



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114867749 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 05

(21) 申请号 202080087668.8

(22) 申请日 2020.12.17

(30) 优先权数据

62/949,380 2019.12.17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/065734 2020.12.17

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/127262 EN 2021.06.24

(71) 申请人 安进公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 A·乔德瑞 W·欧阳

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

专利代理师 王思琪 王建秀

(51) Int.Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 14/55 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

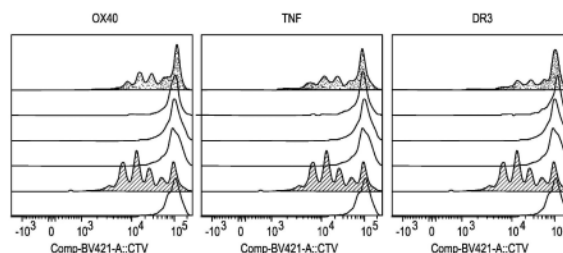
权利要求书3页 说明书28页 附图8页

(54) 发明名称

用于疗法中的双重白介素-2/TNF受体激动剂

(57) 摘要

本文提供了IL-2分子或突变蛋白与TNFR激动剂的组合,以及包含IL-2/TNFR激动剂分子的复合物,例如优先扩增和活化调节性T细胞并且易于大规模生产的Fc结合的IL-2/TNFR激动剂分子。本文还提供了制备和使用本披露的组合物的方法。



1. 一种人白介素-2 (IL-2) 嵌合分子,其包含人IL-2多肽和肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 激动剂,该多肽包含与SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,该激动剂选自由以下组成的组:抗OX40、抗DR3、和TNF。

2. 如权利要求1所述的人IL-2嵌合分子,其中该人IL-2多肽与SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列具有至少95%同一性。

3. 如上述权利要求中任一项所述的人IL-2嵌合分子,其中该人IL-2多肽是人IL-2多肽突变蛋白,其中所述IL-2突变蛋白具有选自以下的至少一个突变:V91K、N30S、N30D、Y31H、Y31S、K35R、V69A、Q74P、V91K/D20L、D84R/E61Q、V91K/D20A/E61Q/M104T、N88K/M104L、V91H/M104L、V91K/H16E/M104V、V91K/H16R/M104V、V91K/H16R/M104T、V91K/D20A/M104T、V91K/H16E/M104T、V91K/H16E/E61Q/M104T、V91K/H16R/E61Q/M104T、V91K/H16E、V91H/D20A/M104T、H16E/V91H/M104V、V91H/D20A/E61Q/M104T、V91H/H16R/E16Q、V91K/D20A/M104V、H16E/V91H、V91H/D20A/M104V、H16E/V91H/M104T、H16E/V91H/E61Q/M104T、V91K/E61Q/H16E、V91K/H16R/M104L、H16E/V91H/E16Q、V91K/E61Q/H16R、D20W/V91K/E61Q、V91H/H16R、V91K/H16R、D20W/V91K/E61Q/M104T、V91K/D20A、V91H/D20A/E16Q、V91K/D20A/M104L、V91H/D20A、V91K/E61Q/D20A、V91H/M104T、V91H/M104V、V91K/E61Q、V91K/N88K/E61Q/M104T、V91K/N88K/E61Q、V91H/E61Q、V91K/N88K、D20A/H16E/M104T、D20A/M104T、H16E/N88K、D20A/M104V、D20A/M104L、H16E/M104T、H16E/M104V、N88K/M104V、N88K/E61Q、D20A/E61Q、H16R/D20A、D20W/E61Q、H16E/E61Q、H16E/M104L、N88K/M104T、D20A/H16E、D20A/H16E/E16Q、D20A/H16R/E16Q、V91K/D20W、V91A/H16A、V91A/H16D、V91A/H16E、V91A/H16S、V91E/H16A、V91E/H16D、V91E/H16E、V91E/H16S、V91K/H16A、V91K/H16D、V91K/H16S、V91S/H16E、L12G、L12K、L12Q、L12S、Q13G、E15A、E15G、E15S、H16A、H16D、H16G、H16K、H16M、H16N、H16R、H16S、H16T、H16V、H16Y、L19A、L19D、L19E、L19G、L19N、L19R、L19S、L19T、L19V、D20A、D20E、D20F、D20G、D20T、D20W、M23R、N30S、Y31H、K35R、V69A、Q74P、R81A、R81G、R81S、R81T、D84A、D84E、D84G、D84I、D84M、D84Q、D84R、D84S、D84T、S87R、N88A、N88D、N88E、N88F、N88G、N88M、N88R、N88S、N88V、N88W、V91D、V91E、V91G、V91S、I92K、I92R、和/或E95G,并且优先刺激调节性T细胞。

4. 如权利要求3所述的人IL-2嵌合分子,其进一步包含:C125A处的取代。

5. 一种Fc融合蛋白,其包含Fc,一种人IL-2多肽,和肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 激动剂,该多肽包含与SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,该激动剂选自由以下组成的组:抗OX40、抗DR3、和TNF。

6. 如权利要求5所述的Fc融合蛋白,其中该抗OX40是抗OX40抗体,其中该抗OX40抗体具有SEQ ID NO:9的重链氨基酸序列、SEQ ID NO:10的轻链氨基酸序列,或SEQ ID NO:9的重链抗体序列和SEQ ID NO:10的轻链氨基酸序列两者。

7. 如权利要求5或6所述的Fc融合蛋白,其中该Fc是人IgG1 Fc。

8. 如权利要求7所述的Fc融合蛋白,其中该人IgG1 Fc包含改变所述Fc的效应子功能的一个或多个突变,其中该人IgG1包含N297G取代。

9. 如权利要求5-8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。

10. 如权利要求9所述的Fc融合蛋白,其中所述人IgG Fc的C末端赖氨酸缺失。

11. 如权利要求5-10中任一项所述的Fc融合蛋白,其中接头连接所述蛋白的Fc和人IL-

2多肽部分。

12. 如权利要求5-10中任一项所述的Fc融合蛋白,其中接头连接所述蛋白的Fc和肿瘤坏死因子受体(TNFR)激动剂部分。

13. 如权利要求11或12所述的Fc融合蛋白,其中该接头是GGGGS (SEQ ID NO:5)、GGNGT、或(SEQ ID NO:6)、和YGNGT (SEQ ID NO:7)。

14. 如权利要求5-13中任一项所述的Fc融合蛋白,其中第一接头连接所述蛋白的Fc和人IL-2多肽部分,并且第二接头连接所述蛋白的Fc和肿瘤坏死因子受体(TNFR)激动剂部分。

15. 如权利要求14所述的Fc融合蛋白,其中该第一接头是GGGGS (SEQ ID NO:5)、GGNGT或(SEQ ID NO:6)和YGNGT (SEQ ID NO:7),并且该第二接头是GGGGS (SEQ ID NO:5)、GGNGT或(SEQ ID NO:6)和YGNGT (SEQ ID NO:7)。

16. 如权利要求5-15中任一项所述的Fc融合蛋白,其中该IL-2嵌合分子进一步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,其中该改变糖基化的添加、取代或缺失是T3N、T3A或S5T取代。

17. 一种分离的核酸,其编码如权利要求1-4中任一项所述的人IL-2嵌合分子。

18. 一种分离的核酸,其编码如权利要求5-16中任一项所述的Fc融合蛋白。

19. 一种表达载体,其包含可操作地连接到启动子的如权利要求17或18所述的分离的核酸。

20. 一种宿主细胞,其包含如权利要求17-19中任一项所述的分离的核酸。

21. 一种制备人IL-2嵌合分子的方法,该方法包括在其中表达所述启动子的条件下培养如权利要求20所述的宿主细胞,并且从所述培养收获该人IL-2嵌合分子。

22. 一种制备Fc融合蛋白的方法,该方法包括在其中表达所述启动子的条件下培养如权利要求20所述的宿主细胞,并且从所述培养收获该Fc融合蛋白。

23. 一种增加T细胞的群体内或受试者的外周血内的调节性T细胞(Treg)与非调节性T细胞的比率的方法,该方法包括使该T细胞的群体与有效量的如权利要求1-4中任一项所述的人IL-2嵌合分子或如权利要求5-15中任一项所述的Fc融合蛋白接触。

24. 如权利要求23所述的方法,其中CD3⁺FoxP3⁺细胞与CD3⁺FoxP3⁻的比率增加。

25. 如权利要求24所述的方法,其中CD3⁺FoxP3⁺细胞与CD3⁺FoxP3⁻的比率增加至少50%。

26. 一种增加受试者的外周血内的调节性T细胞(Treg)与自然杀伤(NK)细胞的比率的方法,该方法包括使该T细胞的群体与有效量的如权利要求1-4中任一项所述的人IL-2嵌合分子或如权利要求5-15中任一项所述的Fc融合蛋白接触。

27. 如权利要求26所述的方法,其中CD3⁺FoxP3⁺细胞与表达CD56和/或CD16的CD3⁻CD19⁻淋巴细胞的比率增加。

28. 如权利要求27所述的方法,其中CD3⁺FoxP3⁺细胞与表达CD56和/或CD16的CD3⁻CD19⁻淋巴细胞的比率增加至少50%。

29. 一种治疗患有炎性疾病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如权利要求1-4中任一项所述的人IL-2嵌合分子或如权利要求5-15中任一项所述的Fc融合蛋白。

30. 如权利要求29所述的治疗患有炎性疾病或自身免疫性疾病的受试者的方法,其中施用引起该疾病的至少一个症状的减轻。

31. 如权利要求30所述的方法,其中在该施用后,受试者的外周血内调节性T细胞(Treg)与非调节性T细胞的比率增加。

32. 如权利要求30所述的方法,其中在该施用后,受试者的外周血内调节性T细胞(Treg)与非调节性T细胞的比率保持基本上相同。

33. 如权利要求29-32中任一项所述的方法,其中该炎性疾病或自身免疫性疾病是炎症、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、青少年关节炎、青少年类风湿关节炎、少关节型青少年类风湿关节炎、多关节型青少年类风湿关节炎、全身性发作青少年类风湿关节炎、青少年强直性脊柱炎、青少年肠病性关节炎、青少年反应性关节炎、青少年莱特尔氏综合征(juvenile Reiter's Syndrome)、SEA综合征(血清阴性、接骨点病变、关节病综合征)、青少年皮肌炎、青少年银屑病关节炎、青少年硬皮病、青少年系统性红斑狼疮、青少年血管炎、少关节型类风湿关节炎、多关节型类风湿关节炎、全身性发作类风湿关节炎、强直性脊柱炎、肠病性关节炎、反应性关节炎、莱特尔氏综合征(Reiter's Syndrome)、皮肌炎、银屑病关节炎、硬皮病、血管炎、肌炎、多发性肌炎、皮肌炎、结节性多动脉炎、韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、动脉炎、风湿性多肌痛、结节病、硬化、原发性胆道硬化症、硬化性胆管炎、舍格伦综合征、银屑病、斑块状银屑病、滴状牛皮癣、皮褶牛皮癣、脓疱性银屑病、红皮性银屑病、皮炎、特应性皮炎、动脉粥样硬化、狼疮、斯提耳氏病(Still's disease)、系统性红斑狼疮(SLE)、重症肌无力、炎症性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、乳糜泻、多发性硬化(MS)、哮喘、COPD、鼻窦炎、具有息肉的鼻窦炎、嗜酸性食管炎、嗜酸性支气管炎、格林-巴利病(Guillain-Barre disease)、I型糖尿病、甲状腺炎(例如格雷夫斯氏病(Graves'disease))、艾迪生病(Addison's disease)、雷诺现象(Raynaud's phenomenon)、自身免疫性肝炎、GVHD、移植排斥、肾损伤、丙型肝炎诱导的血管炎或自发性妊娠丢失。

34. 如权利要求29-32中任一项所述的方法,其中该炎性疾病或自身免疫性疾病是系统性红斑狼疮(SLE)、移植物抗宿主疾病、丙型肝炎诱导的血管炎、I型糖尿病、类风湿性关节炎、多发性硬化、自发性妊娠丢失、特应性疾病和炎症性肠病,包括溃疡性结肠炎、乳糜泻。

35. 如权利要求29-32中任一项所述的方法,其中该炎性疾病或自身免疫性疾病是狼疮、移植物抗宿主疾病、丙型肝炎诱导的血管炎、I型糖尿病、II型糖尿病、多发性硬化、类风湿关节炎、斑秃、动脉粥样硬化、银屑病、器官移植排斥、舍格伦综合征、白塞病、自发性妊娠丢失、特应性疾病、哮喘、或炎症性肠病。

用于疗法中的双重白介素-2/TNF受体激动剂

背景技术

[0001] 调节性T (Treg) 细胞由转录因子Foxp3的表达所指定,是CD4 T细胞的一个子集,专门用于抑制先天性和适应性免疫细胞的活化和反应。Foxp3基因的缺失或功能缺失突变导致人类和小鼠两者中的早发性自身免疫性疾病,称为IPEX (X连锁多内分泌腺病肠病伴免疫失调综合征),表现为多器官受累,并且通常是致命的。Foxp3缺陷型动物中不同类型炎症反应的自发失调表明,需要Treg细胞来维持正常的免疫稳态。几种人类自身免疫性疾病,例如I型糖尿病 (T1D)、多发性硬化 (MS) 和系统性红斑狼疮 (SLE),在从外周血分离的Treg细胞的数量或抑制功能方面存在缺陷。由于Treg细胞可以按主导方式影响免疫反应,因此在自身免疫过程中积极靶向其数量、功能或稳定性是一种有吸引力的治疗方法。

[0002] Treg细胞的维持严重依赖于两条主要信号传导途径:T细胞受体 (TCR) 和IL-2受体信号传导,并且在缺乏这些信号传导途径的情况下,Treg细胞稳态和功能严重受损。与其他细胞相比,Treg细胞表达的高亲和力IL-2受体亚基 (IL-2R α , CD25) 水平升高。基于IL-2是Treg细胞分化、存活和功能的关键细胞因子这一观点,许多研究试图确定此途径的选择性靶向是否具有治疗潜力。针对治疗几种炎性疾病,例如慢性移植物抗宿主病 (GVHD)、T1D以及SLE,已经在临床上评估了低剂量IL-2,并且已显示可增加Treg细胞数量,同时降低疾病活性。因此,需要增加Treg数量的改善方法。

发明内容

[0003] 本文描述了人白介素-2 (IL-2) 嵌合分子,其包含人IL-2多肽和肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 激动剂,该多肽包含与SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,该激动剂选自由以下组成的组:易于高产量制造并具有药理活性的抗OX40、抗DR3、和TNF复合物。努力产生此类用作人治疗剂的分子,发生了许多出乎意料并且不可预知的观察结果。从所述努力产生了本文描述的组合物和方法。

[0004] 在一些实施例中,本发明是Fc融合蛋白,其包含Fc (一种人IL-2多肽) 和肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 激动剂,所述多肽包含与SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,该激动剂选自由以下组成的组:抗OX40、抗DR3、和TNF。

[0005] 在一些实施例中,本发明是一种治疗患有炎性疾病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人白介素-2 (IL-2) 嵌合分子,该嵌合分子包含人IL-2多肽和肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 激动剂,该多肽包含与SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,该激动剂选自由以下组成的组:抗OX40、抗DR3、和TNF复合物,或施用治疗有效量的Fc融合蛋白,该融合蛋白包含Fc (一种人IL-2多肽) 和肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 激动剂,该多肽包含与SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列具有至少70%同一性的氨基酸序列,该激动剂选自由以下组成的组:抗OX40、抗DR3、和TNF。

附图说明

[0006] 图1显示了IL-2与TNFR激动剂(抗OX40、重组TNF或抗DR3)组合刺激后,Treg的增殖。(A)用指示试剂刺激细胞微量紫(Cell Trace Violet,CTV)标记的人PBMC持续4天,随后进行流式细胞术分析。直方图按以下顺序排列(从下到上):未刺激,用1 μ g/ml抗CD3、20U/ml IL-2、IgG、TNFR激动剂(抗OX40、重组TNF、抗DR3)、TNFR激动剂加IL-2刺激。对Treg细胞(CD4+Foxp3+)进行直方图门控。只有阳性对照抗CD3图和TNFR激动剂的组合(抗OX40、重组TNF和抗DR3)显示出Treg的增殖。

[0007] 图2显示了PBMC上抗OX40和IL-2的直方图。(A)用指定滴定剂量的抗OX40(克隆15A9)刺激CTV标记的人PBMC持续4天,随后进行流式细胞术分析。对Treg细胞(CD4+Foxp3+)进行直方图门控。用CD3刺激的细胞显示出强劲的增殖,并且充当测定的阳性对照。用IL2或对照IgG刺激不会导致任何CTV稀释。单独使用任何指定剂量的抗OX40均未观察到增殖。然而,如CTV稀释所示,使用抗OX40和IL2的组合刺激可以导致Treg细胞增殖。(B)来自(A)的数据总结。图显示了每种情况下,来自一个供体的三个重复。还评估了T细胞对这些刺激的反应,并且在更高剂量的抗OX40/IL2治疗下,仅观察到非常低水平的T细胞增殖。

[0008] 图3显示了PBMC上TNF和IL-2的直方图。(A)用指定滴定剂量的TNF刺激CTV标记的人PBMC持续4天,随后进行流式细胞术分析。对Treg细胞(CD4+Foxp3+)进行直方图门控。单独使用任何指定剂量的TNF均未观察到增殖。然而,如CTV稀释所示,使用TNF和IL2的组合刺激可以导致Treg细胞增殖。(B)来自(A)的数据总结。图显示了每种情况下,来自一个供体的三个重复。还评估了T细胞对这些刺激的反应,并且在所有剂量的TNF/IL2治疗下,仅观察到非常低水平的T细胞增殖。

