



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117003887 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 07

(21) 申请号 202310831443.4

(22) 申请日 2018.03.29

(30) 优先权数据

17164533.6 2017.04.03 EP

(62) 分案原申请数据

201880017251.7 2018.03.29

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 L·科达里·迪克 C.克雷恩

L·劳埃纳 V.G.尼科里尼

S·西伯 P·尤马纳

I·瓦尔德豪尔

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理人 岑晓东

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书72页

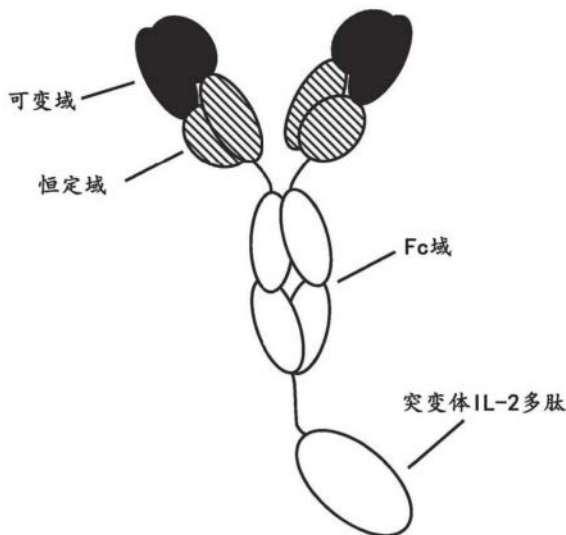
序列表(电子公布) 附图37页

(54) 发明名称

抗PD-1抗体与突变体IL-2或与IL-15的免疫缀合物

(57) 摘要

本发明涉及抗PD-1抗体与突变体IL-2或与IL-15的免疫缀合物。本发明一般涉及免疫缀合物,特别是包含突变体白介素-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物。另外,本发明涉及编码该免疫缀合物的多核苷酸分子,和包含此类多核苷酸分子的载体和宿主细胞。本发明进一步涉及用于生成该突变体免疫缀合物的方法,包含它们的药学组合物,及其用途。



1. 一种免疫缀合物,其包含(i)结合PD-1的抗体和(ii)经由IL-2R $\beta$   $\gamma$  发信号的多肽,特别是IL-2多肽或IL-15多肽。
2. 依照权利要求1的免疫缀合物,其中该IL-2多肽是突变体IL-2多肽,其中该突变体IL-2多肽是包含氨基酸替代F42A, Y45A和L72G (编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO:19)的人IL-2分子。
3. 一种或多种分离的多核苷酸,其编码权利要求2的免疫缀合物。
4. 一种宿主细胞,其包含权利要求3的多核苷酸。
5. 一种生成包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物的方法,其包含(a)在适合于表达该免疫缀合物的条件下培养权利要求4的宿主细胞,并任选地(b)回收该免疫缀合物。
6. 一种包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物,其是通过权利要求5的方法生成的。
7. 一种药学组合物,其包含权利要求2或6的免疫缀合物和药学可接受载剂。
8. 权利要求2或6的免疫缀合物在制造用于治疗疾病的药物中的用途。
9. 一种治疗个体中的疾病的方法,其包含对所述个体施用治疗有效量的包含处于药学可接受形式的权利要求2或6的免疫缀合物的组合物。
10. 一种刺激个体的免疫系统的方法,其包含对所述个体施用有效量的包含处于药学可接受形式的权利要求2或6的免疫缀合物的组合物。

## 抗PD-1抗体与突变体IL-2或与IL-15的免疫缀合物

[0001] 本申请是申请日为2018年03月29日、中国申请号为201880017251.7、发明名称为“抗PD-1抗体与突变体IL-2或与IL-15的免疫缀合物”的发明申请的分案申请。

### 发明领域

[0002] 本发明一般涉及免疫缀合物,特别是包含突变体白介素-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物。另外,本发明涉及编码该免疫缀合物的多核苷酸分子,和包含此类多核苷酸分子的载体和宿主细胞。本发明进一步涉及用于生成该突变体免疫缀合物的方法,包含它们的药学组合物,及其用途。

### [0003] 发明背景

[0004] 白介素-2(IL-2),也称作T细胞生长因子(TCGF),是一种15.5kDa球状糖蛋白,在淋巴细胞生成,存活和稳态中发挥中枢作用。它具有133个氨基酸的长度且由形成它的功能必不可少的四级结构的四个反平行的两亲性的 $\alpha$ 螺旋组成(Smith,Science 240,1169-76(1988);Bazan,Science 257,410-413(1992))。来自不同物种的IL-2的序列可见于NCBI RefSeq No.NP000577(人),NP032392(小鼠),NP446288(大鼠)或NP517425(黑猩猩)。

[0005] IL-2通过结合IL-2受体(IL-2R)来介导它的作用,后者由多至三个个别亚基组成,它们的不同联合能生成在它们对IL-2的亲合力方面不同的受体形式。 $\alpha$ (CD25), $\beta$ (CD122),和 $\gamma$ ( $\gamma_c$ ,CD132)亚基的联合产生三聚体的,高亲和力的IL-2受体。由 $\beta$ 和 $\gamma$ 亚基组成的二聚体的IL-2受体称作中等亲合力IL-2R。 $\alpha$ 亚基形成单体的低亲合力IL-2受体。虽然二聚体的中等亲合力IL-2受体以比三聚体的高亲合力受体大约低100倍的亲合力结合IL-2,但是二聚体的和三聚体的IL-2受体变体均能够在IL-2结合后传递信号(Minami et al.,Annu Rev Immunol 11,245-268(1993))。因此, $\alpha$ 亚基CD25对于IL-2信号传导不是必需的。它赋予对它的受体的高亲合力结合,而 $\beta$ 亚基CD122和 $\gamma$ 亚基对于信号转导是至关重要的(Krieg et al.,Proc Natl Acad Sci 107,11906-11(2010))。包括CD25的三聚体的IL-2受体由(静息的)CD4<sup>+</sup>叉头盒P3(FoxP3)<sup>+</sup>调节性T( $T_{reg}$ )细胞表达。它们也在常规的激活的T细胞上瞬时诱导,而在静息的状态这些细胞仅仅表达二聚体的IL-2受体。 $T_{reg}$ 细胞在体内始终表达最高水平的CD25(Fontenot et al.,Nature Immunol 6,1142-51(2005))。

[0006] IL-2主要由激活的T细胞合成,特别是CD4<sup>+</sup>辅助T细胞。它刺激T细胞增殖和分化,诱导细胞毒性T淋巴细胞(CTL)生成和外周血淋巴细胞分化成细胞毒性细胞和淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞,促进T细胞表达细胞因子和溶胞分子,推动B细胞增殖和分化和B细胞合成免疫球蛋白,和刺激天然杀伤(NK)细胞生成,增殖和激活(综述于例如Waldmann,Nat Rev Immunol 6,595-601(2009);Olejniczak and Kasprzak,Med Sci Monit 14,RA179-89(2008);Malek,Annu Rev Immunol 26,453-79(2008))。

[0007] 它在体内扩充淋巴细胞群体和提高这些细胞的效应器功能的能力赋予IL-2以抗肿瘤效果,使得IL-2免疫疗法成为某些转移性癌症的一种有吸引力的治疗选项。因此,高剂量IL-2治疗已经批准用于具有转移性肾细胞癌和恶性黑素瘤的患者。

[0008] 然而,IL-2在免疫应答中具有双重功能,在于它不仅介导效应细胞的扩充和活性,

而且决定性地牵涉维持外周免疫耐受。

[0009] 外周自身耐受下面的一种主要机制是T细胞中IL-2诱导的激活诱导的细胞死亡(AICD)。AICD是完全激活的T细胞通过它经由细胞表面表达的死亡受体诸如CD95(也称作Fas)或该TNF受体的啮合而经历编程性细胞死亡的一种过程。当在增殖期间表达高亲和力IL-2受体(在先前暴露于IL-2之后)的抗原激活的T细胞经由T细胞受体(TCR)/CD3复合物受到抗原的再刺激时,Fas配体(FasL)和/或肿瘤坏死因子(TNF)的表达受到诱导,使得细胞对Fas介导的凋亡易感。这种过程是IL-2依赖性的(Lenardo,Nature 353,858-61(1991))且经由STAT5介导。通过T淋巴细胞中的AICD的过程,不仅能针对自身抗原,而且能针对明显不是宿主的构成的部分的持久抗原,诸如肿瘤抗原建立耐受。

[0010] 而且,IL-2还牵涉维持外周CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T(T<sub>reg</sub>)细胞(Fontenot et al., Nature Immunol 6,1142-51(2005);D' Cruz and Klein,Nature Immunol 6,1152-59(2005);Maloy and Powrie,Nature Immunol 6,1171-72(2005)),它们也称作遏制T细胞。它们遏制效应T细胞破坏它们的(自身)靶物,或是经由细胞-细胞接触通过抑制T细胞辅助和激活,或是经由释放免疫遏制性细胞因子,诸如IL-10或TGF- $\beta$ 。消减T<sub>reg</sub>细胞显示出增强IL-2诱导的抗肿瘤免疫力(Imai et al.,Cancer Sci 98,416-23(2007))。

[0011] 因此,IL-2对于抑制肿瘤生长并非最佳的,因为在IL-2存在下或是所生成的CTL可能将肿瘤识别为自身并经历AICD或是免疫应答可能受到IL-2依赖性T<sub>reg</sub>细胞抑制。

[0012] 与IL-2免疫疗法有关的一项担忧是由重组人IL-2治疗产生的副作用。接受高剂量IL-2治疗的患者频繁经历重度心血管,肺,肾,肝,胃肠,神经学,皮肤,血液学和全身不良事件,要求密集监测和住院管理。大多数这些副作用可以通过发生所谓的血管(或毛细血管)渗漏综合征(VLS)来解释,血管通透性的一种病理性升高,导致多个器官中的流体外渗(引起例如肺和皮肤水肿和肝细胞损伤)和血管内流体消减(引起血压下降和心率补偿性升高)。除了IL-2停药以外,VLS没有治疗。已经在患者中测试低剂量IL-2方案以避免VLS,然而以亚最佳治疗结果为代价。认为VLS是由自IL-2激活的NK细胞释放促炎性细胞因子,诸如肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 引起的,然而最近显示IL-2诱导的肺水肿源自IL-2对表达低至中等水平的功能性 $\alpha\beta\gamma$  IL-2受体的肺内皮细胞的直接结合(Krieg et al.,Proc Nat Acad Sci USA 107,11906-11(2010))。

[0013] 已经采取数种办法来克服这些与IL-2免疫疗法有关的问题。例如,已经发现在体内IL-2与某些抗IL-2单克隆抗体的组合增强IL-2的治疗效果(Kamimura et al.,J Immunol 177,306-14(2006);Boyman et al.,Science 311,1924-27(2006))。在一种备选办法中,以多种方式突变IL-2以降低它的毒性和/或提高它的功效。Hu等人(Hu et al.,Blood 101,4853-4861(2003),美国专利公开文本No.2003/0124678)用色氨酸替代IL-2的位置38中的精氨酸残基以消除IL-2的血管通透性活性。Shanafelt等人(Shanafelt et al.,Nature Biotechnol 18,1197-1202(2000))将天冬酰胺88突变成精氨酸以增强对T细胞的选择性胜过NK细胞。Heaton等人(Heaton et al.,Cancer Res 53,2597-602(1993);美国专利No.5,229,109)引入两处突变(Arg38Ala和Phe42Lys)以降低自NK细胞分泌促炎性细胞因子。Gillies等人(美国专利公开文本No.2007/0036752)替代IL-2中有助于对中等亲和力IL-2受体的亲和力的三个残基(Asp20Thr,Asn88Arg,和Gln126Asp)以降低VLS。Gillies等人(WO 2008/0034473)还通过氨基酸替代Arg38Trp和Phe42Lys突变IL-2与CD25的界面以

降低与CD25的相互作用和 $T_{reg}$ 细胞的激活来增强功效。为了相同的目的,Wittrup等人(WO 2009/061853)生成具有增强的对CD25的亲合力但不活化该受体,从而作为拮抗剂起作用的IL-2突变体。所引入的突变目的在于破坏与受体的 $\beta$ 和/或 $\gamma$ 亚基的相互作用。

[0014] 一种为了克服上文提到的与IL-2免疫疗法有关的问题(由诱导VLS引起的毒性,由诱导AICD引起的肿瘤耐受,和由激活 $T_{reg}$ 细胞引起的免疫遏制)而设计的特定突变体IL-2多肽描述于WO 2012/107417。丙氨酸对IL-2的位置42处的苯丙氨酸残基,丙氨酸对位置45处的酪氨酸残基和甘氨酸对位置72处的亮氨酸残基的替代本质上消除这种突变体IL-2多肽对IL-2受体的 $\alpha$ 亚基(CD25)的结合。

