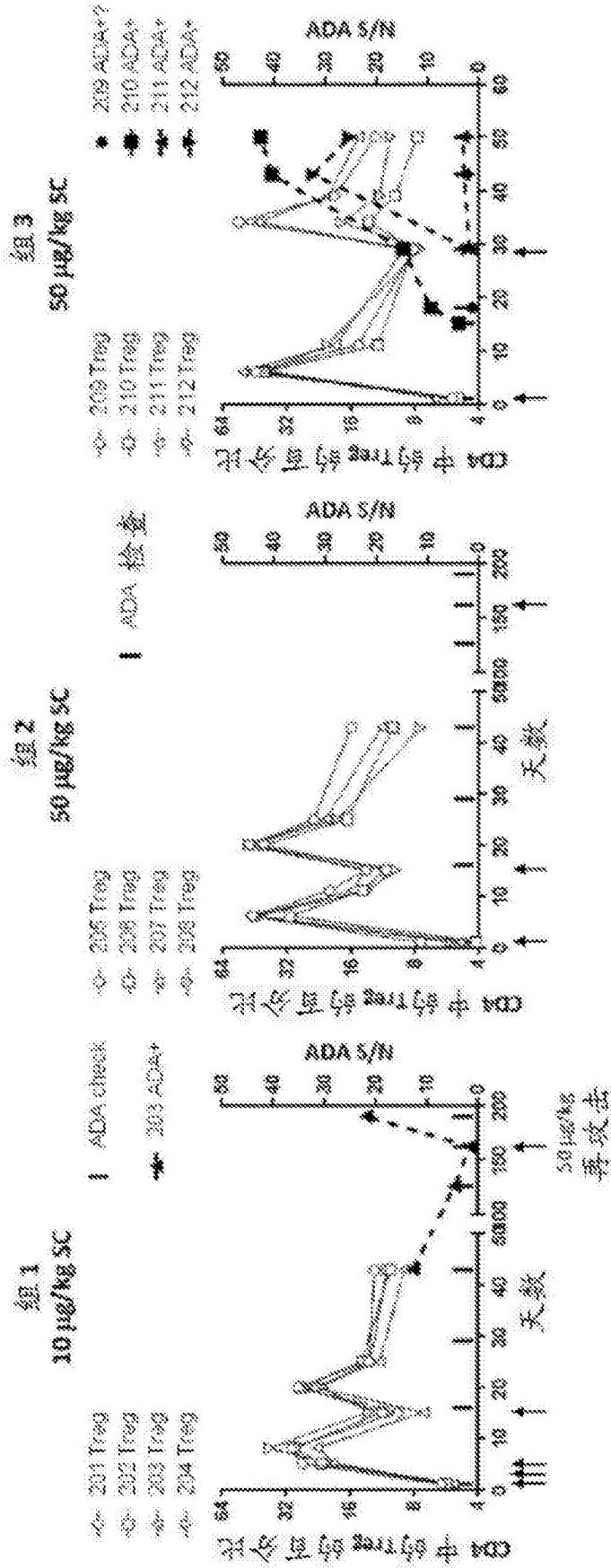


图 13