[0009] 图4显示了PBMC上抗DR3和IL-2的直方图。(A)用指定滴定剂量的抗DR3刺激CTV标记的人PBMC持续4天,随后进行流式细胞术分析。对Treg细胞(CD4+Foxp3+)进行直方图门控。单独使用任何指定剂量的抗DR3均未观察到增殖。然而,用抗DR3和IL2的组合刺激可以导致Treg细胞增殖。(B)来自(A)的数据总结。图显示了每种情况下,来自一个供体的三个重复。还评估了T细胞对这些刺激的反应,并且在所有剂量的抗DR3/IL2治疗下,仅观察到非常低水平的T细胞增殖。

[0010] 图5显示了PBMC上抗GITR和IL-2的直方图。(A)用指定滴定剂量的抗GITR刺激CTV标记的人PBMC持续4天,随后进行流式细胞术分析。对Treg细胞(CD4+Foxp3+)进行直方图门控。单独使用抗GITR观察到非常低水平的增殖。然而,用抗GITR和IL2的组合刺激导致更明显的Treg细胞增殖。(B)来自(A)的数据总结。图显示了每种情况下,来自一个供体的三个重复。还评估了T细胞对这些刺激的反应,并且在所有剂量的抗GITR/IL2治疗下,仅观察到适度水平的T细胞增殖。

[0011] 图6显示了几种不同形式的嵌合OX-40抗体和IL-2分子的图。

[0012] 图7显示了使用与IL-2分子结合的OX-40抗体进行的小鼠体内研究,从而测量在第4天和第15天时测量的Treg、活化的CD4+和CD8+T细胞以及NK细胞的水平。研究显示了单独施用IL-2、单独施用抗OX-40或施用嵌合分子,以及施用对照的小鼠。

具体实施方式

[0013] 本文中所使用的部分标题仅出于组织目的,而不应被视为限制所描述的主题内

容。在本说明书正文中引用的所有参考文献都通过引用以其全文明确地并入。

[0014] 标准技术可以用于重组DNA、寡核苷酸合成、组织培养和转化、蛋白质纯化等。酶促反应和纯化技术可以根据制造商的说明书进行或按照本领域常规实现的或如本文所描述的的进行。以下程序和技术可以总体上是根据本领域中众所周知的常规方法并且如本说明书全篇所引用并且论述的不同通用和更特定的参考文献中所描述的来进行。参见例如 Sambrook等人,2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],纽约,出于任何目的将其通过引用并入本文。除非提供具体定义,否则与在此所述的分析化学、有机化学以及医学和药物化学相关所使用的命名以及实验室过程和技术是本领域熟知的和通常使用的那些。标准技术可以用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。

[0015] IL-2结合三种跨膜受体亚基:当IL-2结合后一起活化细胞内信号传导事件的IL-2R β 和IL-2R γ ,和用于稳定IL-2和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通路中的那些。

[0016] T细胞需要表达CD25以响应于典型存在于组织中的低浓度的IL-2。表达CD25的T细胞包括对于抑制自身免疫性炎症而言是必需的FOXP3+调节性T细胞(Treg细胞),和已经活化以表达CD25的FOXP3-T细胞二者。FOXP3-CD25+效应T细胞(Teff)可以是CD4+或CD8+细胞,二者都可能有助于炎症、自身免疫性疾病、器官移植排斥、或移植物抗宿主疾病。IL-2刺激的STAT5信号传导对于正常T-reg细胞生长和存活,以及对于高FOXP3表达而言是关键的。

[0017] 在稳定状态下,与其他免疫细胞相比,已经发现Treg细胞也表达更高表面水平的几种TNF(肿瘤坏死因子)受体家族成员,最值得注意的是TNFR2、OX40、GITR、4-1BB、CD30和DR3。这些TNF受体,特别是OX40、GITR和TNFR2在Treg细胞上的表达与TCR信号传导的强度直接相关,并且已经显示,这些受体通过增加对IL-2的敏感性以及提供共刺激信号来增强胸腺中Treg细胞的发育。IL-2信号传导也影响这些TNFR的表达。在这里,我们已经发现了这两种途径之间的协同作用。

[0018] TNFR信号传导在外周Treg细胞中的影响不太清楚,因为它的调节导致了多种效应。例如,OX40与Treg细胞的接合导致Foxp3表达缺失和Treg细胞功能降低,而TNFR2信号传导与维持Treg细胞数量和功能有关。本发明显示,将TNFR的激动剂(例如TNFR2、GITR、OX40和DR3)与IL-2刺激组合增加了Treg细胞增殖。由于在感知炎症信号后抗原呈递细胞通常上调TNFR配体的表达,并且活化后T细胞分泌IL-2,因此它们可能在炎症期间协同驱动强劲的Treg细胞扩增。本发明的一些实施例是,可以用于Treg细胞扩增的选择性试剂的TNFR激动剂和IL-2之间的嵌合融合分子。在一些实施例中,嵌合分子与Fc分子结合。在一些实施例中,本发明是通过共同施用TNFR激动剂和IL-2分子或突变蛋白来增加Treg的一种方法。

[0019] IL-2

[0020] 本文描述的IL-2分子包括野生型人IL-2和野生型人IL-2的变体。如本文所用,“野生型人IL-2”、“野生型IL-2”、或“WT IL-2”将意指具有以下氨基酸序列的多肽:

[0021] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNF
HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSISTLT

[0022] 其中X是C、S、V、或A(SEQ ID NO:1)。

[0023] 变体可以含有野生型IL-2氨基酸序列内的一个或多个取代、缺失或插入,并且包

括WO 2010085495、WO 2014153111、WO 2016164937、PCT/US 2020/046202、WO 1999060128、WO 2002000243、WO 2012107417、WO 2005086798、WO 2005086751和WO 2006089064中所述的IL-2突变蛋白变体,这些专利均通过援引以其全文特此并入。IL-2突变蛋白的一个实例含有具有以下氨基酸序列的突变V91K:

[0024] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNF
HLRPRDLISNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT

[0025] 其中X是C、S、V、或A (SEQ ID NO:2)。

[0026] 残基在本文被指定为IL-2氨基酸位置之前的一个字母的氨基酸编码,例如K35是在SEQ ID NO:2的位置35处的赖氨酸残基。取代在本文被指定为取代一个字母的氨基酸编码之前的IL-2氨基酸位置之前的一个字母的氨基酸编码,例如K35A是在SEQ ID NO:2的位置35处用丙氨酸残基取代赖氨酸残基。

[0027] IL-2突变蛋白

[0028] 本文提供了与TNFR激动剂组合,优先刺激调节性T (Treg) 细胞的人IL-2分子和突变蛋白。如本文所用,“优先刺激调节性T细胞”意指突变蛋白或抗体超过CD3+FoxP3-T细胞地促进CD3+FoxP3+T细胞的增殖、存活、活化和/或功能。测量优先刺激Treg的能力的方法可以通过外周血白细胞的流式细胞术进行测量,其中存在总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、相对于NK细胞的FOXP3+T细胞的百分比的增加、和/或FOXP3+T细胞的表面上的CD25的表达水平相对于其他T细胞上的CD25表达的增加的更大增加。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) 产物的测序所检测,还可以将Treg细胞的优先生长检测为相对于从全血提取的DNA中去甲基化的CD3基因,去甲基化的FOXP3启动子DNA (即Treg特异性去甲基化区、或TSDR) 的增加的表示 (J. Sehouli等人,2011,Epigenetics [表观遗传学] 6:2, 236-246)。

[0029] 与TNFR激动剂组合,优先刺激Treg细胞的IL-2分子和突变蛋白将受试者中或外周血样品中CD3+FoxP3+T细胞相对于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%。

[0030] IL-2突变蛋白的实例包括但不限于IL-2突变蛋白,其包含SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列中的V91K、N30S、N30D、Y31H、Y31S、K35R、V69A、Q74P、V91K/D20L、D84R/E61Q、V91K/D20A/E61Q/M104T、N88K/M104L、V91H/M104L、V91K/H16E/M104V、V91K/H16R/M104V、V91K/H16R/M104T、V91K/D20A/M104T、V91K/H16E/M104T、V91K/H16E/E61Q/M104T、V91K/H16R/E61Q/M104T、V91K/H16E、V91H/D20A/M104T、H16E/V91H/M104V、V91H/D20A/E61Q/M104T、V91H/H16R/E16Q、V91K/D20A/M104V、H16E/V91H、V91H/D20A/M104V、H16E/V91H/M104T、H16E/V91H/E61Q/M104T、V91K/E61Q/H16E、V91K/H16R/M104L、H16E/V91H/E16Q、V91K/E61Q/H16R、D20W/V91K/E61Q、V91H/H16R、V91K/H16R、D20W/V91K/E61Q/M104T、V91K/D20A、V91H/D20A/E16Q、V91K/D20A/M104L、V91H/D20A、V91K/E61Q/D20A、V91H/M104T、V91H/M104V、V91K/E61Q、V91K/N88K/E61Q/M104T、V91K/N88K/E61Q、V91H/E61Q、V91K/N88K、D20A/H16E/M104T、D20A/M104T、H16E/N88K、D20A/M104V、D20A/M104L、H16E/M104T、H16E/M104V、N88K/M104V、N88K/E61Q、D20A/E61Q、H16R/D20A、D20W/E61Q、H16E/E61Q、H16E/M104L、N88K/

M104T、D20A/H16E、D20A/H16E/E16Q、D20A/H16R/E16Q、V91K/D20W、V91A/H16A、V91A/H16D、V91A/H16E、V91A/H16S、V91E/H16A、V91E/H16D、V91E/H16E、V91E/H16S、V91K/H16A、V91K/H16D、V91K/H16S、V91S/H16E、L12G、L12K、L12Q、L12S、Q13G、E15A、E15G、E15S、H16A、H16D、H16G、H16K、H16M、H16N、H16R、H16S、H16T、H16V、H16Y、L19A、L19D、L19E、L19G、L19N、L19R、L19S、L19T、L19V、D20A、D20E、D20F、D20G、D20T、D20W、M23R、N30S、Y31H、K35R、V69A、Q74P、R81A、R81G、R81S、R81T、D84A、D84E、D84G、D84I、D84M、D84Q、D84R、D84S、D84T、S87R、N88A、N88D、N88E、N88F、N88G、N88M、N88R、N88S、N88V、N88W、V91D、V91E、V91G、V91S、I92K、I92R、和/或E95G取代。本发明的IL-2分子和突变蛋白任选地包含C125A取代。尽管减少野生型IL-2序列的另外的突变数量可能是有利的，但是本发明包括IL-2突变蛋白，该突变蛋白除了V91K、N30S、N30D、Y31H、Y31S、K35R、V69A、Q74P、V91K/D20L、D84R/E61Q、V91K/D20A/E61Q/M104T、N88K/M104L、V91H/M104L、V91K/H16E/M104V、V91K/H16R/M104V、V91K/H16R/M104T、V91K/D20A/M104T、V91K/H16E/M104T、V91K/H16E/E61Q/M104T、V91K/H16R/E61Q/M104T、V91K/H16E、V91H/D20A/M104T、H16E/V91H/M104V、V91H/D20A/E61Q/M104T、V91H/H16R/E16Q、V91K/D20A/M104V、H16E/V91H、V91H/D20A/M104V、H16E/V91H/M104T、H16E/V91H/E61Q/M104T、V91K/E61Q/H16E、V91K/H16R/M104L、H16E/V91H/E16Q、V91K/E61Q/H16R、D20W/V91K/E61Q、V91H/H16R、V91K/H16R、D20W/V91K/E61Q/M104T、V91K/D20A、V91H/D20A/E16Q、V91K/D20A/M104L、V91H/D20A、V91K/E61Q/D20A、V91H/M104T、V91H/M104V、V91K/E61Q、V91K/N88K/E61Q/M104T、V91K/N88K/E61Q、V91H/E61Q、V91K/N88K、D20A/H16E/M104T、D20A/M104T、H16E/N88K、D20A/M104V、D20A/M104L、H16E/M104T、H16E/M104V、N88K/M104V、N88K/E61Q、D20A/E61Q、H16R/D20A、D20W/E61Q、H16E/E61Q、H16E/M104L、N88K/M104T、D20A/H16E、D20A/H16E/E16Q、D20A/H16R/E16Q、V91K/D20W、V91A/H16A、V91A/H16D、V91A/H16E、V91A/H16S、V91E/H16A、V91E/H16D、V91E/H16E、V91E/H16S、V91K/H16A、V91K/H16D、V91K/H16S、V91S/H16E、L12G、L12K、L12Q、L12S、Q13G、E15A、E15G、E15S、H16A、H16D、H16G、H16K、H16M、H16N、H16R、H16S、H16T、H16V、H16Y、L19A、L19D、L19E、L19G、L19N、L19R、L19S、L19T、L19V、D20A、D20E、D20F、D20G、D20T、D20W、M23R、N30S、Y31H、K35R、V69A、Q74P、R81A、R81G、R81S、R81T、D84A、D84E、D84G、D84I、D84M、D84Q、D84R、D84S、D84T、S87R、N88A、N88D、N88E、N88F、N88G、N88M、N88R、N88S、N88V、N88W、V91D、V91E、V91G、V91S、I92K、I92R、和/或E95G的取代之外，还包括截短和/或另外的插入、缺失和/或取代，条件是所述突变蛋白维持优先刺激Treg的活性。因此，实施例包括IL-2突变蛋白，其优先刺激Treg细胞并且包含氨基酸序列，该氨基酸序列具有V91K、N30S、N30D、Y31H、Y31S、K35R、V69A、Q74P、V91K/D20L、D84R/E61Q、V91K/D20A/E61Q/M104T、N88K/M104L、V91H/M104L、V91K/H16E/M104V、V91K/H16R/M104V、V91K/H16R/M104T、V91K/D20A/M104T、V91K/H16E/M104T、V91K/H16E/E61Q/M104T、V91K/H16R/E61Q/M104T、V91K/H16E、V91H/D20A/M104T、H16E/V91H/M104V、V91H/D20A/E61Q/M104T、V91H/H16R/E16Q、V91K/D20A/M104V、H16E/V91H、V91H/D20A/M104V、H16E/V91H/M104T、H16E/V91H/E61Q/M104T、V91K/E61Q/H16E、V91K/H16R/M104L、H16E/V91H/E16Q、V91K/E61Q/H16R、D20W/V91K/E61Q、V91H/H16R、V91K/H16R、D20W/V91K/E61Q/M104T、V91K/D20A、V91H/D20A/E16Q、V91K/D20A/M104L、V91H/D20A、V91K/E61Q/D20A、V91H/M104T、V91H/M104V、V91K/E61Q、V91K/N88K/E61Q/M104T、V91K/N88K/E61Q、V91H/E61Q、V91K/N88K、D20A/H16E/M104T、D20A/M104T、H16E/N88K、D20A/M104V、D20A/M104L、H16E/M104T、H16E/M104V、N88K/

M104V、N88K/E61Q、D20A/E61Q、H16R/D20A、D20W/E61Q、H16E/E61Q、H16E/M104L、N88K/M104T、D20A/H16E、D20A/H16E/E16Q、D20A/H16R/E16Q、V91K/D20W、V91A/H16A、V91A/H16D、V91A/H16E、V91A/H16S、V91E/H16A、V91E/H16D、V91E/H16E、V91E/H16S、V91K/H16A、V91K/H16D、V91K/H16S、V91S/H16E、L12G、L12K、L12Q、L12S、Q13G、E15A、E15G、E15S、H16A、H16D、H16G、H16K、H16M、H16N、H16R、H16S、H16T、H16V、H16Y、L19A、L19D、L19E、L19G、L19N、L19R、L19S、L19T、L19V、D20A、D20E、D20F、D20G、D20T、D20W、M23R、N30S、Y31H、K35R、V69A、Q74P、R81A、R81G、R81S、R81T、D84A、D84E、D84G、D84I、D84M、D84Q、D84R、D84S、D84T、S87R、N88A、N88D、N88E、N88F、N88G、N88M、N88R、N88S、N88V、N88W、V91D、V91E、V91G、V91S、I92K、I92R、和/或E95G取代并且与SEQ ID NO:1中列出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。在特别优选的实施例中,此类IL-2突变蛋白包含以下氨基酸序列,该氨基酸序列与SEQ ID NO:1中列出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。

[0031] 对于氨基酸序列,通过使用本领域已知的标准技术确定序列同一性和/或相似性,包括但不限于,Smith和Waterman,1981,Adv. Appl. Math. [高级应用数学]2:482的局部序列同一性算法、Needleman和Wunsch,1970,J. Mol. Biol. [分子生物学杂志]48:443的序列同一性比对算法、Pearson和Lipman,1988,Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. [美国国家科学院院刊]85:2444的相似性方法的检索、这些算法的计算机化实现(威斯康星遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,遗传学计算机集团,575科学大道,麦德逊,威斯康星州(Genetics Computer Group,575Science Drive, Madison, Wis.))、Devereux等人,1984,Nucl. Acid Res. [核酸研究]12:387-395所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,通过FastDB基于以下参数计算同一性百分比:错配罚分为1;空位罚分为1;空位大小罚分为0.33;以及连接罚分为30,“Current Methods in Sequence Comparison and Analysis[序列比较和分析的当前方法]”,Macromolecule Sequencing and Synthesis[大分子测序与合成],Selected Methods and Applications[所选择的方法与应用],第127-149页(1988),Alan R. Liss公司。

[0032] 有用算法的实例是PILEUP。PILEUP使用渐进式双序列比对从一组相关序列创建多序列比对。它还可以绘制显示用于创建比对的聚类关系的树突。PILEUP使用Feng和Doolittle,1987,J. Mol. Evol. [分子进化杂志]35:351-360的渐进式比对方法的简单化;所述方法类似于Higgins和Sharp,1989,CABIOS 5:151-153所述的方法。有用的PILEUP参数包括默认空位权重3.00、默认空位长度权重0.10和加权末端空位。