[0015] 进一步对于上文提到的办法,可通过将IL-2选择性靶向肿瘤来改善IL-2免疫疗法,例如以包含结合在肿瘤细胞上表达的抗原的抗体的免疫缀合物的形式。已经描述了数种此类免疫缀合物(见例如Ko et al., J Immunother (2004) 27, 232-239; Klein et al., Oncoimmunology (2017) 6(3), e1277306)。

[0016] 然而,肿瘤可能能够通过脱落,突变或下调抗体的靶抗原来逃避此类靶向。而且,在积极排除淋巴细胞的肿瘤微环境中,肿瘤靶向性IL-2可能没有取得与效应细胞,诸如细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的最佳接触。

[0017] 如此,仍然需要进一步改进IL-2免疫疗法。一种可规避肿瘤靶向的问题的办法是直接IL-2靶向效应细胞,特别是CTL。

[0018] Ghasemi等人描述了IL-2和NKG2D结合蛋白的一种融合蛋白(Ghashemi et al., Nat Comm (2016) 7, 12878),用于将IL-2靶向携带NKG2D的细胞,诸如天然杀伤(NK)细胞。

[0019] 编程性细胞死亡蛋白1(PD-1或CD279)是CD28受体家族的一个抑制性成员,该家族还包括CD28,CTLA-4,ICOS和BTLA。PD-1是一种细胞表面受体且在激活的B细胞,T细胞,和髓样细胞上表达(Okazaki et al. (2002) Curr Opin Immunol 14:391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8)。PD-1的结构是一种单体1型跨膜蛋白,由免疫球蛋白可变样胞外域和含有免疫受体基于酪氨酸的抑制性基序(ITIM)和免疫受体基于酪氨酸的转换基序(ITSM)的胞质域组成。已经鉴定出PD-1的两种配体,PD-L1和PD-L2,它们显示在结合PD-1后下调T细胞激活(Freeman et al. (2000) J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. (2001) Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. (2002) Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1和PD-L2均是B7同系物,结合PD-1但不结合其它CD28家族成员。PD-1的一种配体,PD-L1在多种人癌症中是丰富的(Dong et al. (2002) Nat Med 8:787-9)。PD-1和PD-L1之间的相互作用导致肿瘤浸润性淋巴细胞减少,T细胞受体介导的增殖降低,和癌性细胞的免疫逃脱(Dong et al. (2003) J Mol Med 81:281-7; Blank et al. (2005) Cancer Immunol Immunother 54:307-314; Konishi et al. (2004) Clin Cancer Res 10:5094-100)。通过抑制PD-1与PD-L1的局部相互作用可逆转免疫遏制,而且在同样阻断PD-1与PD-L2的相互作用时效果是叠加的(Iwai et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:12293-7; Brown et al. (2003) J Immunol 170:1257-66)。

[0020] 结合PD-1的抗体描述于例如PCT专利申请No. PCT/EP2016/073248。

[0021] 发明概述

[0022] 本发明提供一种将具有对于免疫疗法的有利特性的突变体形式的IL-2靶向免疫效应细胞,诸如细胞毒性T淋巴细胞,而非肿瘤细胞的新颖办法。通过突变体IL-2分子与结

合PD-1的抗体的缀合来实现对免疫效应细胞的靶向。

[0023] 设计了本发明中使用的IL-2突变体来克服与IL-2免疫疗法有关的问题,特别是由诱导VLS引起的毒性,由诱导AICD引起的肿瘤耐受,和由激活T<sub>reg</sub>细胞引起的免疫遏制。在如上所述防止肿瘤逃脱肿瘤靶向以外,将IL-2突变体靶向免疫效应细胞可进一步提高优先激活CTL胜过免疫遏制性T<sub>reg</sub>细胞。通过使用结合PD-1的抗体,可另外逆转由PD-1与它的配体PD-L1的相互作用诱导的T细胞活性遏制,从而进一步增强免疫应答。

[0024] Chen等人描述了一种包含抗PD-L1抗体阿特殊单抗的IL-2融合蛋白(Chen et al., Biochem Biophys Res Comm(2016) 480, 160-165)。

[0025] 值得注意的是,本发明的包含结合PD-1的抗体的免疫缀合物显示与相似的靶向PD-L1的免疫缀合物相比显著卓越的体内抗肿瘤功效(见本文中下文实施例3)。

[0026] 在一个一般方面,本发明提供一种包含结合PD-1的抗体和经由IL-2R $\beta$   $\gamma$ 发信号的多肽的免疫缀合物。该经由IL-2R $\beta$   $\gamma$ 发信号的多肽特别是IL-2多肽或IL-15多肽。在第一个方面,本发明提供一种包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物,其中该突变体IL-2多肽是包含氨基酸替代F42A, Y45A和L72G(编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO: 19)的人IL-2分子。

[0027] 在又一个方面,本发明提供一种包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物,其中该突变体IL-2多肽是包含氨基酸替代F42A, Y45A和L72G(编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO: 19)的人IL-2分子;且其中该抗体包含(a)重链可变区(VH),其包含包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的HVR-H2,包含SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的HVR-H3,和在依照Kabat编号方式的位置71-73处包含SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的FR-H3,和(b)轻链可变区(VL),其包含包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的HVR-L3,或其中该抗体包含(a)重链可变区(VH),其包含包含SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的HVR-H3,和(b)轻链可变区(VL),其包含包含SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO: 12的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO: 13的氨基酸序列的HVR-L3。

[0028] 在另一个方面,本发明提供一种包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物,其中该突变体IL-2多肽是包含氨基酸替代F42A, Y45A和L72G(编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO: 19)的人IL-2分子;且其中该抗体包含(a)包含与SEQ ID NO: 14的氨基酸序列至少约95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区(VH),和(b)包含与选自由SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, 和SEQ ID NO: 18组成的组的氨基酸序列至少约95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0029] 在依照本发明的免疫缀合物的一些实施方案中,该突变体IL-2多肽进一步包含氨基酸替代T3A和/或氨基酸替代C125A。在一些实施方案中,该突变体IL-2多肽包含SEQ ID NO: 20的序列。在一些实施方案中,该免疫缀合物包含不多于一条突变体IL-2多肽。在一些实施方案中,该抗体包含由第一和第二亚基构成的Fc域。在一些此类实施方案中,该Fc域是IgG类,特别是IgG<sub>1</sub>亚类Fc域,和/或该Fc域是人Fc域。在一些实施方案中,该抗体是IgG类,特别是IgG<sub>1</sub>亚类免疫球蛋白。

[0030] 在其中该免疫缀合物包含Fc域的一些实施方案中,该Fc域包含促进Fc域的第一和第二亚基联合的修饰。在一些实施方案中,在该Fc域的第一亚基的CH3域中氨基酸残基用具有更大侧链体积的氨基酸残基替换,由此在该第一亚基的CH3域内生成隆起,其可放置在第二亚基的CH3域内的空腔中,且在该Fc域的第二亚基的CH3域中氨基酸残基用具有更小侧链体积的氨基酸残基替换,由此在该第二亚基的CH3域内生成空腔,在其内可放置第一亚基的CH3域内的隆起。在一些实施方案中,在该Fc域的第一亚基中位置366处的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W),且在该Fc域的第二亚基中位置407处的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V)且任选地位置366处的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且位置368处的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L368A)(编号方式依照Kabat EU索引)。在一些此类实施方案中,在该Fc域的第一亚基中另外位置354处的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换(S354C)或位置356处的谷氨酸残基用半胱氨酸残基替换(E356C),且在该Fc域的第二亚基中另外位置349处的酪氨酸残基用半胱氨酸残基替换(Y349C)(编号方式依照Kabat EU索引)。在一些实施方案中,该突变体IL-2多肽在它的氨基末端氨基酸处与该Fc域的亚基之一,特别是该Fc域的第一亚基的羧基末端氨基酸融合,任选地经由接头肽。在一些此类实施方案中,该接头肽具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

[0031] 在其中该免疫缀合物包含Fc域的一些实施方案中,该Fc域包含一处或多处降低对Fc受体,特别是Fc $\gamma$ 受体的结合,和/或效应器功能,特别是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的氨基酸替代。在一些此类实施方案中,所述一处或多处氨基酸替代在一个或多个选自L234,L235,和P329(Kabat EU索引编号方式)的组的位置处。在一些实施方案中,该Fc域的每个亚基包含氨基酸替代L234A,L235A和P329G(Kabat EU索引编号方式)。

[0032] 在一些实施方案中,依照本发明的免疫缀合物包含包含与SEQ ID NO:22的序列至少约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的多肽,包含与SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24的序列至少约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的多肽,和包含与SEQ ID NO:25的序列至少约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,该免疫缀合物本质上由通过接头序列连接的突变体IL-2多肽和IgG<sub>1</sub>免疫球蛋白分子组成。

[0033] 本发明进一步提供一种或多种编码本发明的免疫缀合物的分离的多核苷酸,一种或多种包含所述多核苷酸的载体(特别是表达载体),和包含所述多核苷酸或所述载体的宿主细胞。

[0034] 还提供的是一种生成包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物的方法,其包含(a)在适合于表达该免疫缀合物条件下培养本发明的宿主细胞,并任选地(b)回收该免疫缀合物。本发明还提供的是一种包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物,其是通过所述方法生成的。

[0035] 本发明进一步提供一种包含本发明的免疫缀合物和药学可接受载剂的药学组合物,和使用本发明的免疫缀合物的方法。

[0036] 特别地,本发明涵盖依照本发明的免疫缀合物,其用作药物,而且,其用于治疗疾病。在一个特定实施方案中,所述疾病是癌症。

[0037] 本发明还涵盖的是依照本发明的免疫缀合物在制造用于治疗疾病的药物中的用途。在一个特定实施方案中,所述疾病是癌症。

[0038] 进一步提供的是一种治疗个体中的疾病的方法,其包含对所述个体施用治疗有效量的包含处于药学可接受形式的依照本发明的免疫缀合物的组合物。在一个特定实施方案中,所述疾病是癌症。

[0039] 还提供的是一种刺激个体的免疫系统的方法,其包含对所述个体施用有效量的包含处于药学可接受形式的依照本发明的免疫缀合物的组合物。

[0040] 发明详述

[0041] 定义

[0042] 除非在下文另外定义,术语在本文中如本领域中一般使用的那样使用。

[0043] 除非另外指示,如本文中使用的,术语“白介素-2”或“IL-2”指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物如灵长类(例如人)和啮齿类(例如小鼠和大鼠)的任何天然IL-2。该术语涵盖未加工的IL-2以及起因于细胞中加工的IL-2的任何形式。该术语还涵盖IL-2的天然存在变体,例如剪接变体或等位变体。一种例示性人IL-2的氨基酸序列在SEQ ID NO:19中显示。未加工的人IL-2另外包含N端20个氨基酸的信号肽,其具有SEQ ID NO:26的序列,在成熟IL-2分子中缺失。

[0044] 如本文中使用的,术语“IL-2突变体”或“突变体IL-2多肽”意图涵盖各种形式的IL-2分子的任何突变体形式,包括全长IL-2,截短形式的IL-2和IL-2诸如通过融合或化学缀合连接至另一分子的形式。当提及IL-2使用时,“全长”意图表示成熟,天然长度IL-2分子。例如,全长人IL-2指具有133个氨基酸的分子(见例如SEQ ID NO:19)。各种形式的IL-2突变体特征在于具有至少一处影响IL-2与CD25相互作用的氨基酸突变。此突变可牵涉正常情况下位于该位置的野生型氨基酸残基的替代,删除,截短或修饰。通过氨基酸替代获得的突变体是优选的。除非另外指明,IL-2突变体在本文中可称作突变体IL-2肽序列,突变体IL-2多肽,突变体IL-2蛋白或突变体IL-2类似物。

[0045] 各种形式的IL-2的命名在本文中是就SEQ ID NO:19中显示的序列而言进行的。可以在本文中使用多种命名来指示同一突变。例如,位置42处的苯丙氨酸变成丙氨酸的突变可以以42A,A42,A<sub>42</sub>,F42A,或Phe42Ala标示。

[0046] 如本文中使用的,“人IL-2分子”表示包含与SEQ ID NO:19的人IL-2序列至少约90%,至少约91%,至少约92%,至少约93%,至少约94%,至少约95%或至少约96%同一的氨基酸序列的IL-2分子。特别地,序列同一性是至少约95%,更加特别是至少约96%。在特定实施方案中,人IL-2分子是全长IL-2分子。

[0047] 如本文中使用的,术语“氨基酸突变”意为涵盖氨基酸替代,删除,插入和修饰。可以进行替代,删除,插入和修饰的任意组合来实现最终构建体,只要最终构建体拥有期望的特性,例如降低的对CD25的结合。氨基酸序列删除和插入包括氨基和/或羧基端删除和氨基酸插入。末端删除的一个例子是删除全长人IL-2的位置1中的丙氨酸残基。优选的氨基酸突变是氨基酸替代。为了改变例如IL-2多肽的结合特征,特别优选非保守性的氨基酸替代,即将一个氨基酸用具有不同结构和/或化学特性的另一种氨基酸替换。优选的氨基酸替代包括用亲水性氨基酸替换疏水性氨基酸。氨基酸替代包括由非天然存在的氨基酸或由20种标准氨基酸的天然存在的氨基酸衍生物(例如4-羟脯氨酸,3-甲基组氨酸,鸟氨酸,高丝氨酸,5-羟赖氨酸)替换。可以使用本领域中公知的遗传或化学方法生成氨基酸突变。遗传方法可以包括定点诱变,PCR,基因合成等。认为通过遗传工程以外的方法如化学修饰来改变氨基



酸侧链基团的方法也可能可用。

[0048] 如本文中使用的,“野生型”形式的IL-2是IL-2的一种形式,它在其它方面与突变体IL-2多肽相同,只是野生型形式在突变体IL-2多肽的每个氨基酸位置处具有野生型氨基酸。例如,如果IL-2突变体是全长IL-2(即未与任何其它分子融合或缀合的IL-2),那么这种突变体的野生型形式是全长天然IL-2。如果IL-2突变体是IL-2和在IL-2下游编码的另一多肽(例如抗体链)之间的融合物,那么这种IL-2突变体的野生型形式是与相同下游多肽融合的具有野生型氨基酸序列的IL-2。而且,如果IL-2突变体是截短形式的IL-2(IL-2的非截短部分内的突变的或修饰的序列),那么这种IL-2突变体的野生型形式是类似截短的具有野生型序列的IL-2。为了将各种形式的IL-2突变体与相应的野生型形式的IL-2比较IL-2受体结合亲和力或生物学活性目的,术语野生型涵盖与天然发生的天然IL-2相比包含一处或多处不影响IL-2受体结合的氨基酸突变(诸如例如将与IL-2的残基125对应的位置处的半胱氨酸替代成丙氨酸)的形式的IL-2。在一些实施方案中,为了本发明的目的,野生型IL-2包含氨基酸替代C125A(见SEQ ID NO:29)。在依照本发明的某些实施方案中,与突变体IL-2多肽比较的野生型IL-2多肽包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在其它实施方案中,与突变体IL-2多肽比较的野生型IL-2多肽包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0049] 除非另外指示,如本文中使用的,术语“CD25”或“IL-2受体的 $\alpha$ 亚基”指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物如灵长类(例如人)和啮齿类(例如小鼠和大鼠)的任何天然CD25。该术语涵盖“全长”,未加工的CD25以及起因于细胞中加工的CD25的任何形式。该术语还涵盖CD25的天然存在变体,例如剪接变体或等位变体。在某些实施方案中,CD25是人CD25。人CD25的氨基酸序列见例如UniProt条目号P01589(版本185)。

[0050] 如本文中使用的,术语“高亲和力IL-2受体”指由受体 $\gamma$ 亚基(也称作共同细胞因子受体 $\gamma$ 亚基, $\gamma_c$ ,或CD132,参见UniProt条目号P14784(version 192)),受体 $\beta$ 亚基(也称作CD122或p70,参见UniProt条目号P31785(version 197))和受体 $\alpha$ 亚基(也称作CD25或p55,参见UniProt条目号P01589(version 185))组成的异三聚体形式的IL-2受体。对比而言,术语“中等亲和力IL-2受体”指仅仅包括 $\gamma$ 亚基和 $\beta$ 亚基,没有 $\alpha$ 亚基的IL-2受体(综述参见例如Olejniczak and Kasprzak,Med Sci Monit 14,RA179-189(2008))。

[0051] “亲和力”指分子(例如受体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如配体)之间非共价相互作用总和的强度。除非另外指示,如本文中使用的,“结合亲和力”指反映结合对的成员(例如抗原结合模块和抗原,或受体及其配体)之间1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以以解离常数( $K_D$ )来表述,其为解离与结合速率常数(分别为 $K_{\text{解离}}$ 和 $K_{\text{结合}}$ )的比率。如此,相等的亲和力可能包含不同的速率常数,只要速率常数的比率保持相同。亲和力可以通过本领域知道的确立方法来测量,包括本文中描述的那些方法。用于测量亲和力的一种具体方法是表面等离子共振(SPR)。

[0052] 突变体或野生型IL-2多肽对各种形式的IL-2受体的亲和力可以依照WO 2012/107417中列出的方法通过表面等离子共振(SPR)使用标准仪器诸如BIAcore仪器(GE Healthcare)和受体亚基(诸如可通过重组表达来获得)来测定(见例如Shanafelt et al., Nature Biotechnol 18,1197-1202(2000))。或者,IL-2突变体对不同形式的IL-2受体的结合亲和力可以使用已知表达一种或另一种此类形式的受体的细胞系来评估。本文中下文描述了用于测量结合亲和力的具体的示例性和例示性实施方案。

[0053] “调节性T细胞”或“T<sub>reg</sub>细胞”意指一种能遏制其它T细胞的应答的专门化类型的CD4<sup>+</sup>T细胞。T<sub>reg</sub>细胞特征在于表达IL-2受体的 $\alpha$ 亚基(CD25)和转录因子叉头盒(forkhead box)P3(FOXP3)(Sakaguchi, Annu Rev Immunol 22, 531-62(2004))且在诱导和维持针对抗原(包括那些由肿瘤表达的)的外周自我耐受中发挥至关重要作用。T<sub>reg</sub>细胞需要IL-2来实现它们的功能和发育及诱导它们的遏制性特征。

[0054] 如本文中使用的,术语“效应细胞”指如下的一群淋巴细胞,它们介导IL-2的细胞毒性效应。效应细胞包括效应T细胞诸如CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞, NK细胞, 淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞和巨噬细胞/单核细胞。

[0055] 如本文中使用的,术语“PD1”, “人PD1”, “PD-1”或“人PD-1”(也称作编程性细胞死亡蛋白1,或编程性死亡1)指人蛋白PD1(SEQ ID NO:27,没有信号序列的蛋白)/(SEQ ID NO:28,有信号序列的蛋白)。还见UniProt条目号Q15116(型式156)。如本文中使用的,“结合PD-1”, “特异性结合PD-1”的抗体或“抗PD-1抗体”指能够以足够的亲和力结合PD-1,尤其是在细胞表面上表达的PD-1多肽,使得抗体可用作靶向PD-1中的诊断和/或治疗剂的抗体。在一个实施方案中,抗PD-1抗体对无关的,非PD-1蛋白的结合程度小于抗体对PD-1的结合的约10%,如例如通过放射免疫测定法(RIA)或流式细胞术(FACS)或通过表面等离子共振测定法使用生物传感器系统诸如Biacore®系统测量的。在某些实施方案中,结合PD-1的抗体对于结合人PD-1的结合亲和力具有 $\leq 1\mu\text{M}$ ,  $\leq 100\text{nM}$ ,  $\leq 10\text{nM}$ ,  $\leq 1\text{nM}$ ,  $\leq 0.1\text{nM}$ ,  $\leq 0.01\text{nM}$ , 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 $10^{-8}\text{M}$ 或更少,例如 $10^{-8}\text{M}$ 至 $10^{-13}\text{M}$ , 例如 $10^{-9}\text{M}$ 至 $10^{-13}\text{M}$ )的K<sub>D</sub>值。在一个实施方案中,结合亲和力的K<sub>D</sub>值是在表面等离子共振测定法中使用人PD-1的胞外域(ECD)(PD1-ECD,见SEQ ID NO:43)作为抗原测定的。

[0056] “特异性结合”意指结合对于抗原是选择性的,并且能与不想要的或非特异性的相互作用区别开来。抗体结合特定抗原(例如PD-1)的能力能经由酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域技术人员熟知的其它技术,例如表面等离子共振(SPR)技术(例如在BIAcore仪上分析)(Liljebblad等, Glyco J 17, 323-329(2000)),以及传统的结合测定法(Heeley, Endocr Res 28, 217-229(2002))来测量。在一个实施方案中,抗体对无关蛋白质的结合程度是该抗体对抗原结合的小于约10%,如例如通过SPR测量的。本文中描述的免疫缀合物中包含的抗体特异性结合PD-1。

[0057] 如本文中使用的,术语“多肽”指由通过酰胺键(也称作肽键)线性连接的单体(氨基酸)构成的分子。术语“多肽”指具有两个或更多个氨基酸的任何链,并且不指特定长度的产物。如此,肽,二肽,三肽,寡肽,“蛋白质”,“氨基酸链”或任何其它用于指具有两个或更多个氨基酸的链的术语均包括在“多肽”的定义中,而且术语“多肽”可以代替这些术语中任一或与其交换使用。术语“多肽”还意图指多肽的表达后修饰的产物,包括但不限于糖基化,乙酰化,磷酸化,酰化,通过已知的保护性/封闭性基团衍生化,蛋白水解切割,或通过非天然存在的氨基酸的修饰。多肽可以自天然的生物学来源衍生或通过重组技术生成,但不必从指定的核酸序列翻译。它可以以任何方式来生成,包括通过化学合成。多肽可以具有限定的三维结构,尽管它们不必具有此类结构。具有限定的三维结构的多肽被称作折叠的,而不具有限定的三维结构而可以采用大量不同构象的多肽被称作未折叠的。

[0058] “分离的”多肽或其变体或衍生物意图为不处于其天然环境中的多肽。不需要特定水平的纯化。例如,分离的多肽可以是从其天然或自然环境中取出。就本发明的目的而言,

在宿主细胞中表达的重组生成的多肽和蛋白质被视为分离的,已通过任何合适的技术分开,分级,或部分或基本上纯化的天然的或重组的多肽也是如此。

[0059] 关于参照多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为在比对序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,且不将任何保守性替代视为序列同一性的一部分时,候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为测定百分比氨基酸序列同一性目的比对可以以本领域技术范围内的多种方式进行,例如使用公众可得到的计算机软件,如BLAST, BLAST-2, Clustal W, 或Megalign (DNASTAR) 软件或FASTA程序包。本领域技术人员可决定用于比对序列的适宜参数,包括在比较序列的全长里获得最大比对需要的任何算法。然而,为了本文中的目的,%氨基酸序列同一性值是使用36.3.8c或更晚的版本FASTA包的ggsearch程序及BLOSUM50比较矩阵生成的。FASTA程序包由W.R.Pearson and D.J.Lipman(1988)“Improved Tools for Biological Sequence Analysis”, PNAS 85:2444-2448; W.R.Pearson(1996)“Effective protein sequence comparison” Meth.Enzymol.266:227-258; 和Pearson et al.(1997) Genomics 46:24-36撰写且自[http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta\\_www2/fasta\\_down.shtml](http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml)公众可得。或者,可使用在[http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta\\_www2/index.cgi](http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi)处可及的公共服务器来比较序列,使用ggsearch(全局蛋白质:蛋白质)程序和默认选项(BLOSUM50; 打开:-10; 延伸:-2; Ktup=2)以确保实施全局而非局部比对。百分比氨基酸同一性在输出比对标题中给出。

[0060] 术语“多核苷酸”指分离的核酸分子或构建体,例如信使RNA (mRNA), 病毒衍生的RNA或质粒DNA (pDNA)。多核苷酸可以包含常规的磷酸二酯键或非常规的键(例如酰胺键,如在肽核酸(PNA)中发现的)。术语“核酸分子”指任何一种或多种存在于多核苷酸中的核酸区段,例如DNA或RNA片段。

[0061] “分离的”核酸分子或多核苷酸意指已从其天然环境取出的核酸分子,DNA或RNA。例如,就本发明的目的而言,包含在载体中的编码多肽的重组多核苷酸被视为分离的。分离的多核苷酸的别的例子包括在异源宿主细胞中保持的重组多核苷酸或溶液中的(部分或基本上)纯化的多核苷酸。分离的多核苷酸包括在普遍含有该多核苷酸分子的细胞中含有的多核苷酸分子,但该多核苷酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的染色体位置处。分离的RNA分子包括本发明的体内或体外RNA转录本,以及正链和负链形式,和双链形式。依照本发明的分离的多核苷酸或核酸还包括合成生成的此类分子。另外,多核苷酸或核酸可以为或可以包括调节元件如启动子,核糖体结合位点或转录终止子。

[0062] “分离的编码[例如本发明的免疫缀合物]多核苷酸(或核酸)”指编码抗体重和轻链和/或IL-2多肽(或其片段)的一种或多种多核苷酸分子,包括在单一载体或分开的载体中的此类多核苷酸分子,和在宿主细胞中的一个或多个位置处存在的此类核酸分子。

[0063] 术语“表达盒”指重组或合成生成的,具有一系列允许特定核酸在靶细胞中转录的指定核酸元件的多核苷酸。可以将重组表达盒掺入质粒,染色体,线粒体DNA,质体DNA,病毒或核酸片段中。通常,表达载体的重组表达盒部分包含要转录的核酸序列和启动子等。在某些实施方案中,表达盒包含编码本发明的免疫缀合物或其片段的多核苷酸序列。

[0064] 术语“载体”或“表达载体”指用于在细胞中导入与其可操作联合的特定基因及指导其表达的DNA分子。该术语包括作为自主复制核酸结构的载体以及掺入到已经接受其导