[0033] 有用的算法的另一个实例是BLAST算法,描述于以下中:Altschul等人,1990,J. Mol. Biol. [分子生物学杂志]215:403-410;Altschul等人,1997,Nucleic Acids Res. [核酸研究]25:3389-3402;和Karin等人,1993,Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. [美国国家科学院院刊]90:5873-5787。特别有用的BLAST程序是WU-BLAST-2程序,其获自Altschul等人,1996,Methods in Enzymology[酶学方法]266:460-480。WU-BLAST-2使用多个搜索参数,其中大多数都设置为默认值。将可调整参数设置为以下值:重叠间隔=1,重叠分数=0.125,字阈值(T)=II。出于比对的目的,本发明优先利用这些参数和BLAST作为比对算法。HSP S和HSP S2参数是动态值,并且由程序本身根据特定序列的组成和特定数据库的组成来确

立,根据该特定数据库来搜索感兴趣的序列;然而,可以调整这些值以提高灵敏度。

[0034] 另外有用的算法是由Altschul等人,1993,Nucl.Acids Res.[核酸研究]25:3389-3402报道的空位BLAST。空位BLAST使用BLOSUM-62取代评分;阈值T参数设定为9;触发非空位扩展的双击方法,对k的空位长度收取10+k的成本; X_u 设定为16,并且 X_g 设定为40(用于数据库搜索阶段)以及67(用于算法的输出阶段)。有空位的比对由对应于约22位的得分触发。

[0035] 尽管可以预先确定了用于引入氨基酸序列变异的位点或区域,但突变本身不需要预先确定。例如,为了优化给定位点处的突变的性能,可以在靶密码子或区域进行随机诱变,并且针对所需活性的最佳组合来筛选表达的IL-2突变蛋白。在具有已知序列的DNA中的预定位点处进行取代突变的技术是熟知的,例如M13引物诱变和PCR诱变。可以使用本文描述的测定进行突变体的筛选,例如。

[0036] 氨基酸取代典型地是单个残基取代;插入通常将在从约一个(1个)至约二十个(20)氨基酸残基的数量级,尽管可以耐受显著更大的插入。缺失的范围是从约一个(1个)至约二十个(20)氨基酸残基,尽管在一些情况下,缺失可以远远更大。

[0037] 取代、缺失、插入或其任何组合可以用于实现最终衍生物或变体。通常这些变化在少数氨基酸上进行,从而将分子的改变,特别是抗原结合蛋白的免疫原性和特异性最小化。然而,在某些情况下,可以耐受更大变化。通常根据如表1描绘的以下图表进行保守取代。

[0038] 表1

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
[0039] 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

[0040] 通过选择比表1中显示的那些更不保守的取代,造成功能或免疫特性的实质性变化。例如,可以造成具有以下更显著影响的取代:多肽主链的结构(例如 α 螺旋或 β -片层结构)在改变的区域中;在靶位点处的分子的电荷或疏水性;或侧链的体积。通常预期产生多肽特性的最大变化的取代是以下那些:其中(a)亲水残基,例如丝氨酰或苏氨酰取代以下(或被以下取代):疏水残基,例如亮氨酰、异亮氨酰、苯丙氨酰、缬氨酰或丙氨酰;(b)半胱氨酸或脯氨酸取代以下(或被以下取代):任何其他残基;(c)具有正电侧链的残基(例如赖氨酰、精氨酰、或组氨酰)取代以下(或被以下取代):负电残基,例如谷氨酰或天冬氨酰;或(d)具有大体积侧链的残基(例如苯丙氨酸)取代以下(或被以下取代):没有侧链的残基,例如甘氨酸。

[0041] 与天然存在的类似物相比,这些变体典型地表现出相同定性生物活性,并且将引发相同免疫应答,尽管还选择变体来根据需要修改IL-2突变蛋白的特征。可替代地,可以设计变体,使得改变IL-2突变蛋白的生物活性。例如,如本文讨论,可以改变或移除糖基化位

点。

[0042] TNFR激动剂

[0043] 肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族是细胞因子受体的家族, 这些细胞因子受体在质膜中形成三聚体复合物, 并且通过细胞外富含半胱氨酸的结构域结合肿瘤坏死因子 (TNF)。TNFR家族的一些成员含有死亡结构域, 并且已经被称为死亡受体。

[0044] 本发明的TNFR激动剂与本发明的IL-2分子和突变蛋白组合, 优先刺激调节性T (Treg) 细胞。本发明的TNFR激动剂包括肿瘤坏死因子受体1 (TNFR1); 肿瘤坏死因子受体2 (TNFR2); 淋巴毒素β受体 (LTBR); OX40; CD40; Fas受体; 诱饵受体3; CD27; CD30; 4-1BB; 死亡受体1、2、3、4、5和6; RANK, 骨保护素; TWEAK受体; TACI; BAFF受体; 疱疹病毒进入介质; 神经生长因子受体; B细胞成熟抗原; 糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白; TROY; 和外胚层发育异常蛋白A2受体, 以及受体的激动剂抗体, 例如OX40激动性抗体。

[0045] 与其他免疫细胞群体相比, Treg细胞在基线水平上以远远更高的水平表达几种不同的TNFR家族成员, 例如GITR、4-1BB (CD137)、OX40、DR3、TNFR2。TNFR在不同T细胞子集上的表达是从单细胞RNA数据确定的。例如, 可以从人类单细胞RNA测序数据, 例如网址<http://crc.cancer-pku.cn/index.php>提取不同免疫细胞子集上的TNFR水平。在一些实施例中, 本发明的TNFR激动剂包括抗OX40、抗DR3和TNF。在一些实施例中, TNFR激动剂可以是TNFR成员的配体。这些包括TNF-α; 淋巴毒素β (TNF-C); OX40L; CD154; FasL; LIGHT; TL1A; CD70; Siva; CD153; 4-1BB配体; TRAIL; RANKL; TWEAK; APRIL; BAFF; CAMLG; NGF; BDNF; NT-3; NT-4; GITR配体; 和EDA-A2。

[0046] 针对OX40的抗体的实例包括WO 2007062245 A2、WO 2010096418 A2、WO 2013008171A1、WO 2013028231 A1、WO 2013038191 A2、WO 2013068563 A2、WO 2014148895A1、WO 2015153513 A1、WO 2016057667 A1、WO 2016179517 A1、WO 2016196228 A1和WO 2018112346 A1中发现的充当激动性抗体的那些抗体。在一些实施例中, 可以充当OX40受体的激动剂的针对OX40的抗体对本发明而言是有用的。针对OX40受体的抗体的实例包括WO 2003106498 A2中发现的那些抗体。OX40配体的实例包括在US 5783665 A中发现的那些配体, 所有以上参考文献均通过援引以其全文并入。

[0047] 在一个实施例中, 抗OX40抗体具有以下重链序列:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSNGMHWRQAPGKGLEWVAVIWHDGSKKNYADSVKGRFTISRDTSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGYGDYTLDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT

[0048] HTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO:9)

[0049] 在一个实施例中, 抗OX40抗体具有以下轻链序列:

DIHMTQSPSSLSASVRDRVTITCRASQYISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFSLAISL

[0050] QPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:10)

[0051] 在一个实施例中, 抗OX40抗体具有SEQ ID NO:9的重链和SEQ ID NO:10的轻链。

[0052] 针对死亡受体3 (DR3) 的抗体的实例包括WO 2011106707 A2和WO 2015152430 A1中发现的那些抗体。在一些实施例中,可以充当DR3受体的激动剂的针对DR3的抗体对本发明而言是有用的。DR3配体的实例包括TNF样蛋白1A (TL1A)。所有以上参考文献均通过援引以其全文并入。

[0053] 组合分子

[0054] 如本发明中的IL-2分子或突变蛋白与TNFR激动剂的组合可以组合施用或作为单个分子施用。本文提供的IL-2分子或突变蛋白与TNFR激动剂的组合可以被构建为单分子构建物。在一些实例中,本发明的IL-2分子或突变蛋白和TNFR激动剂可以被构建为单个分子,例如与Fc分子一起。在一些实施例中,Fc分子在一个臂上具有IL-2分子或突变蛋白,并且在另一个臂上具有TNFR激动剂或作为融合蛋白。在一些情况下,Fc结合的IL-2/TNFR激动剂分子延长了Fc结合的IL-2/TNFR激动剂分子的血清半衰期。在一些情况下,这样做不会使此类半衰期延长会增加患者中发生副作用或不良事件的可能性或强度的风险升高。这样一种血清半衰期延长的突变蛋白的皮下给药可以允许在更低系统性最大暴露($C_{\text{最大}}$)情况下的延长的靶标覆盖。延长的血清半衰期可以允许突变蛋白的更低或更小频率的给药方案。

[0055] 可以通过基本上本领域已知的任何方法延长本文提供的IL-2/TNFR激动剂分子的血清半衰期。此类方法包括将IL-2/TNFR激动剂分子的序列改变为包括结合新生儿Fc γ 受体或结合具有延长的血清半衰期的蛋白(例如IgG或人血清白蛋白)的肽。在其他实施例中,将IL-2/TNFR激动剂分子融合至赋予融合分子延长的半衰期的多肽。此类多肽包括IgG Fc或结合新生儿Fc γ 受体、人血清白蛋白的其他多肽、或结合具有延长的血清半衰期的蛋白的多肽。在一些优选的实施例中,将Fc结合的IL-2/TNFR激动剂分子融合至IgG Fc分子。

[0056] 可以将分子的IL-2/TNFR激动剂部分融合至IgG Fc区的N末端或C末端。

[0057] 本发明的一个实施例针对二聚体,该二聚体包含通过将IL-2分子或突变蛋白融合至抗体的一个Fc区并且将TNFR激动剂融合至另一个区产生的两个Fc融合多肽。例如,可以通过以下制备所述二聚体:将编码融合蛋白的基因融合物插入适当表达载体,在用重组表达载体转化的宿主细胞中表达所述基因融合物,并且允许表达的融合蛋白来很像抗体分子那样进行组装,于是在Fc部分之间形成链间键来产生二聚体。

[0058] 如本文使用的,术语“Fc多肽”或“Fc区”包括衍生自抗体的Fc区的多肽的天然的和突变蛋白的形式,并且可以是本发明的IL-2突变蛋白融合蛋白或抗IL-2抗体的一部分。还包括含有促进二聚化的铰链区的截短形式的此类多肽。在某些实施例中,所述Fc区包含抗体CH2和CH3结构域。伴随延长的血清半衰期,包含Fc部分(和由其形成的寡聚体)的融合蛋白提供了通过蛋白A或蛋白G柱上的亲和层析进行简便纯化的优点。优选的Fc区衍生自人IgG,其包括IgG1、IgG2、IgG3、和IgG4。在本文,通过位置鉴定Fc内的特定残基。所有Fc位置都基于EU编号方案。

[0059] 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通信。这被认为是“效应子功能”。通信导致抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。ADCC和ADCP是经由Fc结合至免疫系统细胞表面上的Fc受体介导。CDC是经由Fc与补体系统,例如C1q的蛋白质结合所介导。

[0060] IgG亚类在其介导效应子功能的能力方面不同。例如,在介导ADCC和CDC时,IgG1远远优于IgG2和IgG4。因此,在其中不希望效应子功能的实施例中,IgG2 Fc将是优选的。然

而,已知与含IgG1 Fc分子相比,含IgG2 Fc分子更难以制造,并且具有更没吸引力的特性,例如更短的半衰期。

[0061] 通过将一或多个突变引入Fc,可以增加、或减少抗体的效应子功能。本发明的实施例包括具有工程化来增加效应子功能的Fc的IL-2突变蛋白Fc融合蛋白(U.S.7,317,091和Strohl,Curr.Opin.Biotech.[生物技术当前述评],20:685-691,2009;将这两篇文献通过引用以其全文并入本文)。具有增加的效应子功能的示例性IgG1 Fc分子包括具有以下取代的那些:S239D;S239E;S239K,F241A;V262A;V264D;V264L;V264A;V264S;D265A;D265S;D265V;F296A;Y296A;R301A;I332E;S239D/I332E;S239D/A330S/I332E;S239D/A330L/I332E;S298A/D333A/K334A;P247I/A339D;P247I/A339Q;D280H/K290S;D280H/K290S/S298D;D280H/K290S/S298V;F243L/R292P/Y300L;F243L/R292P/Y300L/P396L;F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L;G236A/S239D/I332E;K326A/E333A;K326W/E333S;K290E/S298G/T299A;K290N/S298G/T299A;K290E/S298G/T299A/K326E;或K290N/S298G/T299A/K326E,或任何上述位置的组合。

[0062] 增加含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。从附接至Fc的双触角复合型寡糖移除核心岩藻糖增加ADCC效应子功能而不改变抗原结合或CDC效应子功能。已知若干方式来减少或消除含Fc分子(例如抗体)的岩藻糖基化。这些包括在某些哺乳动物细胞系中的重组表达,这些细胞系包括FUT8敲除细胞系、变体CHO细胞系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的细胞系、以及共表达 β -1,4-N-乙酰葡萄糖胺转移酶III和高尔基 α -甘露糖苷酶II的细胞系。可替代地,可以在非哺乳动物细胞(例如植物细胞、酵母、或原核细胞,例如大肠杆菌)中表达含Fc分子。

[0063] 在某些实施例中,本发明的IL-2突变蛋白Fc融合蛋白或抗IL-2抗体包含工程化以减少效应子功能的Fc。具有减少的效应子功能的示例性Fc分子包括具有以下取代的那些:N297A或N297Q(IgG1);L234A/L235A(IgG1);V234A/G237A(IgG2);L235A/G237A/E318A(IgG4);H268Q/V309L/A330S/A331S(IgG2);C220S/C226S/C229S/P238S(IgG1);C226S/C229S/E233P/L234V/L235A(IgG1);L234F/L235E/P331S(IgG1);或S267E/L328F(IgG1)。

[0064] 已知人IgG1具有在N297(EU编号系统)处的糖基化位点,并且糖基化有助于IgG1抗体的效应子功能。在SEQ ID NO:3中提供了示例性IgG1序列:

```
DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
[0065]
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (
SEQ ID NO:3)
```

[0066] 在努力制备去糖基化抗体中多个组具有突变的N297。突变集中在用具有类似天冬酰胺的生理化学性质的氨基酸(例如谷氨酰胺(N297Q)或丙氨酸(N297A),它们模拟没有极性基团的天冬酰胺)取代N297。

[0067] 如本文使用的,“去糖基化抗体”或“去糖基化fc”是指在Fc的位置297处的残基的糖基化状态。抗体或其他分子可以在一个或多个其他位置处含有糖基化,但是可以仍被认为是去糖基化抗体或去糖基化Fc融合蛋白。

[0068] 在努力制备无效效应子功能IgG1 Fc中,发现将人IgG1的氨基酸N297突变为甘氨酸,即N297G,提供了远远比在此残基处的其他氨基酸取代更优越的纯化效能和生物物理特性。

参见实例8。因此,在优选的实施例中,IL-2突变蛋白Fc融合蛋白包含具有N297G取代的人IgG1 Fc。在其中分子包含人IgG1 Fc的任何背景下,包含N297G取代的Fc是有用的,并且不限于在IL-2突变蛋白Fc融合的背景下的用途。在某些实施例中,抗体包含具有N297G取代的Fc。

[0069] 包含具有N297G突变的人IgG1 Fc的Fc还可以包含另外的插入、缺失、和取代。在某些实施例中,人IgG1 Fc包含N297G取代并且与SEQ ID NO:3中列出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。在特别优选的实施例中,C末端赖氨酸残基被取代或缺失。在SEQ ID NO:4中列出了包含N297G取代和C末端赖氨酸缺失的人IgG1的氨基酸序列,具有以下氨基酸序列:

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 GSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
 [0070] PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
 (SEQ ID NO:4)

[0071] 显示与糖基化的含IgG1 Fc分子相比,糖基化的含IgG1 Fc分子更不稳定。可以将Fc区进一步工程化,从而增加去糖基化分子的稳定性。在一些实施例中,将一个或多个氨基酸残基取代为半胱氨酸,从而在二聚体状态下形成二硫键。可以用半胱氨酸取代SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列的残基V259、A287、R292、V302、L306、V323、或I332。在优选的实施例中,特定残基对是以下取代,所述取代使得其优先彼此形成二硫键,因此限制或防止二硫键混乱。优选对包括但不限于,A287C与L306C、V259C与L306C、R292C与V302C,以及V323C与I332C。

[0072] 本文提供了其中残基V259、A287、R292、V302、L306、V323、或I332中的一个或多个被半胱氨酸取代的含Fc分子,其实例包括:包含A287C和L306C、V259C和L306C、R292C和V302C、或V323C和I332C取代的那些。

[0073] 可以施加至IgG1 Fc的另外的突变包括在含Fc多肽中促进异二聚体形成的那些。在一些实施例中,将Fc区工程化从而产生“杵”和“臼”,当在细胞中共表达时,它们促进两个不同的含Fc多肽链的异二聚体形成。U.S. 7,695,963。在其他实施例中,将Fc区改变为,当在细胞中共表达时,使用静电操纵来促进两个不同的含Fc多肽的异二聚体形成,同时阻止同二聚体形成。WO 09/089,004,将其通过引用以其全文并入本文。优选的异二聚体Fc包括其中Fc的一个链包含D399K和E356K取代并且Fc的另一个链包含K409D和K392D取代的那些。在其他实施例中,Fc的一个链包含D399K、E356K、和E357K取代并且Fc的另一个链包含K409D、K392D、和K370D取代。