入的宿主细胞的基因组中的载体。本发明的表达载体包含表达盒。表达载体允许转录大量稳定的mRNA。一旦表达载体在细胞内,就通过细胞转录和/或翻译装置生成基因编码的核糖核酸分子或蛋白质。在一个实施方案中,本发明的表达载体包含表达盒,其包含编码本发明的免疫缀合物或其片段的多核苷酸序列。

[0065] 术语“宿主细胞”,“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可交换使用并指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”,其包括初始转化的细胞和自其衍生的后代(不考虑传代数)。后代在核酸内含物上可能与亲本细胞不完全相同,但可以含有突变。本文中包括具有如原始转化细胞中筛选或选择的相同的功能或生物学活性的突变体后代。宿主细胞是能用于生成本发明的免疫缀合物的任何类型的细胞系统。宿主细胞包括培养的细胞,例如哺乳动物培养细胞如HEK细胞,CHO细胞,BHK细胞,NS0细胞,SP2/0细胞,Y0骨髓瘤细胞,P3X63小鼠骨髓瘤细胞,PER细胞,PER.C6细胞或杂交瘤细胞,酵母细胞,昆虫细胞和植物细胞等,而且还包括在转基因动物,转基因植物或培养的植物或动物组织中包含的细胞。

[0066] 术语“抗体”在本文中以最广义使用且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体,多克隆抗体,多特异性抗体(例如双特异性抗体),和抗体片段,只要它们展现出期望的抗原结合活性。

[0067] 如本文中使用的,术语“单克隆抗体”指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各个抗体是相同的和/或结合相同表位,除了例如含有天然存在的突变或在单克隆抗体制备物的生成期间发生的可能的变体抗体外,此类变体一般以极少量存在。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,单克隆抗体制备物的每个单克隆抗体对抗原上的单一决定簇。如此,修饰语“单克隆”指示抗体自一群基本上同质的抗体获得的特征,而不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如,可以通过多种技术来生成要依照本发明使用的单克隆抗体,包括但不限于杂交瘤方法,重组DNA方法,噬菌体展示方法,和利用含有所有或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,本文中描述了用于生成单克隆抗体的此类方法和其它例示性方法。

[0068] “分离的”抗体指已经与其天然环境的组分分开,即并不处于它的天然环境中的抗体。不需要特定水平的纯化。例如,分离的抗体可以从其天然或自然环境中取出。就本发明的目的而言,在宿主细胞中表达的重组生成的抗体被视为分离的,已通过任何合适的技术分开,分级,或部分或基本上纯化的天然的或重组的抗体也是如此。因此,本发明的免疫缀合物是分离的。在一些实施方案中,抗体纯化至大于95%或99%的纯度,如通过例如电泳(例如SDS-PAGE,等电聚焦(IEF),毛细管电泳)或层析(例如离子交换或反相HPLC)方法测定的。关于用于评估抗体纯度的方法的综述,见例如Flatman et al.,J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。

[0069] 术语“全长抗体”,“完整抗体”,和“全抗体”在本文中可互换使用,指与天然抗体结构具有基本上类似的结构抗体。

[0070] “抗体片段”指完整抗体以外的分子,其包含完整抗体中结合与完整抗体结合的抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv,Fab,Fab',Fab'-SH,F(ab')<sub>2</sub>,双抗体,线性抗体,单链抗体分子(例如scFv),和单域抗体。对于某些抗体片段的综述,参见Holliger和Hudson,Nature Biotechnology23:1126-1136(2005)。对于scFv片段的综述,参见例如Plü

ckthun,于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,vol.113,Rosenburg和Moore编, Springer-Verlag, New York, pp.269-315(1994);亦参见W0 93/16185;和美国专利No.5,571,894和5,587,458。关于包含补救受体结合表位残基且具有延长的体内半衰期的Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段的论述,参见美国专利No.5,869,046。双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价或双特异性的。参见例如EP 404,097;W0 1993/01161;Hudson等,Nat Med 9,129-134(2003);和Hollinger等,Proc Natl Acad Sci USA 90,6444-6448(1993)。三抗体和四抗体也记载于Hudson等,Nat Med 9,129-134(2003)。单域抗体是包含抗体的整个或部分重链可变域,或整个或部分轻链可变域的抗体片段。在某些实施方案中,单域抗体是人单域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA;参见例如美国专利No.6,248,516B1)。可以通过各种技术来制备抗体片段,包括但不限于对完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)产生,如本文中描述的。

[0071] 术语“免疫球蛋白分子”指具有天然存在的抗体结构的蛋白质。例如,IgG类的免疫球蛋白是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,其由二硫键连接的两条轻链和两条重链构成。从N端至C端,每条重链具有可变域(VH),也称作可变重域或重链可变区,接着是3个恒定域(CH1,CH2和CH3),也称作重链恒定区。类似地,从N端至C端,每条轻链具有可变域(VL),也称作可变轻域或轻链可变区,接着是恒定轻(CL)域(也称作轻链恒定区)。免疫球蛋白的重链可以归入称作 $\alpha$ (IgA), $\delta$ (IgD), $\epsilon$ (IgE), $\gamma$ (IgG)或 $\mu$ (IgM)的5类之一,其中一些可以进一步分成亚类,例如 $\gamma_1$ (IgG<sub>1</sub>), $\gamma_2$ (IgG<sub>2</sub>), $\gamma_3$ (IgG<sub>3</sub>), $\gamma_4$ (IgG<sub>4</sub>), $\alpha_1$ (IgA<sub>1</sub>)和 $\alpha_2$ (IgA<sub>2</sub>)。基于其恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白的轻链可以归入称作卡帕( $\kappa$ )和拉姆达( $\lambda$ )的两类之一。免疫球蛋白基本由经由免疫球蛋白铰链区连接的两个Fab分子和Fc域组成。

[0072] 术语“抗原结合域”指包含特异性结合部分或整个抗原且与其互补的区域的抗体部分。抗原结合域可由例如一个或多个抗体可变域(也称作抗体可变区)提供。具体地,抗原结合域包含抗体轻链可变域(VL)和抗体重链可变域(VH)。

[0073] 术语“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链中牵涉使抗体结合抗原的域。天然抗体的重链和轻链的可变域(分别为VH和VL)一般具有类似的结构,每个域包含4个保守的框架区(FR)和3个高变区(HVR)。参见例如Kindt等,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007)。单个VH或VL域可能足以赋予抗原结合特异性。如本文中结合可变区序列使用的,“Kabat编号方式”指由Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)提出的编号系统。

[0074] 如本文中使用的,所有重和轻链的恒定区和域的氨基酸位置是依照Kabat, et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th ed.,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中描述的Kabat编号系统编号的,在本文中称作“依照Kabat的编号方式”或“Kabat编号方式”。具体而言,将Kabat编号系统(参见Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)的第647-660页)用于卡帕和拉姆达同种型的轻链恒定域CL并将Kabat EU索引编号系统(参见第661-723页)用于重链恒定域(CH1,铰链,CH2和CH3),在这种情况下在本文中通过提到“依照Kabat EU索引的编号方式”来进一步澄清。

[0075] 如本文中使用的,术语“高变区”或“HVR”指抗体可变域中在序列上高变的(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构上限定的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触”)的每个区。一般地,抗体包含6个HVR;三个在VH中(H1,H2,H3),且三个在VL中(L1,L2,L3)。本文中的例示性HVR包括:

[0076] (a) 高变环,存在于氨基酸残基26-32(L1),50-52(L2),91-96(L3),26-32(H1),53-55(H2),和96-101(H3)(Chothia and Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987));

[0077] (b) CDR,存在于氨基酸残基24-34(L1),50-56(L2),89-97(L3),31-35b(H1),50-65(H2),和95-102(H3)(Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991));

[0078] (c) 抗原接触,存在于氨基酸残基27c-36(L1),46-55(L2),89-96(L3),30-35b(H1),47-58(H2),和93-101(H3)(MacCallum et al.J.Mol.Biol.262:732-745(1996));和

[0079] (d) (a), (b), 和/或(c)的组合,包括HVR氨基酸残基46-56(L2),47-56(L2),48-56(L2),49-56(L2),26-35(H1),26-35b(H1),49-65(H2),93-102(H3),和94-102(H3)。

[0080] 除非另有指示,可变域中的HVR残基和其它残基(例如FR残基)在本文中依照Kabat等,见上文编号。

[0081] “框架”或“FR”指除高变区(HVR)残基外的可变域残基。可变域的FR一般由4个FR域组成:FR1,FR2,FR3和FR4。因而,HVR和FR序列一般以下列次序出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0082] “人源化”抗体指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体会包含至少一个,通常两个基本上整个可变域,其中所有或基本上所有HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的那些,且所有或基本上所有FR对应于人抗体的那些。此类可变域在本文中称作“人源化可变区”。任选地,人源化抗体可以至少包含自人抗体衍生的抗体恒定区的一部分。在一些实施方案中,将人源化抗体中的一些FR残基用来自非人抗体(例如衍生HVR残基的抗体)的相应残基替代,例如为了恢复或改善抗体特异性或亲和力。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”指已经经历人源化的抗体。本发明涵盖的“人源化抗体”的其它形式是那些其中的恒定区已经另外自初始抗体的恒定区进行过修饰或改变以生成依照本发明的特性(特别地关于C1q结合和/或Fc受体(FcR)结合)的。

[0083] “人抗体”指拥有与由人或人细胞生成的或利用人抗体全集或其它人抗体编码序列自非人来源衍生的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列的抗体。人抗体的此定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。在某些实施方案中,人抗体衍生自非人转基因哺乳动物,例如小鼠,大鼠,或家兔。在某些实施方案中,人抗体衍生自杂交瘤细胞系。自人抗体文库分离的抗体或抗体片段在本文中也认为是人抗体或人抗体片段。

[0084] 抗体或免疫球蛋白的“类”指其重链拥有的恒定域或恒定区的类型。抗体有5种主要的类:IgA,IgD,IgE,IgG和IgM,并且这些中数种可以进一步分成亚类(同种型),例如IgG<sub>1</sub>,IgG<sub>2</sub>,IgG<sub>3</sub>,IgG<sub>4</sub>,IgA<sub>1</sub>和IgA<sub>2</sub>。对应于不同免疫球蛋白类的重链恒定域分别称作 $\alpha$ , $\delta$ , $\epsilon$ , $\gamma$ 和 $\mu$ 。

[0085] 本文中术语“Fc域”或“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链中至少含有恒定区的一部分的C端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。虽然IgG重链的Fc区的边界可以略微

变化,但是人IgG重链Fc区通常定义为自Cys226或Pro230延伸至重链的羧基端。然而,由宿主细胞生成的抗体可能经历翻译后切割,自重链的C端切除一个或多个,特别是一个或两个氨基酸。因此,通过表达编码全长重链的特定核酸分子由宿主细胞生成的抗体可包括全长重链,或者它可包括全长重链的切割变体(在本文中称作“切割变体重链”)。当重链的最终两个C端氨基酸是甘氨酸(G446)和赖氨酸(K447,编号方式依照Kabat EU索引)时可能就是这种情况。因此,Fc区的C端赖氨酸(Lys447),或C端甘氨酸(Gly446)和赖氨酸(K447)可以存在或不存在。如果没有另外指明的话,包括Fc域(或本文中定义的Fc域的亚基)的重链的氨基酸序列在本文中表示无C端甘氨酸-赖氨酸二肽的。在本发明的一个实施方案中,依照本发明的免疫缀合物中包含的包括本文中规定的Fc域的一个亚基的重链包含另外的C端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,编号方式依照Kabat的EU索引)。在本发明的一个实施方案中,依照本发明的免疫缀合物中包含的包括本文中规定的Fc域的一个亚基的重链包含另外的C端甘氨酸残基(G446,编号方式依照Kabat的EU索引)。本发明的组合物,诸如本文所述药学组合物,包含本发明的免疫缀合物的群体。免疫缀合物的群体可包含具有全长重链的分子和具有切割变体重链的分子。免疫缀合物的群体可以由具有全长重链的分子和具有切割变体重链的分子的混合物组成,其中至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%的免疫缀合物具有切割变体重链。在本发明的一个实施方案中,包含本发明的免疫缀合物的群体的组合物包含如下的免疫缀合物,其包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基及另外的C端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,编号方式依照Kabat的EU索引)的重链。在本发明的一个实施方案中,包含本发明的免疫缀合物的群体的组合物包含如下的免疫缀合物,其包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基及另外的C端甘氨酸残基(G446,编号方式依照Kabat的EU索引)的重链。在本发明的一个实施方案中,此类组合物包含由如下分子构成的免疫缀合物的群体:包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基的重链的分子;包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基及另外的C端甘氨酸残基(G446,编号方式依照Kabat的EU索引)的重链的分子,和包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基及另外的C端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,编号方式依照Kabat的EU索引)的重链的分子。除非本文中另外指定,Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号方式依照EU编号系统,也称作EU索引,如记载于Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991(也参见上文)。如本文中使用的,Fc域的“亚基”指形成二聚体Fc域的两个多肽之一,即包含免疫球蛋白重链中能够稳定自身联合的C端恒定区的多肽。例如,IgG Fc域的亚基包含IgG CH2和IgG CH3恒定域。

[0086] “促进Fc域的第一亚基和第二亚基联合的修饰”是降低或防止包含Fc域亚基的多肽与相同多肽联合以形成同二聚体的肽主链操作或Fc域亚基的翻译后修饰。如本文中使用的,具体地,促进联合的修饰包括对期望联合的两个Fc域亚基(即Fc域的第一亚基和第二亚基)中的每一个进行的分开的修饰,其中所述修饰彼此互补,从而促进两个Fc域亚基的联合。例如,促进联合的修饰可以改变一种或两种Fc域亚基的结构或电荷,从而在立体或静电上分别促进它们的联合。如此,(异)二聚化在包含第一Fc域亚基的多肽和包含第二Fc域亚基的多肽之间发生,其在融合至每个亚基的别的组分(例如抗原结合模块)不同这一意义上讲可能是不相同的。在一些实施方案中,促进联合的修饰包含在Fc域中的氨基酸突变,具体为氨基酸替代。在一个具体的实施方案中,促进联合的修饰包含Fc域的两个亚基的每一个

中分开的氨基酸突变,具体为氨基酸替代。

[0087] 术语“效应器功能”在提到抗体使用时指那些可归于抗体Fc区且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应器功能的例子包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC),Fc受体结合,抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP),细胞因子分泌,免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取,细胞表面受体(例如B细胞受体)下调和B细胞激活。

[0088] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)是一种导致通过免疫效应器细胞对抗体包被的靶细胞裂解的免疫机制。靶细胞是包含Fc区的抗体或其衍生物一般经由Fc区的N端的蛋白质部分特异性结合的细胞。如本文中使用的,术语“降低的ADCC”定义为通过上文定义的ADCC机制,以靶细胞周围介质中给定浓度的抗体,在给定的时间内裂解的靶细胞数目的降低,和/或通过ADCC机制,实现给定时间内给定数目的靶细胞裂解需要的靶细胞周围介质中抗体浓度的增加。ADCC的降低相对于使用相同的标准生产,纯化,配制和贮存方法(其是本领域技术人员已知的),由同一类型的宿主细胞生成但尚未工程化改造的相同抗体介导的ADCC。例如,由在其Fc域包含降低ADCC的氨基酸替代的抗体所介导的ADCC中的降低,是相对于由在Fc域中无此氨基酸替代的相同抗体介导的ADCC而言。测量ADCC的合适测定法是本领域中公知的(参见例如PCT公开文本No.WO 2006/082515或PCT公开文本No.WO 2012/130831)。

[0089] “激活Fc受体”是一种在抗体的Fc域衔接后,引发刺激携带该受体的细胞实施效应器功能的信号传导事件的Fc受体。人激活Fc受体包括Fc $\gamma$ RIIIa(CD16a),Fc $\gamma$ RI(CD64),Fc $\gamma$ RIIa(CD32)和Fc $\alpha$ RI(CD89)。

[0090] 如本文中使用的,术语“工程化”视为包括对肽主链的任何操作或对天然存在或重组的多肽或其片段的翻译后修饰。工程化包括对氨基酸序列,糖基化模式或各氨基酸侧链基团的修饰,以及这些办法的组合。

[0091] “降低的结合”,例如降低的对Fc受体或CD25的结合,指相应相互作用的亲和力降低,如例如通过SPR测量的。为了清楚,该术语还包括亲和力降低至0(或低于分析方法的检测限),即完全消除相互作用。相反,“升高的结合”指相应相互作用的结合亲和力升高。

[0092] 如本文中使用的,术语“免疫缀合物”指包括至少一个IL-2分子和至少一个抗体的多肽分子。如本文中描述的,IL-2分子可以通过多种相互作用及以多种构造连接至抗体。在特定实施方案中,IL-2分子经由肽接头融合至抗体。依照本发明的特定免疫缀合物本质上由通过一个或多个接头序列连接的一个IL-2分子和抗体组成。

[0093] “融合”意指组分(例如抗体和IL-2分子)直接地或经由一种或多种肽接头通过肽键连接。

[0094] 如本文中使用的,术语“第一”和“第二”就Fc域亚基等而言为了在有超过一个每类模块时便于区分而使用。除非明确如此陈述,这些术语的使用不意图赋予免疫缀合物的特定次序或取向。

[0095] 药剂的“有效量”指引起接受其施用的细胞或组织中的生理学变化必需的量。

[0096] 药剂例如药学组合物的“治疗有效量”指有效实现期望的治疗或预防结果的量(以必要的剂量且持续必要的时间)。治疗有效量的药剂例如消除,降低,延迟,最小化或预防疾病的不良作用。



[0097] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物(例如牛,绵羊,猫,犬和马),灵长类(例如人和非人灵长类如猴),家兔和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。特别地,所述个体或受试者是人。

[0098] 术语“药学组合物”指其形式使得容许其中含有的活性成分的生物学活性有效,且不含对会接受组合物施用的受试者有不可接受的毒性的别的成分的制剂。

[0099] “药学可接受载体”指药学组合物中活性成分以外对受试者无毒的成分。药学可接受载体包括但不限于缓冲剂,赋形剂,稳定剂或防腐剂。

[0100] 如本文中使用的,“治疗/处理”(及其语法变体)指试图改变治疗个体中疾病的自然进程,并且可以是为了预防或在临床病理学的过程期间实施的临床干预。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发,缓解症状,降低疾病的任何直接或间接病理学后果,预防转移,减缓疾病进展率,改善或减轻疾病状态,及消退或改善的预后。在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物用于延迟疾病的形成或延缓疾病的进展。

[0101] 实施方案的详细描述

[0102] 突变体IL-2多肽

[0103] 依照本发明的免疫缀合物包含具有对于免疫疗法的有利特性的突变体IL-2多肽。特别地,在该突变体IL-2多肽中消除有助于IL-2的毒性但对于功效不是必需的IL-2药理学特性。此类突变体IL-2多肽详细描述于WO 2012/107417,通过援引将其完整收入本文。如上文讨论的,不同形式的IL-2受体由不同的亚基组成且展现不同的对IL-2的亲合力。由 $\beta$ 和 $\gamma$ 受体亚基组成的中等亲合力IL-2受体在静息的效应细胞上表达且足以实现IL-2信号传导。另外包含受体的 $\alpha$ 亚基的高亲合力IL-2受体主要在调节性T( $T_{reg}$ )细胞上以及在激活的效应细胞上表达,在那里它通过IL-2的啮合能分别促进 $T_{reg}$ 细胞介导的免疫遏制或激活诱导的细胞死亡(AICD)。如此,不希望受理论束缚,降低或消除IL-2对IL-2受体的 $\alpha$ 亚基的亲合力应当降低IL-2诱导的调节性T细胞对效应细胞功能的下调和通过AICD过程发展肿瘤耐受。另一方面,维持对中等亲合力IL-2受体的亲合力应当保留IL-2对效应细胞(像NK和T细胞)增殖和激活的诱导。

[0104] 依照本发明的免疫缀合物中包含的突变体白介素-2(IL-2)多肽包含至少一处消除或降低突变体IL-2多肽对IL-2受体的 $\alpha$ 亚基的亲合力且保留突变体IL-2多肽对中等亲合力IL-2受体的亲合力(均与野生型IL-2多肽相比)的氨基酸突变。

[0105] 具有降低的对CD25的亲合力的人IL-2(hIL-2)的突变体可以例如通过氨基酸位置35,38,42,43,45或72或其组合(编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO:19)处的氨基酸替代来生成。例示性氨基酸替代包括K35E,K35A,R38A,R38E,R38N,R38F,R38S,R38L,R38G,R38Y,R38W,F42L,F42A,F42G,F42S,F42T,F42Q,F42E,F42N,F42D,F42R,F42K,K43E,Y45A,Y45G,Y45S,Y45T,Y45Q,Y45E,Y45N,Y45D,Y45R,Y45K,L72G,L72A,L72S,L72T,L72Q,L72E,L72N,L72D,L72R,和L72K。在本发明的免疫缀合物中有用的特定IL-2突变体包含与人IL-2的残基42,45,或72对应的氨基酸位置处的氨基酸突变,或其组合。在一个实施方案中,所述氨基酸突变是选自F42A,F42G,F42S,F42T,F42Q,F42E,F42N,F42D,F42R,F42K,Y45A,Y45G,Y45S,Y45T,Y45Q,Y45E,Y45N,Y45D,Y45R,Y45K,L72G,L72A,L72S,L72T,L72Q,L72E,L72N,L72D,L72R,和L72K的组的氨基酸替代,更加具体地是选自F42A,Y45A和L72G的组的氨基酸替代。与该IL-2突变体的野生型形式相比,这些突变体展现实质性相似的对中等亲合力IL-

2受体的结合亲和力,而且具有实质性降低的对IL-2受体的 $\alpha$ 亚基和高亲和力IL-2受体的亲和力。

[0106] 有用的突变体的其它特征可包括诱导携带IL-2受体的T和/或NK细胞增殖的能力,诱导携带IL-2受体的T和/或NK细胞中的IL-2信号传导的能力,由NK细胞生成干扰素(IFN)- $\gamma$ 作为次级细胞因子的能力,降低诱导由外周血单个核细胞(PBMC)生成次级细胞因子(特别是IL-10和TNF- $\alpha$ )的能力,降低的激活调节性T细胞的能力,降低的诱导T细胞中的凋亡的能力,和降低的体内毒性概况。

[0107] 在本发明中有用的特定突变体IL-2多肽包含三处消除或降低突变体IL-2多肽对IL-2受体的 $\alpha$ 亚基的亲和力但保留突变体IL-2多肽对中等亲和力IL-2受体的亲和力的氨基酸突变。在一个实施方案中,所述三处氨基酸突变在与人IL-2的残基42,45和72对应的位置处。在一个实施方案中,所述三处氨基酸突变是氨基酸替代。在一个实施方案中,所述三处氨基酸突变是选自F42A,F42G,F42S,F42T,F42Q,F42E,F42N,F42D,F42R,F42K,Y45A,Y45G,Y45S,Y45T,Y45Q,Y45E,Y45N,Y45D,Y45R,Y45K,L72G,L72A,L72S,L72T,L72Q,L72E,L72N,L72D,L72R,和L72K的组的氨基酸替代。在一个具体实施方案中,所述三处氨基酸突变是氨基酸替代F42A,Y45A和L72G(编号方式相对于SEQ ID NO:19的人IL-2序列)。

[0108] 在某些实施方案中,所述氨基酸突变将突变体IL-2多肽对IL-2受体的 $\alpha$ 亚基的亲和力降低至少5倍,具体是至少10倍,更加具体是至少25倍。在有多于一处降低突变体IL-2多肽对IL-2受体的 $\alpha$ 亚基的亲和力的氨基酸突变的实施方案中,这些氨基酸突变的组合可将突变体IL-2多肽对IL-2受体的 $\alpha$ 亚基的亲和力降低至少30倍,至少50倍,或甚至至少100倍。在一个实施方案中,所述氨基酸突变或氨基酸突变的组合消除突变体IL-2多肽对IL-2受体的 $\alpha$ 亚基的亲和力,使得通过表面等离子共振检测不到结合。

[0109] 当IL-2突变体展现大于约70%的该IL-2突变体的野生型形式对中等亲和力IL-2受体的亲和力时,实现实质性相似的对中等亲和力受体的结合,即保留突变体IL-2多肽对所述受体的亲和力。本发明的IL-2突变体可展现大于约80%和甚至大于约90%的此类亲和力。

[0110] 降低IL-2对IL-2受体的 $\alpha$ 亚基的亲和力与消除IL-2的O-糖基化组合产生具有改良特性的IL-2蛋白。例如,当在哺乳动物细胞(诸如CHO或HEK细胞)中表达突变体IL-2多肽时,消除O-糖基化位点产生更加均质的产物。

[0111] 如此,在某些实施方案中,该突变体IL-2多肽包含消除在与人IL-2的残基3对应的位置处的IL-2的O-糖基化位点的另外的氨基酸突变。在一个实施方案中,所述消除在与人IL-2的残基3对应的位置处的IL-2的O-糖基化位点的另外的氨基酸突变是氨基酸替代。例示性氨基酸替代包括T3A,T3G,T3Q,T3E,T3N,T3D,T3R,T3K,和T3P。在一个具体实施方案中,所述另外的氨基酸突变是氨基酸替代T3A。

[0112] 在某些实施方案中,该突变体IL-2多肽本质上是全长IL-2分子。在某些实施方案中,该突变体IL-2多肽是人IL-2分子。在一个实施方案中,该突变体IL-2多肽包含SEQ ID NO:19的序列及至少一处与包含SEQ ID NO:19且没有所述突变的IL-2多肽相比消除或降低突变体IL-2多肽对IL-2受体的 $\alpha$ 亚基的亲和力但保留突变体IL-2多肽对中等亲和力IL-2受体的亲和力的氨基酸突变。在另一个实施方案中,该突变体IL-2多肽包含SEQ ID NO:29的序列及至少一处与包含SEQ ID NO:29且没有所述突变的IL-2多肽相比消除或降低突变体