[0074] 在某些实施例中,Fc结合的IL-2/TNFR激动剂分子包含Fc和IL-2分子或突变蛋白之间的接头和/或Fc和TNFR激动剂之间的接头。本领域已知许多不同的接头多肽,并且可以用于Fc结合的IL-2/TNFR激动剂分子的背景下。在优选的实施例中,Fc结合的IL-2/TNFR激动剂分子包含在Fc和IL-2突变蛋白之间的由以下组成的肽的一个或多个拷贝:GGGGS (SEQ ID NO:5)、GGNGT (SEQ ID NO:6)、或YGNGT (SEQ ID NO:7)。在一些实施例中,Fc和IL-2分子或突变蛋白和/或Fc和TNFR激动剂区之间的多肽区包含GGGGS (SEQ ID NO:5)、GGNGT (SEQ ID NO:6) 或YGNGT (SEQ ID NO:7) 的单拷贝。如本文所示,当在适当细胞中表达时,接头

GGNGT (SEQ ID NO:6) 或 YGNGT (SEQ ID NO:7) 被糖基化, 并且此类糖基化可以帮助在溶液中和/或在体内施用稳定蛋白。因此, 在某些实施例中, IL-2 突变蛋白融合蛋白包含在 Fc 区和 IL-2 突变蛋白区之间的糖基化接头。

[0075] Fc 的 C 末端部分和/或 IL-2 分子或突变蛋白的氨基末端部分可以含有一个或多个突变, 当在哺乳动物细胞中表达时, 这些突变改变 Fc 结合的 IL-2/TNFR 激动剂分子的糖基化谱。在某些实施例中, Fc 结合的 IL-2/TNFR 激动剂分子进一步包含 T3 取代, 例如 T3N 或 T3A。Fc 结合的 IL-2/TNFR 激动剂分子可进一步包含 S5 取代, 例如 S5T。

[0076] Fc 结合的 IL-2/TNFR 激动剂分子的共价修饰包括在本发明的范围内, 并且通常(但不总是) 在翻译后进行。例如, 通过使分子的某些氨基酸残基与能够与选择的侧链或 N 或 C 末端残基反应的有机衍生剂反应, 将几种类型的共价修饰引入到所述分子中。

[0077] 半胱氨酰残基最常见的是与 α - 卤代乙酸盐 (和相应的胺) 如氯乙酸或氯乙酰胺反应, 得到羧甲基或羧酰胺甲基衍生物。半胱氨酰残基也通过与溴三氟丙酮、 α - 溴- β - (5-咪唑基) 丙酸、氯乙酰磷酸酯、N- 烷基马来酰亚胺、3- 硝基-2- 吡啶基二硫化物、甲基-2- 吡啶基二硫化物、对氯汞基苯甲酸酯、2- 氯汞基-4- 硝基苯酚或氯-7- 硝基苯并-2- 氧杂-1,3- 二唑反应而衍生化。

[0078] 组氨酰基残基通过与 pH 5.5-7.0 的焦碳酸二乙酯反应而衍生化, 因为该试剂对组氨酰基侧链具有相对特异性。对溴苯甲酰甲基溴也是有用的; 该反应优选在 pH 6.0 的 0.1M 二甲胂酸钠中进行。

[0079] 赖氨酰和氨基末端残基与琥珀酸或其他羧酸酐反应。用这些试剂衍生化具有逆转赖氨酰残基电荷的作用。用于衍生含 α - 氨基的残基的其他适合试剂包括亚氨酸酯, 诸如甲基吡啶亚胺甲酯; 磷酸吡哆醛; 吡哆醛; 硼氢化氯; 三硝基苯磺酸; 0- 甲基异脲; 2,4- 戊二酮; 以及转氨酶催化的与乙醛酸盐的反应。

[0080] 通过与一种或几种常规试剂反应来修饰精氨酰基残基, 其中包括苯甲酰甲醛、2,3- 丁二酮、1,2- 环己二酮和茛三酮。由于胍官能团的 pK_a 高, 因此精氨酸残基的衍生化需要在碱性条件下进行反应。此外, 这些试剂可以与赖氨酸基团以及精氨酸 ϵ - 氨基基团反应。

[0081] 可以进行酪氨酰基残基的特定修饰, 特别感兴趣的是通过与芳香族重氮化合物或四硝基甲烷反应将光谱标记引入酪氨酰基残基中。最常见的是, N- 乙酰基咪唑和四硝基甲烷分别用于形成邻乙酰基酪氨酰基种类和 3- 硝基衍生物。使用 ^{125}I 或 ^{131}I 碘化酪氨酰基残基以制备用于放射免疫测定的标记蛋白质, 上述氯胺 T 方法是适合的。

[0082] 羧基侧基团 (天冬氨酰基或谷氨酰基) 通过与碳二亚胺 ($\text{R}'-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$) 反应而选择性地修饰, 其中 R 和 R' 任选为不同的烷基基团, 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, 天冬氨酰基和谷氨酰基残基通过与铵离子反应转化为天冬酰胺酰基和谷氨酰胺酰基残基。

[0083] 用双功能剂情况下的衍生化可用于将抗原结合蛋白交联到水不溶性载体基质或表面以用于多种方法中。常用的交联剂包括例如 1,1- 双 (重氮乙酰基) -2- 苯基乙烷、戊二醛、N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (例如与 4- 叠氮基水杨酸的酯)、同双官能亚氨酸酯 (包括二琥珀酰亚胺酯, 诸如 3,3'- 二硫代双 (琥珀酰亚胺基丙酸酯), 和双官能马来酰亚胺, 诸如双-N- 马来酰亚胺-1,8- 辛烷)。衍生化试剂如甲基-3- [(对叠氮基苯基) 二硫代] 丙酰亚胺酯产生可光活化的中间体, 其能够在光的存在下形成交联。可替代地, 反应性水不溶性基质如溴化氰活

化的碳水化合物和反应性底物,如美国专利号3,969,287、3,691,016、4,195,128、4,247,642、4,229,537、和4,330,440所述,用于蛋白质固定。

[0084] 谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基通常分别脱酰胺成相应的谷氨酰基和天冬氨酰基残基。可替代地,这些残基在温和的酸性条件下脱酰胺。这些残基的任何一种形式都属于本发明的范围。

[0085] 其他修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基基团的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基基团的甲基化(T.E.Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties* [蛋白质:结构和分子特性]、W.H.Freeman公司,旧金山,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。

[0086] 包括在本发明范围内的IL-2突变蛋白、IL-2突变蛋白Fc融合、或抗IL-2抗体的另一种类型的共价修饰包括改变蛋白质的糖基化模式。如本领域所知,糖基化模式可取决于蛋白质的序列(例如,下文讨论的特定糖基化氨基酸残基的存在或不存在)或产生蛋白质的宿主细胞或生物二者。下面讨论特定的表达系统。

[0087] 多肽的糖基化通常是N-连接的或O-连接的。N-连接是指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链连接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸之外的任何氨基酸)是碳水化合物部分与天冬酰胺侧链酶促连接的识别序列。因此,多肽中这些三肽序列中任一个的存在产生潜在的糖基化位点。O-连接糖基化是指将糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一连接到羟基氨基酸上,最通常为丝氨酸或苏氨酸,尽管也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0088] 通过改变氨基酸序列使其含有一种或多种上述三肽序列(对于N-连接的糖基化位点),可以方便地完成向IL-2突变蛋白、IL-2突变蛋白Fc融合物、或抗IL-2抗体中添加糖基化位点。也可以通过将一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基添加至起始序列或被一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代(对于O-连接的糖基化位点)来进行改变。为了方便起见,IL-2突变蛋白、IL-2突变蛋白Fc融合物、或抗IL-2抗体氨基酸序列优选通过DNA水平的变化来改变,特别是通过在预选碱基处突变编码靶多肽的DNA,以使得产生将翻译成所希望氨基酸的密码子。

[0089] 增加IL-2突变蛋白、IL-2突变蛋白Fc融合物、或抗IL-2抗体上的碳水化合物部分的数量的一种手段是通过将糖苷化学或酶促偶联至蛋白质。这些方法是有利的,因为它们不需要在具有对于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方式,一种或多种糖可连接到(a)精氨酸和组氨酸,(b)游离羧基基团,(c)游离巯基基团,诸如半胱氨酸的那些,(d)游离羟基基团,诸如丝氨酸、苏氨酸或羟基脯氨酸的那些,(e)芳香族残基,诸如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的那些,或(f)谷氨酰胺的酰胺基团。这些方法描述于1987年9月11日公布的W0 87/05330以及Aplin和Wriston,1981, *CRC Crit.Rev.Biochem.* [CRC生物化学关键评论],第259-306页中。

[0090] 存在于起始IL-2突变蛋白、IL-2突变蛋白Fc融合物、或抗IL-2抗体上的碳水化合物部分的去除可以化学或酶促方式完成。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效的化合物中。所述处理导致除连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)之外的大多数或所有糖的裂解,同时使多肽保持完整。化学去糖基化由Hakimuddin等人,1987, *Arch.Biochem.Biophys.* [生物化学与生物物理学集刊] 259:52和Edge等人,1981,

Anal. Biochem. [分析生物化学] 118:131 描述。多肽上碳水化合物部分的酶促裂解可以通过使用多种内切糖苷酶和外切糖苷酶实现, 如由 Thotakura 等人, 1987, Meth. Enzymol. [酶学方法] 138:350 所述的方法。可以通过使用化合物衣霉素防止潜在糖基化位点处的糖基化, 如由 Duskin 等人, 1982, J. Biol. Chem. [生物化学杂志] 257:3105 所述的。衣霉素阻断蛋白质-N-糖苷连接的形成。

[0091] IL-2/TNFR 激动剂分子的另一种类型的共价修饰包括以美国专利号 4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192 或 4,179,337 中所述的方式将蛋白连接到各种非蛋白质聚合物, 包括但不限于各种多元醇, 例如聚乙二醇、聚丙二醇、或聚氧化烯。此外, 可以在 IL-2/TNFR 激动剂分子内的不同位置处进行氨基酸取代, 从而促进聚合物 (例如 PEG) 的添加。因此, 本发明的实施例包括聚乙二醇化的 IL-2/TNFR 激动剂分子。此类聚乙二醇化的蛋白与其非聚乙二醇化形式相比可以具有增加的半衰期和/或减少的免疫原性。

[0092] 编码 IL-2/TNFR 激动剂分子的多核苷酸

[0093] 本发明涵盖了编码 IL-2/TNFR 激动剂分子的核酸。本发明的方面包括编码本文描述的氨基酸序列的多核苷酸变体 (例如由于简并)。

[0094] 可以通过从氨基酸序列“回译”, 获得对应于本文描述的氨基酸序列的核苷酸序列, 其用于分离核酸的探针或引物, 或用于数据库检索的查询序列。可以采用熟知的聚合酶链式反应 (PCR) 程序来分离并且扩增编码 IL-2 突变蛋白和 IL-2 突变蛋白 Fc 融合蛋白的 DNA 序列。将定义 DNA 片段的组合的所需末端的寡核苷酸用作 5' 和 3' 引物。所述寡核苷酸可以另外含有限制性核酸内切酶的识别位点, 以促进将 DNA 片段的扩增的组合插入表达载体中。PCR 技术描述于 Saiki 等人, Science [科学], 239:487 (1988); Recombinant DNA Methodology [重组 DNA 方法], Wu 等人编辑, 学术出版社 (Academic Press, Inc.), 圣迭哥 (1989), 第 189-196 页, 和 PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications [PCR 方案: 方法和应用指南], Innis 等人编辑, 学术出版社 (Academic Press, Inc.) (1990) 中。

[0095] 本发明的核酸分子包括呈单链和双链形式的 DNA 和 RNA, 以及相应互补序列。“分离的核酸”在从天然存在的来源分离的核酸的情况下, 是指已与分离出核酸的生物体基因组中存在的相邻基因序列分离的核酸。在由模板酶法合成或化学合成核酸, 例如 PCR 产物、cDNA 分子或寡核苷酸的情况下, 应理解, 由此类方法获得的核酸是分离的核酸。分离的核酸分子是指呈独立片段形式或作为较大核酸构建体的一种组分的核酸分子。在一个优选实施例中, 核酸基本上不含污染性内源物质。该核酸分子优选衍生自基本上纯的形式和能够利用标准生物化学方法 (例如 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual [分子克隆: 实验室手册], 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory [冷泉港实验室], Cold Spring Harbor [冷泉港], NY [纽约州] (1989) 中概述的方法) 鉴别、操作和回收其组分核苷酸序列的量或浓度分离至少一次的 DNA 或 RNA。此类序列优选是以不含典型地存在于真核基因中的内部非翻译序列或内含子的可读框形式提供和/或构建。非翻译 DNA 序列可以存在于可读框的 5' 或 3' 处, 其中这些序列不干扰编码区的操作或表达。

[0096] 根据本发明的 IL-2 突变蛋白通常通过以下来制备: 使用盒式或 PCR 诱变, 或本领域中熟知的其他技术, 对编码 IL-2/TNFR 激动剂分子的 DNA 中的核苷酸进行位点特异性诱变, 以产生编码变体的 DNA, 并且随后如本文所概述在细胞培养中表达重组 DNA。然而, 可以使用确定的技术, 通过体外合成, 制备 IL-2/TNFR 激动剂分子。这些变体典型地表现出与天然存

在的类似物相同的生物活性,例如Treg扩增,尽管还可以选择具有如将在下文更全面地描述的改进特征的变体。

[0097] 如本领域技术人员所理解,由于遗传密码的简并,本发明的每种IL-2/TNFR激动剂分子是由极大数量的核酸编码的,这些核酸的每一个都在本发明的范围内,并且可以使用标准技术进行制备。因此,通过以不改变编码蛋白的氨基酸序列的方式简单地修饰一个或多个密码子序列来标识特定氨基酸序列,本领域普通技术人员可以制得多种不同的核酸。

[0098] 本发明还提供了处于质粒形式的表达系统和构建体、表达载体、转录或表达盒,其包含至少一种如上多核苷酸。此外,本发明提供了包含此类表达系统或构建体的宿主细胞。

[0099] 典型地,用于任何宿主细胞中的表达载体均将含有用于质体维持及用于克隆及表达外源核苷酸序列的序列。在某些实施例中,统称为“侧接序列”,典型地将包括以下核苷酸序列中的一个或多个:启动子、一个或多个增强子序列、复制起点、转录终止序列、含有供体和受体剪接位点的完整内含子序列、编码用于多肽分泌的前导序列的序列、核糖体结合位点、聚腺苷酸化序列、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物组件。这些序列分别于下文论述。

[0100] 任选地,载体可以含有“标签”编码序列,即,位于IL-2/TNFR激动剂分子编码序列的5'或3'端的寡核苷酸分子;该寡核苷酸序列编码聚His(例如六聚His:HHHHHH(SEQ ID NO:8)),或存在针对其的市售抗体的另一个“标签”,例如FLAG、HA(血球凝集素流感病毒)或myc。此标签典型地在多肽表达时与该抗体融合,且可以用作一种自宿主细胞亲和纯化或检测它的方式。亲和纯化可以通过例如柱层析法,使用针对标签的抗体作为亲和基质来实现。任选地,随后可以通过各种方式,例如使用某些肽酶裂解,移除标签。

[0101] 侧接序列可以是同源的(即,来自于与宿主细胞相同的物种和/或品系)、异源的(即,来自于除宿主细胞物种或品系以外的物种)、杂合的(即,来自于多于一个来源的侧接序列的组合)、合成的或天然的。因此,侧接序列的来源可以为任何原核或真核生物体、任何脊椎动物或非脊椎动物生物体,或任何植物,只要该侧接序列在宿主细胞机器中起作用且可以经宿主细胞机器活化。

[0102] 可用于本发明载体中的侧接序列可以通过本领域中熟知的若干方法中的任一种获得。典型地,可用于本文中的侧接序列将预先通过定位和/或通过限制性核酸内切酶消化鉴别且因此可以使用适当限制性核酸内切酶自适当组织来源分离。在一些情况下,侧接序列的完全核苷酸序列可能为已知的。在此,可使用本文中所描述的用于核酸合成或克隆的方法来合成侧接序列。

[0103] 无论已知侧接序列的全部抑或仅一部分,其均可使用聚合酶链反应(PCR)和/或通过用适合探针,例如来自相同或另一个物种的寡核苷酸和/或侧接序列片段筛选基因组文库来获得。若侧接序列未知,则可以自可能含有例如编码序列或甚至另外一个或多个基因的较大DNA片段分离含有侧接序列的DNA片段。可以通过以下方法来实现分离:限制性核酸内切酶消化产生适当DNA片段,随后使用琼脂糖凝胶纯化、Qiagen[®]柱色谱法(查茨沃思(Chatsworth),加利福尼亚州(CA))或技术人员已知的其他方法进行分离。本领域普通技术人员将易于了解实现此目的的适合酶的选择。

[0104] 复制起点典型地是可商购的原核表达载体的一部分,且该起点有助于在宿主细胞中扩增载体。若所选载体不含复制起点,则可以基于已知序列以化学方式合成,并将其连接

到载体中。例如,来自质粒pBR322(新英格兰生物实验室(New England Biolabs),贝弗利(Beverly),马塞诸塞州(MA))的复制起点适用于大多数革兰氏阴性细菌,且各种病毒起点(例如SV40、多瘤病毒、腺病毒、水疱性口炎病毒(VSV),或乳头瘤病毒(例如HPV或BPV))可用于在哺乳动物细胞中克隆载体。一般而言,哺乳动物表达载体不需要复制起点组分(例如,通常仅使用SV40起点,因为其还含有病毒早期启动子)。