IL-2多肽对IL-2受体的 $\alpha$ 亚基的亲合力但保留突变体IL-2多肽对中等亲合力IL-2受体的亲和力的氨基酸突变。

[0113] 在一个具体实施方案中,该突变体IL-2多肽能引发一种或多种选自由下述各项组成的组的细胞应答:激活的T淋巴细胞中的增殖,激活的T淋巴细胞中的分化,细胞毒性T细胞(CTL)活性,激活的B细胞中的增殖,激活的B细胞中的分化,天然杀伤(NK)细胞中的增殖,NK细胞中的分化,激活的T细胞或NK细胞的细胞因子分泌,和NK/淋巴细胞激活的杀伤(LAK)抗肿瘤细胞毒性。

[0114] 在一个实施方案中,该突变体IL-2多肽具有与野生型IL-2多肽相比降低的诱导调节性T细胞中的IL-2信号传导的能力。在一个实施方案中,该突变体IL-2多肽诱导与野生型IL-2多肽相比更少的T细胞中的激活诱导的细胞死亡(AICD)。在一个实施方案中,该突变体IL-2多肽具有与野生型IL-2多肽相比降低的体内毒性概况。在一个实施方案中,该突变体IL-2多肽具有与野生型IL-2多肽相比延长的血清半衰期。

[0115] 在本发明中有一种特定突变体IL-2多肽包含四处在与IL-2的残基3,42,45和72对应的位置处的氨基酸替代。具体的氨基酸替代是T3A,F42A,Y45A和L72G。如WO 2012/107417中证明的,所述四重突变体IL-2多肽展现检测不到的对CD25的结合,降低的诱导T细胞中的凋亡的能力,降低的诱导T<sub>reg</sub>细胞中的IL-2信号传导的能力,和降低的体内毒性概况。然而,它保留激活效应细胞中的IL-2信号传导,诱导效应细胞的增殖,和由NK细胞生成IFN- $\gamma$ 作为次级细胞因子的能力。

[0116] 而且,所述突变体IL-2多肽具有别的有利特性,诸如降低的表面疏水性,好的稳定性,和好的表达产量,如WO 2012/107417中描述的。出乎意料地,所述突变体IL-2多肽还提供与野生型IL-2相比延长的血清半衰期。

[0117] 在具有IL-2中形成IL-2与CD25的界面或糖基化位点的区域中的突变以外,在本发明中有用的IL-2突变体还可以具有在这些区域以外的氨基酸序列中的一处或多处突变。人IL-2中的此类另外的突变可提供另外的优点,诸如升高的表达或稳定性。例如,可以用中性氨基酸,诸如丝氨酸,丙氨酸,苏氨酸或缬氨酸替换位置125处的半胱氨酸,分别产生C125S IL-2,C125A IL-2,C125T IL-2或C125V IL-2,如美国专利No.4,518,584中描述的。如其中描述的,还可以删除IL-2的N末端丙氨酸残基,产生诸如des-A1 C125S或des-A1C125A等突变体。代替地/组合地,该IL-2突变体可包括突变,其中在正常情况下在野生型人IL-2的位置104处存在的甲硫氨酸用中性氨基酸,诸如丙氨酸替换(见美国专利No.5,206,344)。所得突变体,例如des-A1 M104A IL-2,des-A1 M104A C125S IL-2,M104A IL-2,M104A C125A IL-2,des-A1 M104AC125A IL-2,或M104AC125S IL-2(这些和其它突变体可以在美国专利No.5,116,943中和在Weiger et al.,Eur J Biochem 180,295-300(1989)中找到)可以与本发明的特定IL-2突变组合使用。

[0118] 如此,在某些实施方案中,该突变体IL-2多肽包含在与IL-2的残基125对应的位置处的另外的氨基酸突变。在一个实施方案中,所述另外的氨基酸突变是氨基酸替代C125A。

[0119] 技术人员会能够确定哪些另外的突变可以为本发明的目的提供另外的优点。例如,他会领会IL-2序列中降低或消除IL-2对中等亲合力IL-2受体的亲和力的氨基酸突变,诸如D20T,N88R或Q126D(见例如US 2007/0036752)可能不适合于包括在依照本发明的突变

体IL-2多肽中。

[0120] 在一个实施方案中,该突变体IL-2多肽与相应的野生型IL-2序列,例如SEQ ID NO:19的人IL-2序列相比包含不多于12,不多于11,不多于10,不多于9,不多于8,不多于7,不多于6,或不多于5处氨基酸突变。在一个特定实施方案中,该突变体IL-2多肽与相应的野生型IL-2序列,例如SEQ ID NO:19的人IL-2序列相比包含不多于5处氨基酸突变。

[0121] 在一个实施方案中,该突变体IL-2多肽包含SEQ ID NO:20的序列。在一个实施方案中,该突变体IL-2多肽由SEQ ID NO:20的序列组成。

#### [0122] 免疫缀合物

[0123] 如本文中描述的免疫缀合物包含IL-2分子和抗体。通过直接将IL-2靶向入例如肿瘤微环境,此类免疫缀合物显著提高IL-2疗法的功效。依照本发明,该免疫缀合物中包含的抗体可以是整个抗体或免疫球蛋白,或其具有生物学功能,诸如抗原特异性结合亲和力的部分或变体。

[0124] 免疫缀合物疗法的一般益处是显而易见的。例如,免疫缀合物中包含的抗体识别肿瘤特异性表位且导致免疫缀合物分子对肿瘤部位的靶向。因此,能将高浓度的IL-2投递入肿瘤微环境,由此使用比未缀合的IL-2会需要的低得多的剂量的免疫缀合物导致本文中提到的多种免疫效应细胞的激活和增殖。而且,由于以免疫缀合物的形式应用IL-2容许更低剂量的细胞因子自身,因此IL-2的不期望的副作用的可能性受到限制,而且通过免疫缀合物将IL-2靶向身体中的特定部位还可能导致系统性暴露降低和如此比用未缀合的IL-2获得的更少的副作用。另外,免疫缀合物与未缀合的IL-2相比延长的循环半衰期有助于免疫缀合物的功效。然而,IL-2免疫缀合物的这种特征可能再次加剧IL-2分子的潜在副作用:由于血流中IL-2免疫缀合物相对于未缀合的IL-2显著更长的循环半衰期,融合蛋白分子的IL-2或其它部分激活脉管系统中一般存在的成分的概率升高。相同的担忧适用于含有与另一种模块,诸如Fc或清蛋白融合(导致IL-2在循环中的半衰期延长)的IL-2的其它融合蛋白。因此,包含如本文中WO 2012/107417中描述的具有与野生型形式的IL-2相比降低的毒性的突变体IL-2多肽的免疫缀合物是特别是有利。

[0125] 如本文中上文描述的,直接将IL-2靶向免疫效应细胞而非肿瘤细胞对于IL-2免疫疗法可能是有利。

[0126] 因而,本发明提供如本文中上文描述的突变体IL-2多肽,和结合PD-1的抗体。在一个实施方案中,该突变体IL-2多肽和该抗体形成融合蛋白,即该突变体IL-2多肽与该抗体分享肽键。在一些实施方案中,该抗体包含由第一和第二亚基构成的Fc域。在一个具体实施方案中,该突变体IL-2多肽在它的氨基末端氨基酸处与该Fc域的亚基之一的羧基末端氨基酸融合,任选地经由接头肽。在一些实施方案中,该抗体是全长抗体。在一些实施方案中,该抗体是免疫球蛋白分子,特别是IgG类免疫球蛋白分子,更加特别是IgG<sub>1</sub>亚类免疫球蛋白分子。在一个此类实施方案中,该突变体IL-2多肽与免疫球蛋白重链之一分享氨基末端肽键。在某些实施方案中,该抗体是抗体片段。在一些实施方案中,该抗体是Fab分子或scFv分子。在一个实施方案中,该抗体是Fab分子。在另一个实施方案中,该抗体是scFv分子。该免疫缀合物还可以包含多于一个抗体。在该免疫缀合物中包含多于一个抗体(例如第一和第二抗体)的情况中,每个抗体可以独立选自各种形式的抗体和抗体片段。例如,该第一抗体可以是Fab分子且该第二抗体可以是scFv分子。在一个具体实施方案中,所述第一和所述第二抗

体每个是scFv分子或所述第一和所述第二抗体每个是Fab分子。在一个特定实施方案中,所述第一和所述第二抗体每个是Fab分子。在一个实施方案中,所述第一和所述第二抗体每个结合PD-1。

[0127] 免疫缀合物格式

[0128] 例示性免疫缀合物格式描述于PCT公开文本No. WO 2011/020783,通过援引将其完整收入本文。这些免疫缀合物包含至少两个抗体。如此,在一个实施方案中,依照本发明的免疫缀合物包含如本文中描述的突变体IL-2多肽,和至少第一和第二抗体。在一个特定实施方案中,所述第一和第二抗体独立选自由Fv分子,特别是scFv分子,和Fab分子组成的组。在一个具体实施方案中,所述突变体IL-2多肽与所述第一抗体分享氨基或羧基末端肽键且所述第二抗体与i)该突变体IL-2多肽或ii)该第一抗体分享氨基或羧基末端肽键。在一个特定实施方案中,该免疫缀合物本质上由通过一个或多个接头序列连接的突变体IL-2多肽和第一和第二抗体,特别是Fab分子组成。此类格式具有如下优点,即它们以高亲和力结合靶抗原(PD-1),但是仅仅提供对IL-2受体的单体结合,如此避免将免疫缀合物靶向除了靶部位以外的位置处的携带IL-2受体的免疫细胞。在一个特定实施方案中,突变体IL-2多肽与第一抗体,特别是第一Fab分子分享羧基末端肽键,而且进一步地与第二抗体,特别是第二Fab分子分享氨基末端肽键。在另一个实施方案中,第一抗体,特别是第一Fab分子与突变体IL-2多肽分享羧基末端肽键,而且进一步地与第二抗体,特别是第二Fab分子分享氨基末端肽键。在另一个实施方案中,第一抗体,特别是第一Fab分子与第一突变体IL-2多肽分享氨基末端肽键,而且进一步地与第二抗体,特别是第二Fab分子分享羧基末端肽键。在一个特定实施方案中,突变体IL-2多肽与第一重链可变区分享羧基末端肽键且进一步地与第二重链可变区分享氨基末端肽键。在另一个实施方案中,突变体IL-2多肽与第一轻链可变区分享羧基末端肽键且进一步地与第二轻链可变区分享氨基末端肽键。在另一个实施方案中,第一重或轻链可变区通过羧基末端肽键连接突变体IL-2多肽且进一步地通过氨基末端肽键连接第二重或轻链可变区。在另一个实施方案中,第一重或轻链可变区通过氨基末端肽键连接突变体IL-2多肽且进一步通过羧基末端肽键连接第二重或轻链可变区。在一个实施方案中,突变体IL-2多肽与第一Fab重或轻链分享羧基末端肽键且进一步与第二Fab重或轻链分享氨基末端肽键。在另一个实施方案中,第一Fab重或轻链与突变体IL-2多肽分享羧基末端肽键且进一步与第二Fab重或轻链分享氨基末端肽键。在其它实施方案中,第一Fab重或轻链与突变体IL-2多肽分享氨基末端肽键且进一步与第二Fab重或轻链分享羧基末端肽键。在一个实施方案中,该免疫缀合物包含突变体IL-2多肽,其与一个或多个scFv分子分享氨基末端肽键且进一步与一个或多个scFv分子分享羧基末端肽键。

[0129] 然而,对于依照本发明的免疫缀合物特别合适的格式包含免疫球蛋白分子作为抗体。此类免疫缀合物格式描述于WO 2012/146628,通过援引将其完整收入本文。

[0130] 因而,在特定实施方案中,该免疫缀合物包含如本文中描述的突变体IL-2多肽和结合PD-1的免疫球蛋白分子,特别是IgG分子,更加特别是IgG<sub>1</sub>分子。在一个实施方案中,该免疫缀合物包含不多于一个突变体IL-2多肽。在一个实施方案中,该免疫球蛋白分子是人的。在一个实施方案中,该免疫球蛋白分子包含人恒定区,例如人CH1,CH2,CH3和/或CL域。在一个实施方案中,该免疫球蛋白包含人Fc域,特别是人IgG<sub>1</sub> Fc域。在一个实施方案中,该突变体IL-2多肽与该免疫球蛋白分子分享氨基或羧基末端肽键。在一个实施方案中,该免

疫缀合物本质上由通过一个或多个接头序列连接的突变体IL-2多肽和免疫球蛋白分子,特别是IgG分子,更加特别是IgG<sub>1</sub>分子组成。在一个具体实施方案中,该突变体IL-2多肽在它的氨基末端氨基酸处与该免疫球蛋白重链之一的羧基末端氨基酸融合,任选地经由接头肽。