[0105] 转录终止序列典型地位于多肽编码区3'端且用于终止转录。通常,原核细胞中的转录终止序列是富含G-C的片段,后接聚T序列。虽然序列可自文库中容易地克隆或甚至作为载体的一部分而购自市面,但其还可使用例如本文中所描述的那些核酸合成方法容易地合成。

[0106] 可选择标记物基因编码使选择性培养基中生长的宿主细胞存活和生长所需的蛋白质。典型的选择标记基因编码如下蛋白质:(a)赋予针对抗生素或其他毒素(例如,对于原核宿主细胞,胺苄青霉素、四环素或卡那霉素)的抗性;(b)补充细胞的营养缺陷;或(c)提供不可得自复杂培养基或限定培养基的重要营养物。特定的可选择标记物为卡那霉素抗性基因、胺苄青霉素抗性基因及四环素抗性基因。有利地,新霉素抗性基因还可用于在原核及真核宿主细胞二者中进行选择。

[0107] 其他可选择基因可用于扩增将表达的基因。扩增为如下的过程:其中使产生对生长或细胞存活非常重要的蛋白质所需的基因在重组细胞连续世代的染色体串联重复。适用于哺乳动物细胞的可选择标记物的实例包括二氢叶酸还原酶(DHFR)和无启动子胸苷激酶基因。使哺乳动物细胞转化株处于选择压力下,其中由于载体中存在可选择基因,故仅转化株唯一适于存活。选择压力是通过以下来施加:在连续地增加培养基中选择剂的浓度的条件下培养经转化细胞,由此使可选择基因和因此编码所需多肽(例如IL-2/TNFR激动剂分子)的基因二者扩增。因此,由扩增的DNA合成较多量的多肽。

[0108] 核糖体结合位点对于mRNA翻译起始而言通常为必需的且以Shine-Dalgarno序列(原核生物)或Kozak序列(真核生物)为特征。该组件典型地位于启动子的3'端且在待表达的多肽编码序列的5'端。在某些实施例中,一个或多个编码区可以可操作地连接到内部核糖体结合位点(IRES),由此允许自单一RNA转录物翻译两个可读框。

[0109] 在一些情况下,例如在真核宿主细胞表达系统中需要糖基化的情况下,可以操作各种前序列或原序列以改善糖基化或产率。例如,可以改变特定信号肽的肽酶裂解位点,或添加原序列,这些序列还可影响糖基化。最终蛋白质产物可以在位置-1(相对于成熟蛋白质的第一个氨基酸)具有一个或多个易于表达的另外的氨基酸,这些氨基酸可能未完全移除。例如,最终蛋白质产物可能具有一个或两个在肽酶裂解位点中发现的氨基酸残基附接至氨基末端。可替代地,当酶在成熟多肽内的此类区域切割时,使用一些酶裂解位点可能产生所需多肽的略微截短的形式。

[0110] 本发明的表达和克隆载体典型地将含有由宿主生物体识别且可操作地连接至编码IL-2/TNFR激动剂分子的分子的启动子。启动子为位于控制结构基因转录的结构基因起始密码子(一般在约100至1000bp内)上游(即,5')的非转录序列。启动子通常分组为两种类别中的一个:诱导型启动子及组成型启动子。诱导型启动子起始处于其控制下的DNA响应于培养条件的某种变化(诸如营养素的的存在或不存在,或者温度变化)以提高的水平转录。另一方面,组成型启动子一致地转录其可操作地连接的基因,即,对基因表达具有极小控制或

无控制。许多由多种潜在宿主细胞识别的启动子是众所周知的。

[0111] 用于酵母宿主的适合启动子在本领域中也是众所周知的。酵母增强子宜与酵母启动子一起使用。用于哺乳动物宿主细胞的适合启动子是众所周知的,且包括但不限于获自病毒基因组的那些启动子,这些病毒为诸如多形瘤病毒、传染性上皮瘤病毒、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、B型肝炎病毒以及最优选的猿猴病毒40(SV40)。其他适合哺乳动物启动子包括异源哺乳动物启动子,例如热休克启动子及肌动蛋白启动子。

[0112] 可能有意义的其他启动子包括但不限于:SV40早期启动子(Benoist和Chambon, 1981, *Nature* [自然] 290:304-310);CMV启动子(Thornsen等人, 1984, *Proc.Natl.Acad.U.S.A.* [美国国家科学院院刊] 81:659-663);劳斯氏肉瘤病毒3'长末端重复序列中包含的启动子(Yamamoto等人, 1980, *Cell* [细胞] 22:787-797);疱疹病毒胸苷激酶启动子(Wagner等人, 1981, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* [美国国家科学院院刊] 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* [自然] 296:39-42);以及原核启动子,诸如 β -内酰胺酶启动子(Villa-Kamaroff等人, 1978, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* [美国国家科学院院刊] 75:3727-3731);或tac启动子(DeBoer等人, 1983, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* [美国国家科学院院刊] 80:21-25)。有意义的还有以下动物转录控制区,它们表现出组织特异性并已用于转基因动物中:在胰腺腺泡细胞中有活性的弹性蛋白酶I基因控制区(Swift等人, 1984, *Cell* [细胞] 38:639-646;Ornitz等人, 1986, *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.* [冷泉港数量生物学研讨会] 50:399-409;MacDonald, 1987, *Hepatology* [肝脏病学] 7:425-515);在胰腺 β 细胞中有活性的胰岛素基因控制区(Hanahan, 1985, *Nature* [自然] 315:115-122);在淋巴样细胞中具有活性的免疫球蛋白基因控制区(Grosschedl等人, 1984, *Cell* [细胞] 38:647-658;Adames等人, 1985, *Nature* [自然] 318:533-538;Alexander等人, 1987, *Mol.Cell.Biol.* [分子细胞生物学] 7:1436-1444);在睾丸细胞、乳腺细胞、淋巴样细胞和肥大细胞中有活性的小鼠乳腺肿瘤病毒控制区(Leder等人, 1986, *Cell* [细胞] 45:485-495);在肝脏中有活性的白蛋白基因控制区(Pinkert等人, 1987, *Genes and Devel.* [基因与发育] 1:268-276);在肝中具有活性的 α -胎蛋白基因控制区(Krumlauf等人, 1985, *Mol.Cell.Biol.* [分子细胞生物学] 5:1639-1648;Hammer等人, 1987, *Science* [科学] 253:53-58);在肝中具有活性的 α 1-抗胰蛋白酶基因控制区(Kelsey等人, 1987, *Genes and Devel.* [基因与发育] 1:161-171);在髓样细胞中有活性的 β -珠蛋白基因控制区(Mogram等人, 1985, *Nature* [自然] 315:338-340;Kollias等人, 1986, *Cell* [细胞] 46:89-94);在大脑的少突胶质细胞中有活性的髓磷脂碱性蛋白基因控制区(Readhead等人, 1987, *Cell* [细胞] 48:703-712);在骨骼肌中具有活性的肌球蛋白轻链-2基因控制区(Sani, 1985, *Nature* [自然] 314:283-286);以及在下丘脑中有活性的促性腺激素释放激素基因控制区(Mason等人, 1986, *Science* [科学] 234:1372-1378)。

[0113] 可将增强子序列插入该载体中以增加高等真核生物的转录。增强子为DNA的顺式作用元件,长度通常为约10-300bp,作用于启动子以增加转录。增强子在方向及位置方面为相对独立的,已见于转录单元的5'及3'位置。已知可得自哺乳动物基因的若干增强子序列(例如,球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白及胰岛素)。然而,典型地使用来自于病毒的增强子。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

病毒增强子用于活化真核启动子的例示性强化元件。尽管增强子可以定位于载体中编码序列的5'或3',但其典型地位于启动子5'的位点处。可将编码适当天然或异源信号序列(前导序列或信号肽)的序列并入表达载体中,以促进IL-2/TNFR激动剂分子的细胞外分泌。信号肽或前导序列的选择取决于待产生蛋白的宿主细胞的类型,且异源信号序列可替换天然信号序列。在哺乳动物宿主细胞中具有功能性的信号肽的实例包括以下:美国专利号4,965,195中所描述的白介素-7(IL-7)的信号序列;Cosman等人,1984,Nature[自然]312:768中所描述的白介素-2受体信号序列;欧洲专利号0367 566中所描述的白介素-4受体信号肽;美国专利号4,968,607中所述的I型白介素-1受体信号肽;EP专利号0 460 846中所述的II型白介素-1受体信号肽。

[0114] 载体可以含有当载体被整合到宿主细胞基因组中时,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.[生物技术进展]19:1433-38)和基质附着区(MAR)。MAR介导染色质的结构组织化并且可以使整合的载体与“位置”效应绝缘。因此,当载体用于产生稳定转染子时,MAR是特别有用的。本领域已知多个天然的或合成的含MAR核酸,例如美国专利号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。

[0115] 可由起始载体(例如市售载体)构建本发明的表达载体。这些载体可含有或可不含所有所需侧接序列。在载体中不存在一个或多个本文所描述的侧接序列的情况下,其可以独立地获得且连接到载体中。用于获得各侧接序列的方法是本领域普通技术人员熟知的。

[0116] 构建载体并将编码IL-2/TNFR激动剂分子的核酸分子插入载体的适当位点后,可以将完整的载体插入合适的宿主细胞中进行扩增和/或多肽表达。可以通过以下熟知的方法完成将表达载体转化到所选的宿主细胞中,这些方法包括:转染、感染、磷酸钙共沉淀、电穿孔、显微注射、脂质转染、DEAE-葡聚糖介导的转染或其他已知的技术。所选方法将部分随待使用的宿主细胞类型而变化。这些方法及其他适合的方法对于技术人员是众所周知的,并且阐述于例如Sambrook等人,2001,同上中。

[0117] 当在适当条件下培养时,宿主细胞合成IL-2/TNFR激动剂分子,该分子随后可以从培养基中收集(如果宿主细胞将其分泌到培养基中)或直接从产生它的宿主细胞中收集(如果其并非分泌的)。适当的宿主细胞的选择将取决于各种因素,例如所希望的表达水平、活性所希望的或所需的多肽修饰(例如糖基化或磷酸化)和易于折叠成生物活性分子。宿主细胞可以是真核的或原核的。

[0118] 可用作表达宿主的哺乳动物细胞系是本领域中熟知的且包括但不限于可得自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC)的永生化细胞系,和本领域已知可以用于制备本发明的重组多肽的表达系统中使用的任何细胞系。通常用包含编码所需IL-2/TNFR激动剂分子的DNA的重组表达载体转化宿主细胞。其中可以采用的宿主细胞是原核生物、酵母或高等真核细胞。原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如大肠杆菌或芽孢杆菌。高等真核细胞包括昆虫细胞和哺乳动物来源的已建立的细胞系。适合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[细胞]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、或其衍生物(例如Veggie CHO细胞)和在无血清培养基中生长的相关细胞系(Rasmussen等人,1998,Cytotechnology[细胞工程学]28:31),HeLa细胞、BHK(ATCC

CRL 10) 细胞系、和衍生自非洲绿猴肾细胞系CVI (ATCC CCL 70) 的CVI/EBNA细胞系(如McMahan等人,1991,EMBO J. [欧洲分子生物学学会杂志]10:2821所述)、人胚肾细胞(例如293、293EBNA或MSR 293)、人表皮A431细胞、人Colo205细胞、其他经转化的灵长类动物细胞系、正常二倍体细胞,衍生自初生组织、初生外植体的体外培养的细胞株、HL-60、U937、HaK或Jurkat细胞。任选地,例如当希望在不同信号转导或受体测定中使用多肽时,哺乳动物细胞系,例如HepG2/3B、KB、NIH 3T3或S49可以用于表达所述多肽。

[0119] 可替代地,可能在低等真核生物,例如酵母中,或在原核生物,例如细菌中产生所述多肽。适合的酵母包括酿酒酵母、粟酒裂殖酵母、克鲁维酵母属菌株、假丝酵母属、或能够表达异源多肽的任何酵母菌株。适合的细菌菌株包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门菌、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制备所述多肽,则可能希望修饰本文产生的多肽,例如通过适当位点的磷酸化或糖基化,从而获得功能多肽。可以使用已知的化学方法或酶促方法,完成此类共价衔接。

[0120] 可以通过将本发明的分离的核酸可操作地连接到一个或多个昆虫表达载体中的适合的控制序列并且采用昆虫表达系统,来产生所述多肽。用于杆状病毒/昆虫细胞表达系统的材料和方法是以试剂盒形式从例如英杰公司(Invitrogen),圣迭哥,加利福尼亚州,美国(MaxBac®试剂盒)可商购的,并且此类方法是本领域熟知的,如描述于Summers和Smith,Texas Agricultural Experiment Station Bulletin[德州农业实验站公告],1555期(1987),以及Luckow和Summers,Bio/Technology[生物/技术]6:47(1988)中。可以采用无细胞翻译系统以使用衍生自本文披露的核酸构建体的RNA来产生多肽。用于与细菌、真菌、酵母、和哺乳动物细胞宿主一起使用的适当克隆和表达载体由Pouwels等人描述(Cloning Vectors:A Laboratory Manual[克隆载体:实验室手册],爱思唯尔公司(Elsevier),纽约,1985)。包含优选可操作地连接到至少一个表达控制序列的本发明的分离的核酸的宿主细胞是“重组宿主细胞”。

[0121] 还包括的是编码本文描述的示例性IL-2/TNFR激动剂分子中任一者的分离的核酸。在优选的实施例中,Fc部分和IL-2/TNFR激动剂分子是在单个开放阅读框内编码的,任选地具有在Fc区和IL-2/TNFR激动剂分子之间编码的接头。

[0122] 在另一个方面,本文提供了包含可操作地连接到启动子的以上IL-2/TNFR激动剂分子编码核酸的表达载体。

[0123] 在另一个方面,本文提供了包含编码以上IL-2/TNFR激动剂分子的分离的核酸的宿主细胞。所述宿主细胞可以是原核细胞,例如大肠杆菌,或可以是真核细胞,例如哺乳动物细胞。在某些实施例中,所述宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

[0124] 在另一个方面,本文提供了制备IL-2/TNFR激动剂分子的方法。这些方法包括在其中表达可操作地连接到IL-2/TNFR激动剂分子Fc融合蛋白的启动子的条件下,培养宿主细胞。随后,从所述培养收获IL-2/TNFR激动剂分子Fc融合蛋白。可以从培养基和/或宿主细胞裂解物收获IL-2/TNFR激动剂分子Fc融合蛋白。

[0125] 药物组合物

[0126] 在一些实施例中,本发明提供了药物组合物,该药物组合物包含治疗有效量的IL-2/TNFR激动剂分子连同药学上有效的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。在某些实施例中,IL-2突变蛋白在IL-2/TNFR激动剂分子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。

[0127] 优选地,可接受的配制品物质在所采用的剂量及浓度下对接受者无毒。在特定实施例中,提供了包含治疗有效量的IL-2/TNFR激动剂分子的药物组合物,该IL-2/TNFR激动剂分子含有治疗性分子,例如IL-2/TNFR激动剂分子Fc融合物。

[0128] 在某些实施例中,药物组合物可含有配制品物质以调节、维持或保留例如组合物的pH值、渗透性、粘度、澄明度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸收或渗透。在此类实施例中,合适的配制品材料包括但不限于氨基酸(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(如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);疏松剂(如甘露糖醇或甘氨酸);螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(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;和其他碳水化合物(诸如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、调味剂和稀释剂;乳化剂;亲水聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐抗衡离子(如钠);防腐剂(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(如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(如甘露糖醇或山梨糖醇);助悬剂;表面活性剂或润湿剂(如普朗尼克(pluronic)、PEG、脱水山梨聚糖、聚山梨醇酯(如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯)、氟核、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙星(tyloxapal));稳定性增强剂(如蔗糖或山梨糖醇);张力增强剂(如碱金属卤化物、优选地氯化钠或氯化钾,甘露糖醇,山梨糖醇);递送媒介物;稀释剂;赋形剂和/或药用辅助剂。参见,REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES[雷明登氏药学全书],第18版(A.R.Genrmo编),1990,马克出版公司(Mack Publishing Company)。

[0129] 在某些实施例中,最佳药物组成将由本领域技术人员根据例如施用的预期途径、递送形式和所需剂量来确定。参见,例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES[雷明登氏药学全书],同上。在某些实施例中,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、体内释放率及体内清除率。在某些实施例中,药物组合物中的主要媒介物或载体可以是水性或非水性的。例如,适合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,其可能补充有肠胃外施用组合物中常见的其他物质。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。在特定实施例中,药物组合物包含约pH 7.0-8.5的Tris缓冲液或约pH 4.0-5.5的乙酸盐缓冲液,且可进一步包括山梨糖醇或其适合取代物。在本发明的某些实施例中,IL-2突变蛋白或抗IL-2抗体组合物可以通过将具有所希望纯度的所选组成成分与任选配制剂(REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES[雷明登氏药学全书],同上)混合以冻干饼或水性溶液的形式制备用于储存。此外,在某些实施例中,可使用适当赋形剂(例如蔗糖)将IL-2突变蛋白或抗IL-2抗体产物配制为冻干物。

[0130] 可以选择本发明的药物组合物用于肠胃外递送。可替代地,可选择组合物以用于吸入或用于经由消化道(例如口服)递送。此类药学上可接受的组合物的制备在本领域技术人员的技术范围内。配制品组分优选地以对施用部位可接受的浓度存在。在某些实施例中,使用缓冲液以便将组合物维持在生理pH值或稍低pH值下,典型地在约5至约8的pH值范围内。

[0131] 当考虑肠胃外施用,用于本发明的治疗组合物可以以无热原的、肠胃外可接受

的水性溶液的形式提供,该水性溶液包含在药学上可接受的媒介物中的所需IL-2/TNFR激动剂分子组合物。用于肠胃外注射的特别适合的媒介物是无菌蒸馏水,其中将IL-2/TNFR激动剂分子组合物配制成适当保存的无菌等渗溶液。在某些实施例中,该制备可以包括用试剂配制所需分子,该试剂如可注射微球、生物可侵蚀颗粒、聚合化合物(如聚乳酸或聚乙醇酸)、珠粒或脂质体,它们可提供可经由积存注射递送的控制释放或持续释放。在某些实施例中,也可以使用透明质酸,其具有促进在循环中的持续时间的的作用。在某些实施例中,可使用可植入药物递送装置来引入IL-2/TNFR激动剂分子。

[0132] 其他药物组合物对于本领域技术人员将显而易见,包括呈持续或控制递送配制品形式的涉及IL-2/TNFR激动剂分子组合物的配制品。用于配制各种其他持续或控制递送方式(如脂质体载体、生物可侵蚀微粒或多孔珠粒和积存注射)的技术也是本领域技术人员已知的。参见,例如国际专利申请号PCT/US 93/00829,其通过引用并入本文并描述了用于递送药物组合物的多孔聚合物微粒的控制释放。持续释放制剂可包括成形制品形式的半透性聚合物基质,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质可以包括聚酯、水凝胶、聚丙烯交酯(如美国专利号3,773,919和欧洲专利申请公开号EP 058481中所披露,其每个通过引用并入本文)、L-谷氨酸和 γ -L-谷氨酸乙酯的共聚物(Sidman等人,1983,Biopolymers[生物聚合物]2:547-556)、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer等人,1981,J.Biomed.Mater.Res.[生物医学材料研究杂志]15:167-277和Langer,1982,Chem.Tech.[化学技术]12:98-105)、乙烯乙酸乙烯酯(Langer等人,1981,同上)或聚-D(-)-3-羟基丁酸(欧洲专利申请公开号EP 133,988)。持续释放组合物还可包括可通过本领域已知的几种方法中的任一种制备的脂质体。参见,例如Eppstein等人,1985,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]82:3688-3692;欧洲专利申请公开号EP 036,676;EP 088,046及EP 143,949,这些参考文献通过引用并入。

[0133] 用于体内施用的药物组合物典型地呈无菌制剂形式提供。灭菌可以通过经由无菌滤膜的过滤来完成。当组合物冻干时,可以在冻干和重构之前或之后进行使用该方法的灭菌。用于肠胃外施用的组合物可以以冻干形式或以溶液储存。肠胃外组合物通常置于具有无菌入口的容器中,例如具有可由皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。

[0134] 本发明的方面包括自缓冲的IL-2/TNFR激动剂分子配制品,其可以用作药物组合物,如国际专利申请W0 06138181 A2(PCT/US 2006/022599)中所述,将其通过引用以其全文并入本文。

[0135] 如以上讨论的,某些实施例提供了IL-2/TNFR激动剂分子组合物,特别是药物IL-2/TNFR激动剂分子Fc融合蛋白,除了该IL-2/TNFR激动剂分子组合物外,其还包含一种或多种赋形剂,例如在这一部分和本文其他地方说明性描述的那些。赋形剂关于这一方面可在本发明中用于多种目的,如调节配制品的物理、化学或生物学特性(如调节粘度),和或用于提高效力和或稳定这种配制品的工艺以及对抗由于例如在制造、运输、储存、使用前制备、施用及其后的工艺中发生的应力引起的降解和腐败的工艺。

[0136] 有多种关于蛋白质稳定和制剂材料以及在这方面有用的方法的论述,例如Arakawa等人,“Solvent interactions in pharmaceutical formulations[药物配制品中的溶剂相互作用],”Pharm Res.[药物研究]8(3):285-91(1991);Kendrick等人,“Physical stabilization of proteins in aqueous solution[蛋白质在水溶液中的物理稳定],”在

RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS:THEORY AND PRACTICE[稳定的蛋白质制剂的合理设计:理论与实践],Carpenter and Manning编辑Pharmaceutical Biotechnology[药物生物技术].13:61-84(2002),和Randolph等人,“Surfactant-protein interactions[表面活性剂-蛋白质相互作用],”Pharm Biotechnol[药物生物技术].13:159-75(2002),其每一个均通过引用以其全文并入本文,特别是涉及与根据本发明的自缓冲蛋白配制品的赋形剂及其制备方法有关的部分,尤其是用于兽医和/或人医学用途的蛋白质药物产品和方法。

[0137] 根据本发明的某些实施例盐类可用于例如调节配制品的离子强度和/或等渗性和/或改善蛋白质或根据本发明的组合物的其他成分的溶解性和/或物理稳定性。

[0138] 众所周知,离子可以通过与蛋白质表面上的带电荷的残基结合并通过屏蔽蛋白质中的带电荷基团和极性基团并降低其静电相互作用、吸引和排斥相互作用的强度来稳定蛋白质的天然状态。离子还可以通过结合特别是蛋白质的变性肽键(-CONH)来稳定蛋白质的变性状态。此外,离子与蛋白质中带电和极性基团的相互作用还可以减少分子间静电相互作用,从而防止或减少蛋白质聚集和不溶性。

[0139] 离子种类对蛋白质的影响差异很大。已经开发了离子及其对蛋白质的影响的许多分类排名,所述蛋白质可用于配制根据本发明的药物组合物。一个实例是Hofmeister系列,其通过离子和极性非离子溶质对溶液中蛋白质的构象稳定性的影响对该离子和极性非离子溶质进行排名。稳定溶质称为“亲液的”。不稳定溶质称为“离液的”。通常使用高浓度的亲液剂(例如,>1摩尔硫酸铵)以从溶液中沉淀蛋白质(“盐析”)。通常使用离液剂来使蛋白质变性和/或溶解(“盐溶”)。离子对“盐溶”和“盐析”的相对有效性限定了其在Hofmeister系列中的位置。

[0140] 根据本发明的多种实施例,游离氨基酸可用于IL-2/TNFR激动剂分子配制品中作为疏松剂、稳定剂和抗氧化剂以及其他标准用途。赖氨酸、脯氨酸、丝氨酸和丙氨酸可用于稳定配制品中的蛋白质。甘氨酸可用于冻干以确保正确的饼结构和特性。在液体和冻干配制品二者中,精氨酸可用于抑制蛋白质聚集。甲硫氨酸可用作抗氧化剂。

[0141] 多元醇包括糖(例如甘露醇、蔗糖和山梨醇)和多羟基醇(例如甘油和丙二醇)以及出于本文讨论的目的,包括聚乙二醇(PEG)和相关物质)。多元醇是亲液的。它们是液体和冻干配制品二者中有用的稳定剂,以保护蛋白质免受物理和化学降解过程的影响。多元醇也可用于调节配制品的张力。

[0142] 可用于本发明的选择实施例的多元醇是甘露醇,其通常用于确保冻干配制品中饼的结构稳定性。它确保了对于饼的结构稳定性。甘露醇通常与冻干保护剂一起使用,例如蔗糖。山梨醇和蔗糖是用于调节张力的优选试剂并且用作在运输期间或制造工艺期间制备散剂期间防止冻融应力的稳定剂。还原糖(其含有游离醛或酮基团)如葡萄糖和乳糖可以糖化表面赖氨酸和精氨酸残基。因此,它们通常不是根据本发明使用的优选多元醇。此外,形成这种反应性种类的糖如蔗糖在酸性条件下水解成果糖和葡萄糖并因此产生糖化,这种糖在这一方面也不是本发明优选的多元醇。PEG可用于稳定蛋白质和用作冷冻保护剂,并且在这一方面可用于本发明。

[0143] IL-2/TNFR激动剂分子配制品的实施例进一步包含表面活性剂。蛋白质分子可能易于在表面上吸附并且易于在气-液、固-液和液-液界面处变性和随后聚集。这些效应通常

与蛋白质浓度成反比。这些有害的相互作用通常与蛋白质浓度成反比，并且通常通过物理搅动(如在运输和处理产品的过程产生的物理搅动)加剧。

[0144] 表面活性剂通常用于防止、最小化或减少表面吸附。在这一方面，本发明中有用的表面活性剂包括聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、脱水山梨醇聚乙氧基化物的其他脂肪酸酯和泊洛沙姆188。

[0145] 表面活性剂也常用于控制蛋白质构象稳定性。在这一方面，表面活性剂的使用是蛋白质特异性的，因为任何给定的表面活性剂通常会稳定一些蛋白质而使其他蛋白质不稳定。

[0146] 聚山梨醇酯易受氧化降解的影响，并且通常如所提供的含有足够量的过氧化物以引起蛋白质残基侧链(尤其是甲硫氨酸)的氧化。因此，应小心采用聚山梨醇酯，使用时应使用最低有效浓度。在这一方面，聚山梨醇酯例证了赋形剂应以其最低有效浓度使用的一般规则。

[0147] IL-2/TNFR激动剂分子配制品的实施例进一步包含一种或多种抗氧化剂。在一定程度上，通过维持适当水平的环境氧和温度并避免光照，可以防止药物配制品中蛋白质的有害氧化。抗氧化赋形剂也可用于防止蛋白质的氧化降解。在这一方面，有用的抗氧化剂是还原剂、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配制品的抗氧化剂优选为水溶性的并且在产品的整个保质期内保持其活性。在这一方面，EDTA是根据本发明的优选抗氧化剂。

[0148] 抗氧化剂可以破坏蛋白质。例如，还原剂如谷胱甘肽特别可以破坏分子内二硫连接。因此，用于本发明的抗氧化剂除其他方面外被选择用于消除或充分降低它们自身损害配制品中蛋白质的可能性。

[0149] 根据本发明的配制品可包含金属离子，其是蛋白质辅因子并且是形成蛋白质配位络合物所必需的，如形成某些胰岛素悬浮液所必需的锌。金属离子也可以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。

[0150] 镁离子(10-120mM)可用于抑制天冬氨酸异构化为异天冬氨酸。 Ca^{+2} 离子(高达100mM)可以增加人脱氧核糖核酸酶的稳定性。然而， Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 和 Zn^{+2} 可使rhDNase不稳定。类似地， Ca^{+2} 和 Sr^{+2} 可以稳定因子VIII，它可以被 Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 和 Zn^{+2} 、 Cu^{+2} 和 Fe^{+2} 去稳定化，并且该稳定因子的聚集可以通过 Al^{+3} 离子强化。

[0151] IL-2/TNFR激动剂分子配制品的实施例进一步包含一种或多种防腐剂。当开发涉及从同一容器中多于一次取出的多剂量肠胃外配制品时，防腐剂是必需的。它们的主要功能是在药物产品的整个保质期或使用期限内抑制微生物生长并确保产品无菌。常用的防腐剂包括苯甲醇、苯酚和间甲酚。虽然防腐剂与小分子肠胃外药物一起使用已经很长的历史，但包含防腐剂的蛋白质配制品的开发可能具有挑战性。防腐剂几乎总是对蛋白质具有不稳定作用(聚集)，并且这已经成为限制它们在多剂量蛋白质配制品中的使用的主要因素。迄今为止，大多数蛋白质药物仅配制成一次性使用。然而，当多剂量配制品成为可能时，它们具有使患者方便和增加适销性的附加优点。一个很好的实例是人类生长激素(hGH)的防腐剂，其中保存配制品的开发已导致更方便、多用途的注射笔呈现的商业化。目前市场上可提供至少四种含有保存的hGH配制品的这种笔设备。Norditropin(液体，诺和诺德公司(Novo Nordisk))、Nutropin AQ(液体，基因泰克公司(Genentech))和Genotropin(冻干的--双室

药筒,法玛西亚普强公司(Pharmacia&Upjohn)含有苯酚,而Somatropo(礼来公司(Eli Lilly))用间-甲酚进行配制。

[0152] 在保存剂型的配制和开发过程中需要考虑几个方面。必须优化药物产品中的有效防腐剂浓度。这需要在剂型中测试给定防腐剂的浓度范围,该防腐剂的浓度范围赋予了抗微生物有效性而不损害蛋白质稳定性。

[0153] 在另一个方面,本发明提供了冻干配制品中的IL-2/TNFR激动剂分子或IL-2/TNFR激动剂分子的Fc融合物。冷冻干燥的产品可以在没有防腐剂的情况下冻干,并在使用时用含有防腐剂的稀释剂重构。这缩短了防腐剂与蛋白质接触的时间,从而显著降低了相关的稳定性风险。在液体配制品的情况下,防腐剂的有效性和稳定性应在整个产品保质期(约18至24个月)内保持。需要注意的一点是,防腐剂的有效性应该在含有活性药物和所有赋形剂组分的最终配制品中证实。

[0154] IL-2/TNFR激动剂分子配制品通常将被设计用于特定的施用途径和方法、特定的施用剂量和频率、特定疾病的特定治疗、具有生物利用度和持久性的范围等。因此,可以根据本发明设计配制品,以通过任何适合的途径(包括但不限于口服、耳内、眼科、直肠、和阴道)以及通过肠胃外途径(包括静脉内和动脉内注射、肌内注射、和皮下注射)递送。

[0155] 一旦配制好药物组合物,它可以作为溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体、晶体或作为脱水或冻干粉末储存在无菌小瓶中。此类配制品可以以即用形式或以在施用之前重构的形式(例如,冻干的)储存。本发明还提供了用于产生单剂量施用单元的药剂盒。本发明的药剂盒可各自含有具有干燥蛋白质的第一容器和具有水性配制品的第二容器二者。在本发明的某些实施例中,提供了含有单室和多室预填充注射器(例如液体注射器和冻干注射器)的药剂盒。

[0156] 待采用的含有IL-2/TNFR激动剂分子的药物组合物的治疗有效量将取决于例如治疗背景和目的。本领域技术人员将理解,治疗的适当剂量水平将部分地取决于递送的分子、针对其使用IL-2/TNFR激动剂分子的适应症、施用途径、以及患者的大小(体重、体表面积或器官大小)和/或状况(年龄和一般健康状况)。在某些实施例中,临床医师可滴定剂量且修改施用途径以获得最佳治疗效果。根据上述因素,典型的剂量范围可以为约0.1 μ g/kg至高达约1mg/kg或更高。在特定实施例中,剂量范围可以为从0.5 μ g/kg至高达约100 μ g/kg,任选地从2.5 μ g/kg至高达约50 μ g/kg。

[0157] 治疗有效量的IL-2/TNFR激动剂分子优选导致疾病症状的严重程度降低、疾病无症状期的频率或持续时间增加或预防由于疾病痛苦引起的损伤或残疾。

[0158] 可以使用医疗设备施用药物组合物。用于施用药物组合物的医疗装置的实例描述于美国专利号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,均通过引用并入本文。

[0159] 在一个实施例中,提供了药物组合物,其包含

[0160] 治疗自身免疫性障碍或炎性障碍的方法

[0161] 在某些实施例中,将本发明的IL-2/TNFR激动剂分子用于治疗自身免疫性障碍或炎性障碍。在优选的实施例中,使用了IL-2/TNFR激动剂分子Fc融合蛋白。

[0162] 特别适于用本文披露的IL-2突变蛋白或抗IL-2抗体治疗的障碍包括但不限于炎

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、青少年关节炎、青少年类风湿关节炎、少关节型青少年类风湿关节炎、多关节型青少年类风湿关节炎、全身性发作青少年类风湿关节炎、青少年强直性脊柱炎、青少年肠病性关节炎、青少年反应性关节炎、青少年莱特尔氏综合征(juvenile Reiter's Syndrome)、SEA综合征(血清阴性、接骨点病变、关节病综合征)、青少年皮炎、青少年银屑病关节炎、青少年硬皮病、青少年系统性红斑狼疮、青少年血管炎、少关节型类风湿关节炎、多关节型类风湿关节炎、全身性发作类风湿关节炎、强直性脊柱炎、肠病性关节炎、反应性关节炎、莱特尔氏综合征(Reiter's Syndrome)、皮炎、银屑病关节炎、硬皮病、血管炎、肌炎、多发性肌炎、皮炎、结节性多动脉炎、韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、动脉炎、风湿性多肌痛、结节病、硬化、原发性胆道硬化症、硬化性胆管炎、舍格伦综合征、银屑病、斑块状银屑病、滴状牛皮癣、皮褶牛皮癣、脓疱性银屑病、红皮性银屑病、皮炎、特应性皮炎、动脉粥样硬化、狼疮、斯提耳氏病(Still's disease)、系统性红斑狼疮(SLE)、重症肌无力、炎症性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、乳糜泻、多发性硬化(MS)、哮喘、COPD、鼻窦炎、具有息肉的鼻窦炎、嗜酸细胞性食管炎、嗜酸细胞性支气管炎、格林-巴利病(Guillain-Barre disease)、I型糖尿病、甲状腺炎(例如格雷夫斯氏病(Graves'disease))、艾迪生病(Addison's disease)、雷诺现象(Raynaud's phenomenon)、自身免疫性肝炎、GVHD、移植排斥、肾损伤、丙型肝炎诱导的血管炎、自发性妊娠丢失等。

[0163] 在优选的实施例中,自身免疫性障碍或炎性障碍是系统性红斑狼疮(SLE)、移植物抗宿主疾病、丙型肝炎诱导的血管炎、I型糖尿病、类风湿性关节炎、多发性硬化、自发性妊娠丢失、特应性疾病和炎症性肠病,包括溃疡性结肠炎、乳糜泻。