[0131] 该突变体IL-2多肽可以直接或经由包含一个或多个氨基酸,典型地约2-20个氨基酸的接头肽与该抗体融合。接头肽是本领域已知的且在本文中有描述。合适的非免疫原性接头肽包括例如(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, (SG<sub>4</sub>)<sub>n</sub>, (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>或G<sub>4</sub>(SG<sub>4</sub>)<sub>n</sub>接头肽。“n”一般是1至10,典型地2至4的整数。在一个实施方案中,该接头肽具有至少5个氨基酸的长度,在一个实施方案中,5至100个氨基酸的长度,在又一个实施方案中,10至50个氨基酸的长度。在一个特定实施方案中,该接头肽具有15个氨基酸的长度。在一个实施方案中,该接头肽是(GxS)<sub>n</sub>或(GxS)<sub>n</sub>G<sub>m</sub>,其中G=甘氨酸,S=丝氨酸,且(x=3,n=3,4,5或6,且m=0,1,2或3)或(x=4,n=2,3,4或5且m=0,1,2或3),在一个实施方案中,x=4和n=2或3,在又一个实施方案中,x=4且n=3。在一个特定实施方案中,该接头肽是(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>(SEQ ID NO:21)。在一个实施方案中,该接头肽具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列(或由其组成)。

[0132] 在一个特定实施方案中,该免疫缀合物包含突变体IL-2分子和结合PD-1的免疫球蛋白分子,特别是IgG<sub>1</sub>亚类免疫球蛋白分子,其中该突变体IL-2分子在它的氨基末端氨基酸处经由SEQ ID NO:21的接头肽与该免疫球蛋白重链之一的羧基末端氨基酸融合。

[0133] 在一个特定实施方案中,该免疫缀合物包含突变体IL-2分子和结合PD-1的抗体,其中该抗体包含由第一和第二亚基构成的Fc域,特别是人IgG<sub>1</sub> Fc域,且该突变体IL-2分子在它的氨基末端氨基酸处经由SEQ ID NO:21的接头肽与该Fc域的亚基之一的羧基末端氨基酸融合。

#### [0134] PD-1抗体

[0135] 本发明的免疫缀合物中包含的抗体结合PD-1,特别是人PD-1,而且能够将突变体IL-2多肽引导至PD-1在那里表达的靶部位,特别是表达PD-1的T细胞,例如与肿瘤有关的。

[0136] 可以在本发明的免疫缀合物中使用的合适的PD-1抗体描述于PCT专利申请No.PCT/EP2016/073248,通过援引将其完整收入本文。

[0137] 本发明的免疫缀合物可包含两个或更多个抗体,它们可结合相同或不同的抗原。然而,在特定实施方案中,这些抗体中的每个结合PD-1。在一个实施方案中,本发明的免疫缀合物中包含的抗体是单特异性的。在一个特定实施方案中,该免疫缀合物包含单个单特异性抗体,特别是单特异性免疫球蛋白分子。

[0138] 该抗体可以是任何类型的抗体或其保留对PD-1,特别是人PD-1的特异性结合的片段。抗体片段包括但不限于Fv分子,scFv分子,Fab分子,和F(ab')<sub>2</sub>分子。然而,在特定实施方案中,该抗体是全长抗体。在一些实施方案中,该抗体包含由第一和第二亚基构成的Fc域。在一些实施方案中,该抗体是免疫球蛋白,特别是IgG类,更加特别是IgG<sub>1</sub>亚类免疫球蛋白。

[0139] 在一些实施方案中,该抗体是单克隆抗体。

[0140] 在一些实施方案中,该抗体包含包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3,在依照Kabat编号方式的位置71-73处包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的FR-H3,包含SEQ ID NO:4

的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3。

[0141] 在一些实施方案中,该抗体包含(a)重链可变区(VH),其包含包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3,和在依照Kabat编号方式的位置71-73处包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的FR-H3,和(b)轻链可变区(VL),其包含包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,该重和/或轻链可变区是人源化可变区。在一些实施方案中,该重和/或轻链可变区包含人框架区(FR)。

[0142] 在一些实施方案中,该抗体包含包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H2,包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3,包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L3。

[0143] 在一些实施方案中,该抗体包含(a)重链可变区(VH),其包含包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3,和(b)轻链可变区(VL),其包含包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,该重和/或轻链可变区是人源化可变区。在一些实施方案中,该重和/或轻链可变区包含人框架区(FR)。

[0144] 在一些实施方案中,该抗体包含包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,该抗体包含包含与选自SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,和SEQ ID NO:18组成的组的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,该抗体包含(a)包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区(VH),和(b)包含与选自SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,和SEQ ID NO:18组成的组的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0145] 在一个特定实施方案中,该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变区(VH),和(b)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0146] 在一些实施方案中,该抗体是人源化抗体。在一个实施方案中,该抗体是包含人恒定区的免疫球蛋白分子,特别是包含人CH1,CH2,CH3和/或CL域的IgG类免疫球蛋白分子。人恒定域的例示性序列在SEQ ID NO 31和32(分别是人卡帕和拉姆达CL域)和SEQ ID NO:33(人IgG1重链恒定域CH1-CH2-CH3)中给出。在一些实施方案中,该抗体包含包含SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:32的氨基酸序列,特别是SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链恒定区。在一些实施方案中,该抗体包含包含与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链恒定区。特别地,该重链恒定区可包含如本文中描述的Fc域中的氨基酸突变。

[0147] Fc域

[0148] 在特定实施方案中,依照本发明的免疫缀合物中包含的抗体包含由第一和第二亚

基构成的Fc域。抗体的Fc域由一对包含免疫球蛋白分子重链域的多肽链组成。例如,免疫球蛋白G(IgG)分子的Fc域是二聚体,其每个亚基包含CH2和CH3 IgG重链恒定域。Fc域的两个亚基能够彼此稳定联合。在一个实施方案中,本发明的免疫缀合物包含不超过一个Fc域。

[0149] 在一个实施方案中,免疫缀合物中包含的抗体的Fc域是IgG Fc域。在一个具体的实施方案中,Fc域是IgG<sub>1</sub> Fc域。在另一个实施方案中,Fc域是IgG<sub>4</sub> Fc域。在一个更加具体的实施方案中,Fc域是包含位置S228(Kabat EU索引编号方式)处的氨基酸替代,特别是氨基酸替代S228P的IgG<sub>4</sub> Fc域。此氨基酸替代降低IgG<sub>4</sub>抗体的体内Fab臂交换(参见Stubenrauch等,Drug Metabolism and Disposition 38,84-91(2010))。在又一个具体的实施方案中,Fc域是人Fc域。在一个甚至更加具体的实施方案中,Fc域是人IgG<sub>1</sub> Fc域。人IgG<sub>1</sub> Fc区的一种例示性序列在SEQ ID NO:30中给出。

[0150] 促进异二聚化的Fc域修饰

[0151] 依照本发明的免疫缀合物包含突变体IL-2多肽,特别是单个(不多于一个)突变体IL-2多肽,其融合至Fc域的两个亚基之一或另一个,如此Fc域的两个亚基通常包含在两条不相同的多肽链中。这些多肽的重组共表达和随后二聚化导致两种多肽的数种可能组合。为了改进重组生产中免疫缀合物的产量和纯度,如此在抗体的Fc域中引入促进期望多肽联合的修饰会是有利的。

[0152] 因而,在具体的实施方案中,依照本发明的免疫缀合物中包含的抗体的Fc域包含促进Fc域的第一和第二亚基联合的修饰。人IgG Fc域的两个亚基之间最广泛的蛋白质-蛋白质相互作用的位点在Fc域的CH3域中。如此,在一个实施方案中,所述修饰在Fc域的CH3域中。

[0153] 有数种办法来修饰Fc域的CH3域以加强异二聚化,它们详细记载于例如WO 96/27011,WO 98/050431,EP 1870459,WO 2007/110205,WO 2007/147901,WO 2009/089004,WO 2010/129304,WO 2011/90754,WO 2011/143545,WO 2012058768,WO 2013157954,WO 2013096291。典型地,在所有此类办法中,Fc域的第一亚基的CH3域和Fc域的第二亚基的CH3域二者以互补方式进行工程化改造使得每个CH3域(或包含它的重链)不再能与其自身同二聚化但被迫与互补工程化改造的其它CH3域异二聚化(使得第一和第二CH3域异二聚化且两个第一CH3域或两个第二CH3域之间不形成同二聚体)。

[0154] 在一个特定的实施方案中,所述促进Fc域的第一亚基和第二亚基联合的修饰是所谓的“节-入-穴”修饰,其包含在Fc域的两个亚基之一中的“节”修饰和在Fc域的两个亚基之一中的“穴”修饰。

[0155] 节-入-穴技术记载于例如US 5,731,168;US 7,695,936;Ridgway等,Prot Eng 9,617-621(1996)和Carter,J Immunol Meth 248,7-15(2001)。一般地,该方法牵涉在第一多肽的界面处引入隆起(“节”)并在第二多肽的界面中引入相应的空腔(“穴”),使得隆起可以置于空腔中从而促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过将来自第一多肽界面的小氨基酸侧链用更大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换来构建隆起。在第二多肽的界面中创建具有与隆起相同或相似大小的互补性空腔,其通过将大氨基酸侧链用更小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换进行。

[0156] 因而,在一个具体的实施方案中,在免疫缀合物中包含的抗体的Fc域的第一亚基的CH3域中,一个氨基酸残基用具有更大侧链体积的氨基酸残基替换,由此在第一亚基的



CH3域内生成隆起,其可安置于第二亚基的CH3域内的空腔中,而且在Fc域的第二亚基的CH3域中,一个氨基酸残基用具有更小侧链体积的氨基酸残基替换,由此在第二亚基的CH3域内生成空腔,其中可安置第一亚基的CH3域内的隆起。

[0157] 优选地,所述具有更大侧链体积的氨基酸残基选自下组:精氨酸(R),苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),和色氨酸(W)。

[0158] 优选地,所述具有更小侧链体积的氨基酸残基选自下组:丙氨酸(A),丝氨酸(S),苏氨酸(T),和缬氨酸(V)。

[0159] 可以通过改变编码多肽的核酸,例如通过位点特异性诱变或通过肽合成来生成隆起和空腔。

[0160] 在一个特定的实施方案中,在Fc域第一亚基的CH3域(“节”亚基)中,第366位的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W),而在Fc域第二亚基的CH3域(“穴”亚基)中,第407位的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V)。在一个实施方案中,在Fc域第二亚基中,另外,第366位的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且第368位的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L368A)(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0161] 在还有又一个实施方案中,在Fc域的第一亚基中,另外,第354位的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换(S354C)或第356位的谷氨酸残基用半胱氨酸残基替换(E356C)(特别是,第354位的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换),而在Fc域的第二亚基中,另外,第349位的酪氨酸残基用半胱氨酸残基替换(Y349C)(编号方式依照Kabat EU索引)。这两个半胱氨酸残基的引入导致在Fc域的两个亚基之间形成二硫桥,进一步稳定了二聚体(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15(2001))。

[0162] 在一个具体的实施方案中,Fc域的第一亚基包含氨基酸替代S354C和T366W,且Fc域的第二亚基包含氨基酸替代Y349C, T366S, L368A和Y407V(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0163] 在一些实施方案中,Fc域的第二亚基另外包含氨基酸替代H435R和Y436F(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0164] 在一个具体的实施方案中,将突变体IL-2多肽融合(任选地经由接头肽)至Fc域的第一亚基(其包含“节”修饰)。不希望受理论束缚,突变体IL-2多肽与Fc域的含节的亚基的融合会(进一步)使包含两个突变体IL-2多肽的免疫缀合物的生成最小化(两条含节的多肽的空间碰撞)。

[0165] 涵盖修饰CH3以增强异二聚化的其它技术作为依照本发明的备选,它们记载于例如WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291。

[0166] 在一个实施方案中,备选地使用EP 1870459中记载的异二聚化办法。这种办法基于在Fc域的两个亚基之间的CH3/CH3域界面中的特定氨基酸位置引入具有相反电荷的带电氨基酸。本发明的免疫缀合物中包含的抗体的一个优选的实施方案是(Fc域的)两个CH3域之一中的氨基酸突变R409D; K370E和Fc域的CH3域之另一中的氨基酸突变D399K; E357K(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0167] 在另一个实施方案中,本发明的免疫缀合物中包含的抗体包含Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变T366W和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变T366S, L368A,

Y407V, 和另外的Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变R409D;K370E和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变D399K;E357K(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0168] 在另一个实施方案中,本发明的免疫缀合物中包含的抗体包含Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变S354C, T366W和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变Y349C, T366S, L368A, Y407V, 或所述抗体包含Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变Y349C, T366W和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变S354C, T366S, L368A, Y407V和另外的Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变R409D;K370E和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变D399K;E357K(所有编号方式依照Kabat EU索引)。