[0164] 在另一个实施例中,使用IL-2/TNFR激动剂分子(例如,本文披露的IL-2/TNFR激动剂分子,例如本文公开的IL-2/TNFR激动剂分子Fc融合物)治疗患有自身免疫或炎性障碍的或有发展自身免疫或炎性障碍风险的患者,并且监测患者对治疗的反应。监测的患者的应答可以是患者对治疗的任何可检测的或可测量的应答,或此类应答的任何组合。例如,应答可以是患者的生理状态的变化,例如体温或发热、癖好、出汗、头痛、恶心、疲劳、饥饿、口渴、精神敏感度等。可替代地,应答可以是在取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、肽、或核酸)的量方面的变化。在一个实施例中,如果患者具有对治疗的或可检测的或可测量的应答,或如果此类应答超过了特定阈值,则改变患者的治疗方案。该改变可以是给药频率的减少或增加、或每次给药施用的IL-2/TNFR激动剂分子的量的减少或增加,或给药的“假期”(即治疗的暂时停止,持续指定时段,或直至治疗医生决定治疗应继续,或直至患者的监测的应答表明治疗应恢复或可以恢复),或治疗终止。在一个实施例中,应答是患者的温度或CRP水平的变化。例如,应答可以是患者的体温升高,或外周血的样品中的CRP水平升高,或二者。在一个特定实施例中,如果在治疗的过程期间,患者的体温升高至少 0.1° 、 0.2° 、 0.3° 、 0.4° 、 0.5° 、 0.7° 、 1° 、 1.5° 、 2° 、或 2.5°C ,则患者的治疗减少、暂停、或终止。在另一个特定实施例中,如果在治疗的过程期间,患者的外周血的样品中CRP的浓度增加至少 0.1 、 0.2 、 0.3 、 0.4 、 0.5 、 0.7 、 1 、 1.5 、或 2mg/mL ,则患者的治疗减少、暂停、或终止。可以在决定是否修改、减少、暂停、或终止治疗时监测和使用的其他患者反应包括以下的发展或恶化:毛细血管渗漏综合症(低血压和心血管不稳定)、受损的嗜中性粒细胞功能(例如造成或检测到感染的发展或恶化)、血小板减少、血栓性血管病、注射位点反应、血管炎(例如

丙型肝炎病毒血管炎)、或炎性症状或疾病。可以在决定是否修改、减少、增加、暂停、或终止治疗时监测和使用的另外的患者反应包括以下的数量的增加: 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。可以检测这些细胞类型的增加,例如,作为每单位的外周血的此类细胞的数量增加(例如,表示为每毫升血液的细胞的增加),或作为与血液样品中另一类型的一个或多个细胞相比,此类细胞类型的百分比的增加。可以监测的另一种患者反应是患者的外周血的样品中,CD25⁺细胞上细胞表面结合的IL-2/TNFR激动剂分子的量的增加。

[0165] 扩增Treg细胞的方法

[0166] 可以使用IL-2/TNFR激动剂分子或IL-2/TNFR激动剂分子Fc融合蛋白来扩增受试者或样品内的Treg细胞。本文提供了增加Treg与非调节性T细胞的比率的方法。该方法包括使T细胞的群体与有效量的人IL-2/TNFR激动剂分子或IL-2/TNFR激动剂分子Fc融合物接触。所述比率可以通过以下来测量:确定T细胞的群体内CD3⁺FOXP3⁺细胞与CD3⁺FOXP3⁻细胞的比率。在人血液中,典型的Treg频率是总CD4⁺CD3⁺T细胞的5%-10%,然而,在以上列出的疾病中,此百分比可以是更低或更高。在优选的实施例中,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的最大倍数增加可以变化;然而,通过IL-2突变蛋白治疗可能获得的最大Treg频率是50%或60%的总CD4⁺CD3⁺T细胞。在某些实施例中,将IL-2/TNFR激动剂分子或IL-2/TNFR激动剂分子Fc融合蛋白施用至受试者,并且在受试者的外周血内的调节性T细胞(Treg)与非调节性T细胞的比率增加。

[0167] 因为与其他细胞类型相比,IL-2/TNFR激动剂分子和IL-2/TNFR激动剂分子Fc融合蛋白以及IL-2和TNFR的其他组合优先扩增Treg,因此它们可用于增加受试者的外周血中调节性T细胞(Treg)与自然杀伤(NK)细胞的比率和/或Treg与细胞毒性T细胞(Tcon)的比率。所述比率可以通过以下来测量:确定CD3⁺FOXP3⁺细胞与CD16⁺和/或CD56⁺淋巴细胞(其是CD19⁻且CD3⁻)的比率。此外,出人意料地发现,与其他细胞类型相比,IL-2/TNFR激动剂分子和IL-2/TNFR激动剂分子Fc融合蛋白以及IL-2和TNFR的组合不仅是优先扩增Treg,而且还降低了其他细胞类型(包括Tcon,例如CD4⁺和/或CD8⁺Tcon和/或NK细胞)的水平。在一些实施例中,Tcon(例如CD4⁺和/或CD8⁺Tcon和/或NK细胞)的水平低于仅施用IL-2后这些细胞的水平。在一些实施例中,降低的水平是10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或更多。在一些实施例中,Tcon(例如CD4⁺和/或CD8⁺Tcon和/或NK细胞)的水平低于基线的水平(例如,实例2和图6中的对照)。在一些实施例中,降低的水平是10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或更多。

[0168] 预期IL-2/TNFR激动剂分子或IL-2/TNFR激动剂分子Fc融合蛋白可能对于患者的疾病或障碍具有治疗效果,而不显著提高患者的外周血内的Treg与非调节性T细胞或NK细胞的比率。所述治疗效果可以归因于在炎症或自身免疫的部位处的IL-2/TNFR激动剂分子或IL-2/TNFR激动剂分子Fc融合蛋白的局部活性。

[0169] 实例

[0170] 提供以下实例(实际的和预测的二者)是为了说明本发明的具体实施例或特征,而不是为了限制其范围。

[0171] 实例1--TNFR和IL-2R的组合激动作用促进Treg细胞扩增

[0172] 为了确定TNFR和IL-2R刺激的效果,用细胞微量紫标记人外周血单核细胞,并且用各种TNFR激动剂(抗OX40、抗DR3、TNF)和IL-2处理,并且4天后进行分析。用抗CD3刺激的细胞显示出强劲的增殖,并且充当测定的阳性对照。用IL2或对照IgG刺激不会导致任何CTV稀释。单独使用任何指定的TNFR激动剂均未观察到增殖。如CTV稀释所示,使用抗OX40和IL2的组合刺激可以导致Treg细胞增殖。

[0173] 根据制造商的说明,用细胞微量紫(英杰公司)标记来自健康人供体的PBMC,并且在x-vivo 15培养基(龙沙公司(Lonza))中培养。试剂获得自以下来源:TNF(R&D系统公司)、抗DR3(百进公司(BioLegend))和抗OX40(具有SEQ ID NO:9的重链序列和SEQ ID NO:10的轻链序列)。样品在Symphony流式细胞仪(BD生物科学公司(BD Biosciences))上进行分析,并且使用Flojo软件进行数据分析。

[0174] 图1显示了IL-2与TNFR激动剂(抗OX40、重组TNF或抗DR3)组合刺激后,Treg的增殖。(A)用指示试剂刺激细胞微量紫(CTV)标记的人PBMC持续4天,随后进行流式细胞术分析。直方图按以下顺序排列(从下到上):未刺激,用1 μ g/ml抗CD3、20U/ml IL-2、IgG、TNFR激动剂(抗OX40、重组TNF、抗DR3)、TNFR激动剂加IL-2刺激。对Treg细胞(CD4+Foxp3+)进行直方图门控。只有阳性对照抗CD3图和TNFR激动剂的组合(抗OX40、重组TNF和抗DR3)显示出Treg的增殖。图2显示了PBMC上抗OX40和IL-2的直方图。图3显示了PBMC上TNF和IL-2的直方图。图4显示了PBMC上抗DR3和IL-2的直方图。图5显示了PBMC上抗GITR和IL-2的直方图。

[0175] 实例2-TNFR和IL-2R的组合激动作用促进Treg细胞扩增的体内研究

[0176] 给予C57/B16小鼠(n=6)1mg/kg的小鼠IL-2突变蛋白、抗OX40或抗OX40-IL2,并且在第4天(n=3)或第15天(n=3)收获脾、淋巴结和肺。本研究产生的分子的实例如图6所示。分子#3用于本文的具体研究。将PBS处理的小鼠用作对照。研究了这些处理对指示细胞群体的频率的影响。Treg被鉴定为CD4+Foxp3+,活化T细胞被鉴定为CD4+Foxp3-CD25+,活化CD8被鉴定为CD8+CD44+,并且NK/ILC被鉴定为CD4-CD8-NK1.1+。结果代表了两个独立的实验。数据显示为相对于对照(值设置为1)的扩增倍数。

[0177] 结果显示于图7中。单独用IL2处理导致Treg细胞在几种组织中扩增;然而,也观察到活化的CD4和CD8细胞以及NK细胞的频率增加。与IL2相比,抗OX40处理也导致类似规模的Treg扩增,而对其他免疫细胞类型没有太大影响。与单独使用IL2或抗OX40相比,抗OX40-IL2融合物施用导致Treg细胞的远远更高倍数的扩增,而对其他细胞的影响最小。此外,与其他处理相比,抗OX40-IL2融合物介导的Treg细胞扩增持续时间更长,表明在脾和肺组织中单独针对IL2或OX40的效应大于累加效应。

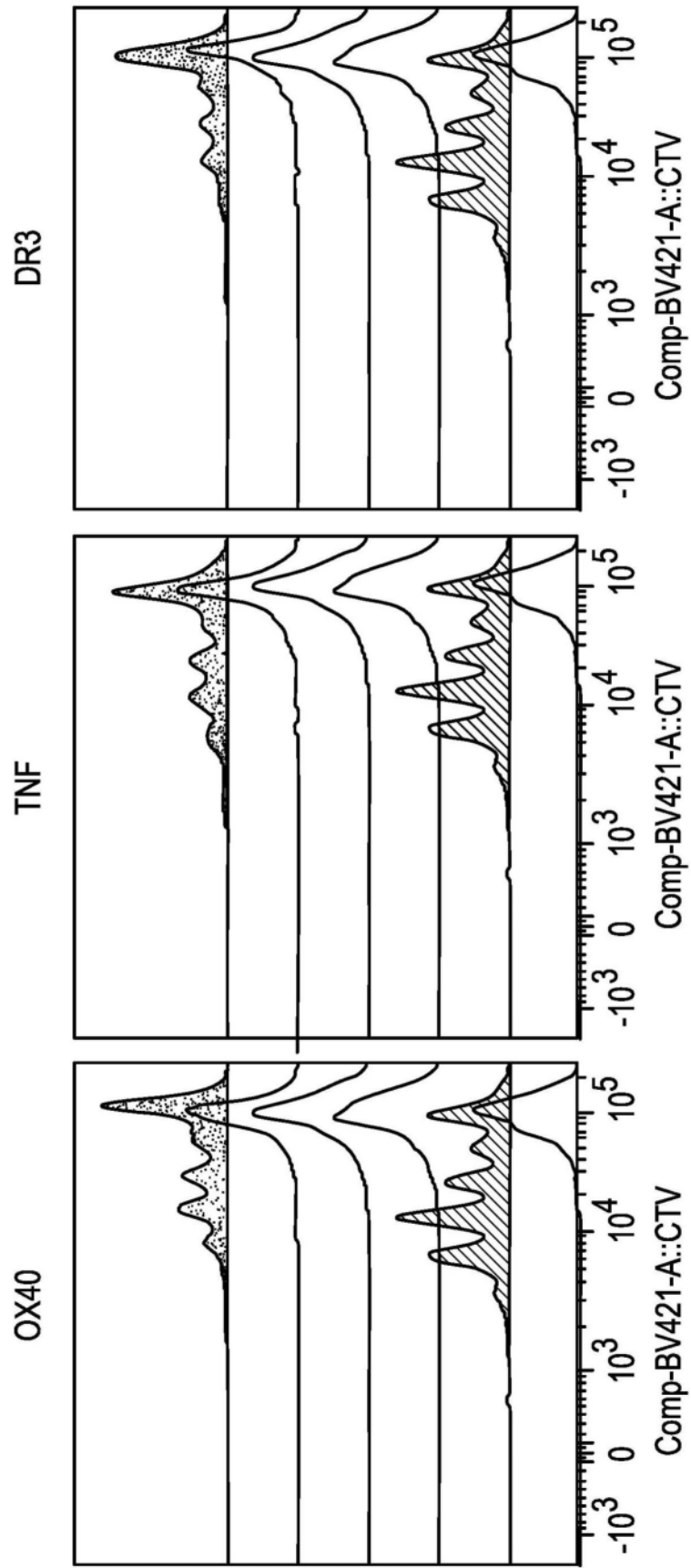


图1

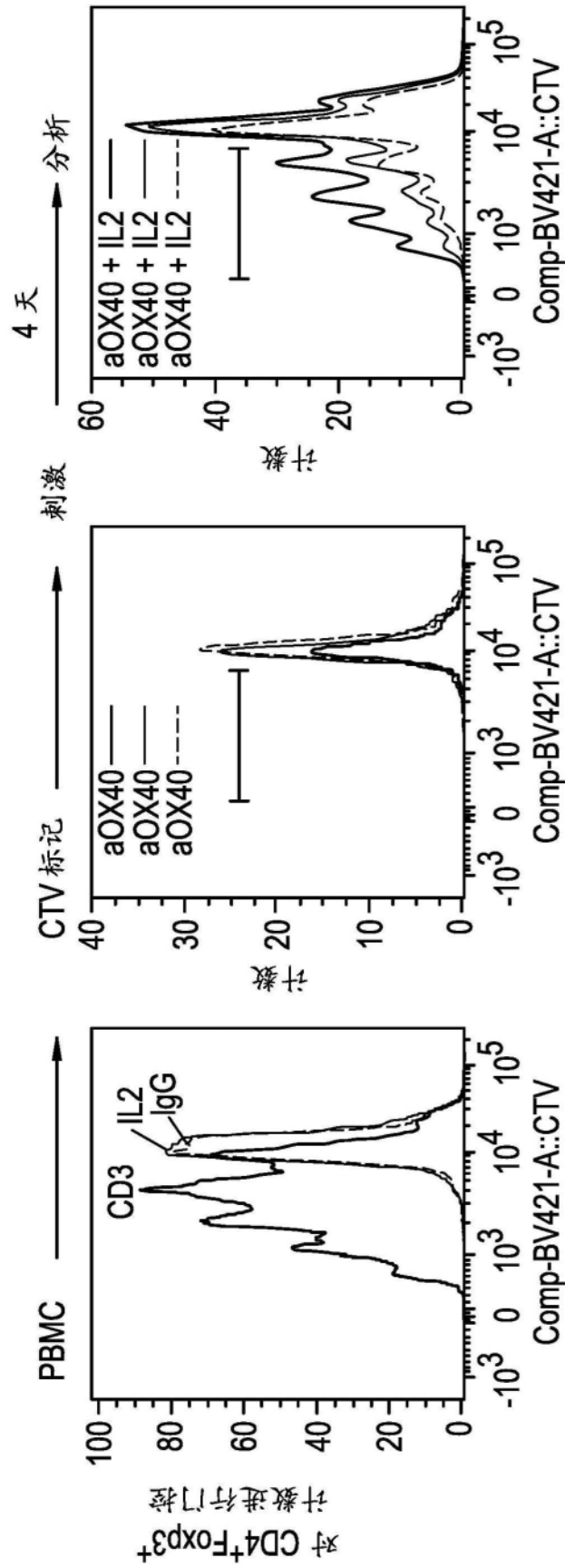


图2A

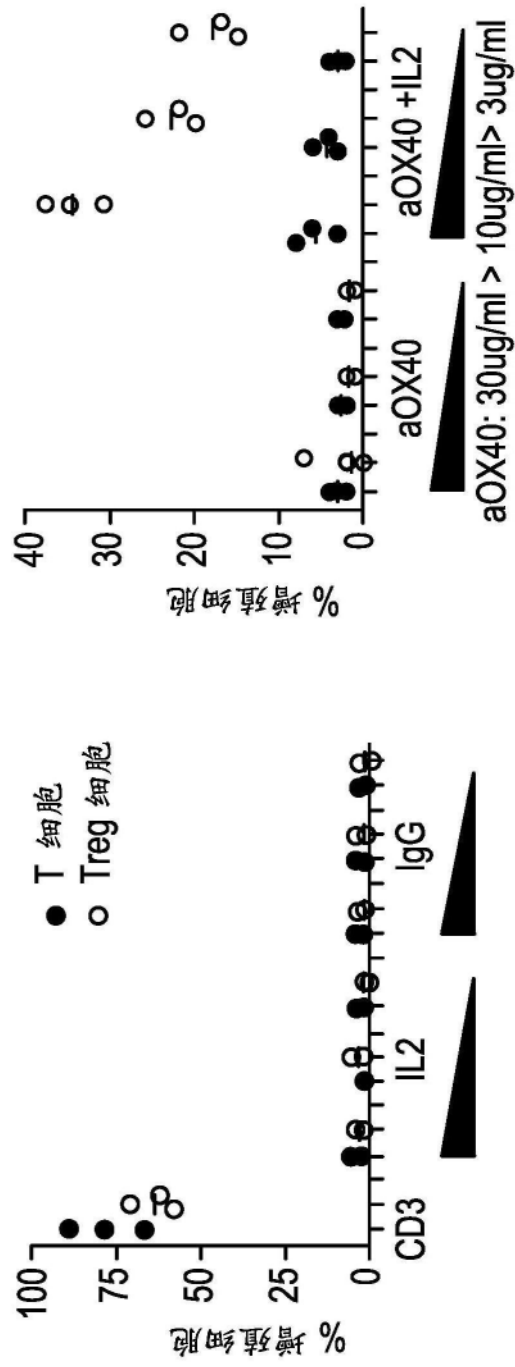


图2B

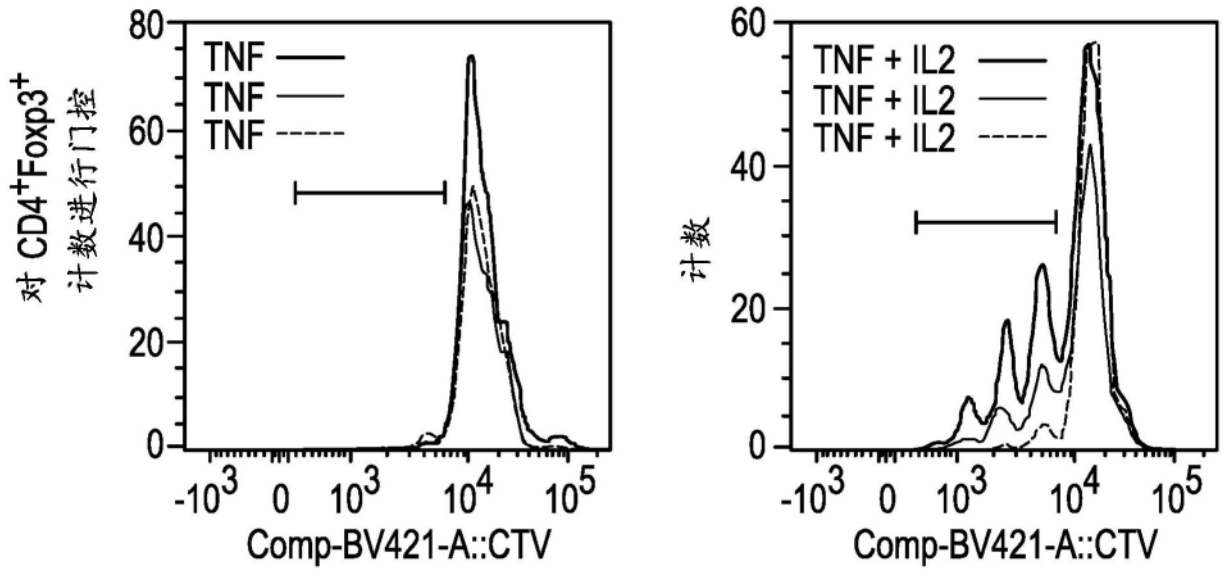


图3A

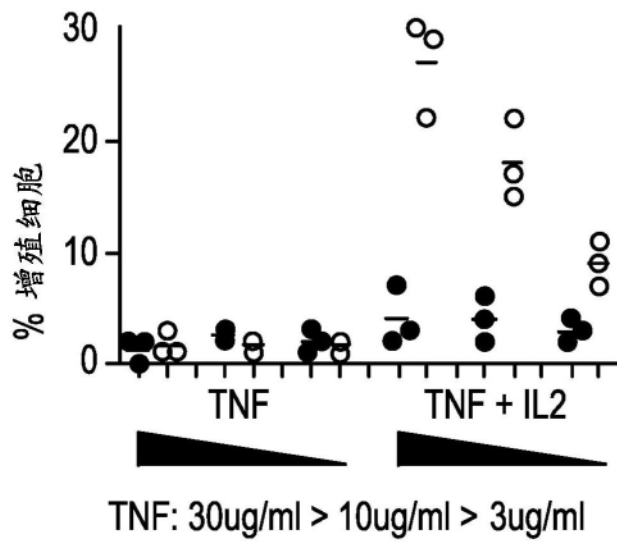


图3B

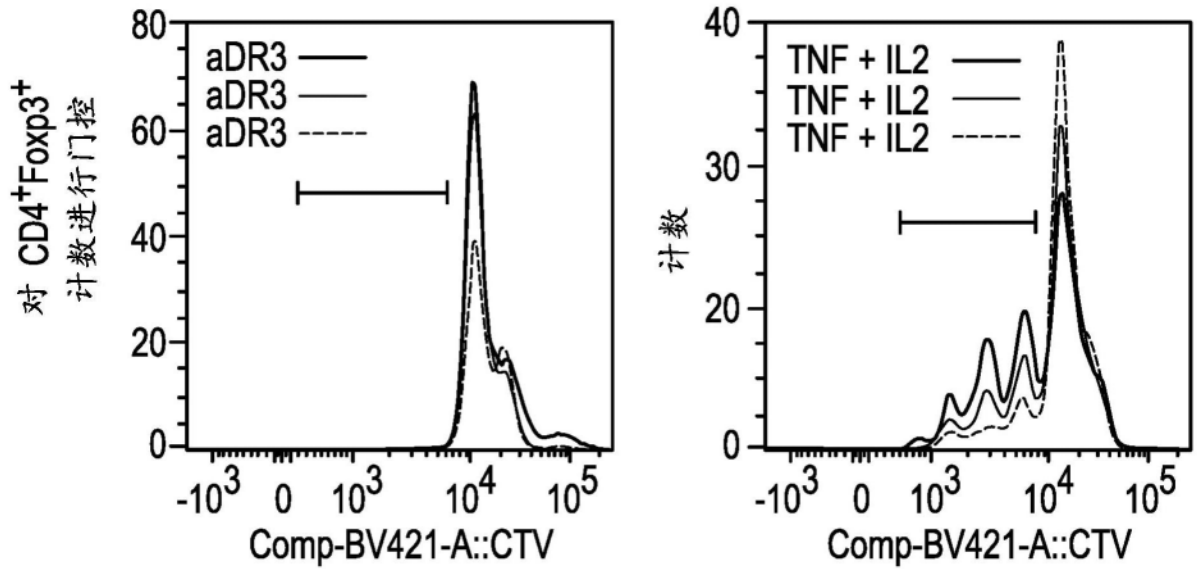


图4A

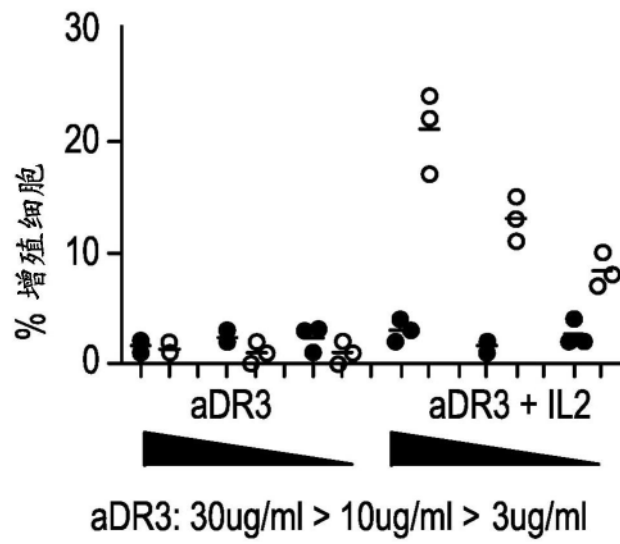


图4B

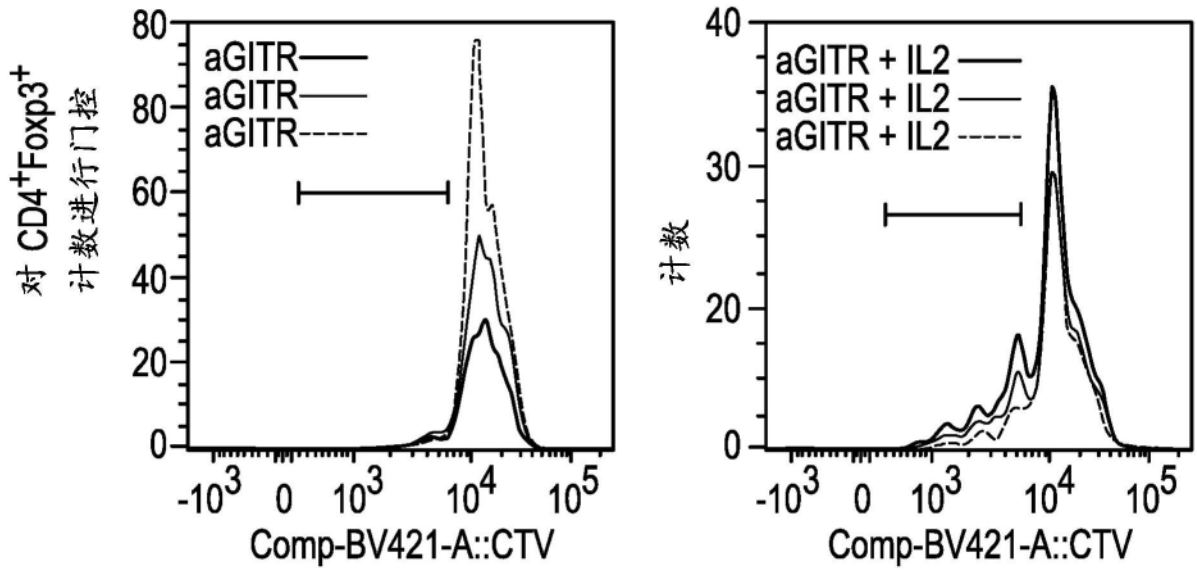


图5A

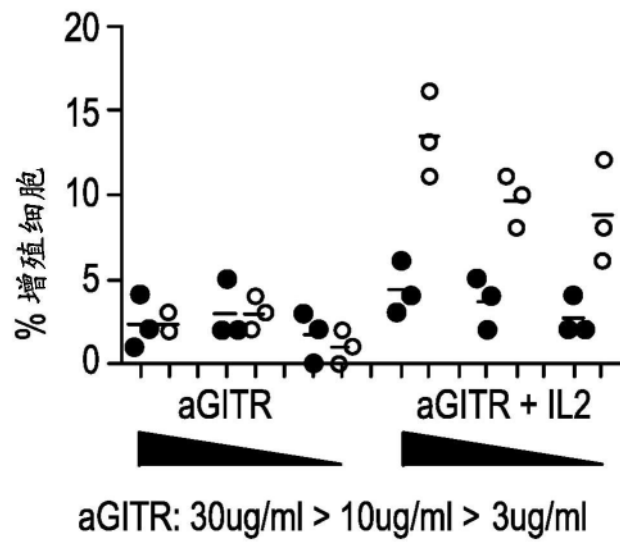


图5B

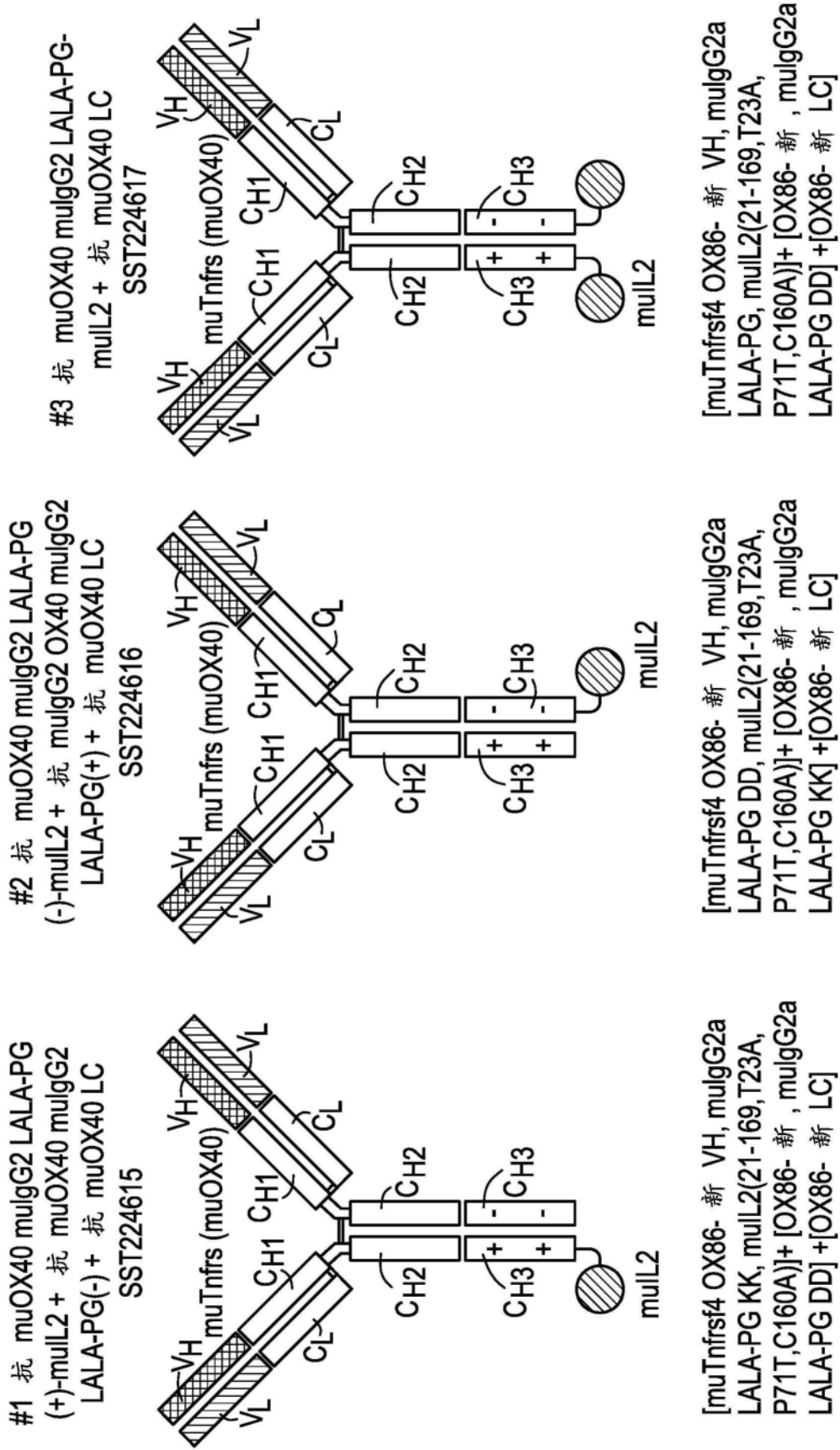


图6

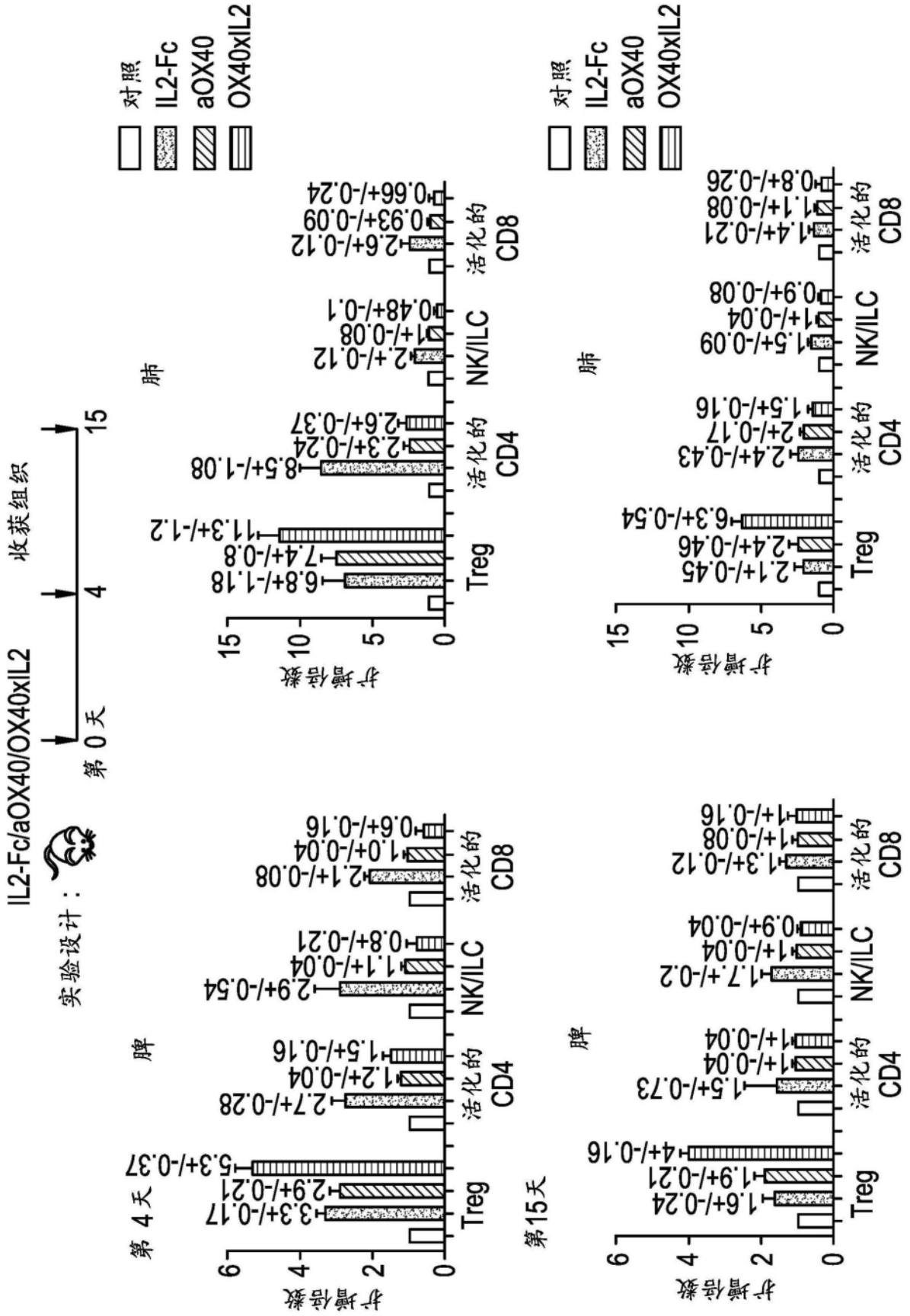


图7