[0169] 在一个实施方案中,备选地使用WO 2013/157953中记载的异二聚化办法。在一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变T366K且第二CH3域包含氨基酸突变L351D(编号方式依照Kabat EU索引)。在又一个实施方案中,第一CH3域进一步包含氨基酸突变L351K。在又一个实施方案中,第二CH3域进一步包含选自Y349E, Y349D和L368E的氨基酸突变(优选L368E)(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0170] 在一个实施方案中,备选地使用WO 2012/058768中记载的异二聚化办法。在一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变L351Y, Y407A且第二CH3域包含氨基酸突变T366A, K409F。在又一个实施方案中,第二CH3域进一步包含位置T411, D399, S400, F405, N390, 或K392处的氨基酸突变,例如选自a) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E或T411W, b) D399R, D399W, D399Y或D399K, c) S400E, S400D, S400R, 或S400K, d) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V或F405W, e) N390R, N390K或N390D, f) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F或K392E(编号方式依照Kabat EU索引)。在又一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变L351Y, Y407A且第二CH3域包含氨基酸突变T366V, K409F。在又一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变Y407A且第二CH3域包含氨基酸突变T366A, K409F。在又一个实施方案中,第二CH3域进一步包含氨基酸突变K392E, T411E, D399R和S400R(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0171] 在一个实施方案中,备选地使用WO 2011/143545中记载的异二聚化办法,例如进行选自下组的位置处的氨基酸修饰:368和409(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0172] 在一个实施方案中,备选地使用WO2011/090762中记载的异二聚化办法,它也使用上文所述节-入-穴技术。在一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变T366W且第二CH3域包含氨基酸突变Y407A。在一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变T366Y且第二CH3域包含氨基酸突变Y407T(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0173] 在一个实施方案中,免疫缀合物中包含的抗体或它的Fc域是IgG<sub>2</sub>亚类的且备选地使用WO 2010/129304中记载的异二聚化办法。

[0174] 在一个备选的实施方案中,促进Fc域的第一和第二亚基联合的修饰包含介导静电操纵效应(electrostatic steering effect)的修饰,例如如记载于PCT公开文本WO 2009/089004的。一般地,此方法涉及将在两个Fc域亚基界面处的一个或多个氨基酸残基替换为带电荷的氨基酸残基,从而在静电上不利于同二聚体形成而在静电上有利于异二聚化。在一个此类实施方案中,第一CH3域包含带负电荷的氨基酸(例如谷氨酸(E), 或天冬氨酸(D))对K392或N392的氨基酸替代(优选K392D或N392D)且第二CH3域包含带正电荷的氨基酸(例如赖氨酸(K)或精氨酸(R))对D399, E356, D356, 或E357的氨基酸替代(优选D399K, E356K,

D356K, 或E357K, 更优选D399K和E356K)。在又一个实施方案中, 第一CH3域进一步包含带负电荷的氨基酸(例如谷氨酸(E), 或天冬氨酸(D))对K409或R409的氨基酸替代, 优选K409D或R409D。在又一个实施方案中, 第一CH3域进一步或二选一地包含带负电荷的氨基酸(例如谷氨酸(E), 或天冬氨酸(D))对K439和/或K370的氨基酸替代(所有编号方式依照Kabat EU索引)。

[0175] 在还有又一个实施方案中, 备选地使用W0 2007/147901中记载的异二聚化办法。在一个实施方案中, 第一CH3域包含氨基酸突变K253E, D282K, 和K322D且第二CH3域包含氨基酸突变D239K, E240K, 和K292D(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0176] 在仍有另一个实施方案中, 可以备选地使用W0 2007/110205中记载的异二聚化办法。

[0177] 在一个实施方案中, Fc域的第一亚基包含氨基酸替代K392D和K409D, 且Fc域的第二亚基包含氨基酸替代D356K和D399K(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0178] 降低Fc受体结合和/或效应器功能的Fc域修饰

[0179] Fc域赋予免疫缀合物以有利的药动学特性, 包括长血清半衰期, 其有助于在靶组织中的较好积累和有利的组织-血液分配比。然而, 同时它可能导致不想要的免疫缀合物对表达Fc受体的细胞而非优选的携带抗原的细胞的靶向。此外, Fc受体信号传导途径的共激活可能导致细胞因子释放, 其与免疫缀合物的IL-2多肽和长半衰期组合, 在系统性施用后引起细胞因子受体的过度活化和严重的副作用。与此一致, 已经描述了常规IgG-IL-2免疫缀合物与输注反应有关(见例如King et al., J Clin Oncol 22, 4463-4473(2004))。

[0180] 因而, 在具体的实施方案中, 依照本发明的免疫缀合物中包含的抗体的Fc域展现出与天然IgG<sub>1</sub> Fc域相比降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应器功能。在一个此类实施方案中, Fc域(或包含所述Fc域的抗体)展现出与天然IgG<sub>1</sub> Fc域(或包含天然IgG<sub>1</sub> Fc域的抗体)相比少于50%, 优选少于20%, 更优选少于10%且最优选少于5%的对Fc受体的结合亲和力, 和/或与天然IgG<sub>1</sub> Fc域(或包含天然IgG<sub>1</sub> Fc域的抗体)相比少于50%, 优选少于20%, 更优选少于10%且最优选少于5%的效应器功能。在一个实施方案中, Fc域(或包含所述Fc域的抗体)没有实质性结合Fc受体和/或诱导效应器功能。在一个具体的实施方案中, 所述Fc受体是Fc $\gamma$ 受体。在一个实施方案中, 所述Fc受体是人Fc受体。在一个实施方案中, 所述Fc受体是活化性Fc受体。在一个特定的实施方案中, 所述Fc受体是活化性人Fc $\gamma$ 受体, 更具体地是人Fc $\gamma$ RIIIa, Fc $\gamma$ RI或Fc $\gamma$ RIIa, 最具体地是人Fc $\gamma$ RIIIa。在一个实施方案中, 效应器功能是选自下组的一项或多项: CDC, ADCC, ADCP, 和细胞因子分泌。在一个具体的实施方案中, 所述效应器功能是ADCC。在一个实施方案中, 所述Fc域展现出与天然IgG<sub>1</sub> Fc域相比基本相似的对新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和力。当Fc域(或包含所述Fc域的抗体)展现出超过约70%, 特别是超过约80%, 更特别是超过约90%的天然IgG<sub>1</sub> Fc域(或包含天然IgG<sub>1</sub> Fc域的抗体)对FcRn的结合亲和力时, 实现基本相似的对FcRn的结合。

[0181] 在某些实施方案中, Fc域工程化改造为具有与非工程化Fc域相比降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应器功能。在具体的实施方案中, 免疫缀合物中包含的抗体的Fc域包含一处或多处降低Fc域对Fc受体的结合亲和力和/或效应器功能的氨基酸突变。通常, Fc域的两个亚基的每一个中存在相同的一处或多处氨基酸突变。在一个实施方案中, 所述氨基酸突变降低Fc域对Fc受体的结合亲和力。在一个实施方案中, 所述氨基酸突变将Fc

域对Fc受体的结合亲和力降低至少2倍,至少5倍,或至少10倍。在有超过一处降低Fc域对Fc受体的结合亲和力的氨基酸突变的实施方案中,这些氨基酸突变的组合可以将Fc域对Fc受体的结合亲和力降低至少10倍,至少20倍,或甚至至少50倍。在一个实施方案中,包含工程化Fc域的抗体展现出与包含非工程化Fc域的抗体相比少于20%,特别是少于10%,更特别是少于5%的对Fc受体的结合亲和力。在一个具体的实施方案中,Fc受体是Fc $\gamma$ 受体。在一些实施方案中,所述Fc受体是人Fc受体。在一些实施方案中,Fc受体是活化性Fc受体。在一个特定的实施方案中,Fc受体是活化性人Fc $\gamma$ 受体,更特别是人Fc $\gamma$ RIIIa,Fc $\gamma$ RI或Fc $\gamma$ RIIa,最特别是人Fc $\gamma$ RIIIa。优选地,对这些受体的每一种的结合是降低的。在一些实施方案中,对补体成分的结合亲和力,特别是对C1q的结合亲和力也是降低的。在一个实施方案中,对新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和力没有降低。当Fc域(或包含所述Fc域的抗体)展现出非工程化形式的Fc域(或包含所述非工程化形式的Fc域的抗体)对FcRn的结合亲和力的超过约70%时,实现基本相似的对FcRn的结合,即保留该Fc域对所述受体的结合亲和力。Fc域或包含所述Fc域的本发明的免疫缀合物中包含的抗体可以展现出超过约80%和甚至超过约90%的此类亲和力。在某些实施方案中,免疫缀合物中包含的抗体的Fc域工程化改造为具有与非工程化Fc域相比降低的效应器功能。所述降低的效应器功能可包括但不限于下列一项或多项:降低的补体依赖性细胞毒性(CDC),降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),降低的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP),降低的细胞因子分泌,降低的免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取,降低的对NK细胞的结合,降低的对巨噬细胞的结合,降低的对单核细胞的结合,降低的对多形核细胞的结合,降低的诱导凋亡的直接信号传导,降低的靶物结合的抗体的交联,降低的树突细胞成熟,或降低的T细胞引发。在一个实施方案中,所述降低的效应器功能是选自下组的一项或多项:降低的CDC,降低的ADCC,降低的ADCP,和降低的细胞因子分泌。在一个具体的实施方案中,所述降低的效应器功能是降低的ADCC。在一个实施方案中,所述降低的ADCC是小于20%的由非工程化Fc域(或包含非工程化Fc域的抗体)诱导的ADCC。

[0182] 在一个实施方案中,所述降低Fc域对Fc受体的结合亲和力和/或效应器功能的氨基酸突变是氨基酸替代。在一个实施方案中,Fc域包含在选自下组的位置处的氨基酸替代:E233,L234,L235,N297,P331和P329(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个更特定的实施方案中,Fc域包含在选自下组的位置处的氨基酸替代:L234,L235和P329(编号方式依照Kabat EU索引)。在一些实施方案中,Fc域包含氨基酸替代L234A和L235A(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个此类实施方案中,Fc域是IgG<sub>1</sub> Fc域,特别是人IgG<sub>1</sub> Fc域。在一个实施方案中,Fc域包含在位置P329处的氨基酸替代。在一个更加特定的实施方案中,氨基酸替代是P329A或P329G,特别是P329G(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个实施方案中,Fc域包含在位置P329处的氨基酸替代和又一处在选自以下位置处的氨基酸替代:E233,L234,L235,N297和P331(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个更加特定的实施方案中,所述又一处氨基酸替代是E233P,L234A,L235A,L235E,N297A,N297D或P331S。在具体的实施方案中,所述Fc域包含在位置P329,L234和L235处的氨基酸替代(编号方式依照Kabat EU索引)。在更具体的实施方案中,所述Fc域包含氨基酸突变L234A,L235A和P329G(“P329G LALA”,“PGLALA”或“LALAPG”)。具体而言,在具体的实施方案中,所述Fc域的每个亚基包含氨基酸替代L234A,L235A和P329G(Kabat EU索引编号方式),即在所述Fc域的第一和第二亚基每个中,第234位

的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L234A),第235位的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L235A)且第329位的脯氨酸残基用甘氨酸残基替换(P329G)(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个此类实施方案中,Fc域是IgG<sub>1</sub> Fc域,特别是人IgG<sub>1</sub> Fc域。氨基酸替代组合“P329G LALA”几乎完全消除了人IgG<sub>1</sub> Fc域的Fc $\gamma$ 受体(以及补体)结合,如记载于PCT公开文本No.WO 2012/130831,其通过提述完整并入本文。WO 2012/130831还描述了制备此类突变体Fc域的方法和用于测定其特性(诸如Fc受体结合或效应器功能)的方法。

[0183] IgG<sub>4</sub>抗体展现出与IgG<sub>1</sub>抗体相比降低的对Fc受体的结合亲和力和降低的效应器功能。因此,在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物中包含的抗体的Fc域是IgG<sub>4</sub> Fc域,特别是人IgG<sub>4</sub> Fc域。在一个实施方案中,所述IgG<sub>4</sub> Fc域包含在位置S228处的氨基酸替代,具体是氨基酸替代S228P(编号方式依照Kabat EU索引)。为了进一步降低其对Fc受体的结合亲和力和/或其效应器功能,在一个实施方案中,所述IgG<sub>4</sub> Fc域包含在位置L235处的氨基酸替代,具体是氨基酸替代L235E(编号方式依照Kabat EU索引)。在另一个实施方案中,所述IgG<sub>4</sub> Fc域包含在位置P329处的氨基酸替代,具体是氨基酸替代P329G(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个具体的实施方案中,所述IgG<sub>4</sub> Fc域包含在位置S228,L235和P329处的氨基酸替代,具体是氨基酸替代S228P,L235E和P329G(编号方式依照Kabat EU索引)。此类IgG<sub>4</sub> Fc域突变体及其Fc $\gamma$ 受体结合特性记载于PCT公开文本No.WO 2012/130831,其通过提述完整并入本文。

[0184] 在一个具体的实施方案中,展现出与天然IgG<sub>1</sub> Fc域相比降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应器功能的Fc域是包含氨基酸替代L234A,L235A和任选地P329G的人IgG<sub>1</sub> Fc域,或包含氨基酸替代S228P,L235E和任选地P329G的人IgG<sub>4</sub> Fc域(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0185] 在某些实施方案中,已消除Fc域的N-糖基化。在一个此类实施方案中,所述Fc域包含在位置N297处的氨基酸突变,特别是用丙氨酸(N297A)或天冬氨酸(N297D)替换天冬酰胺的氨基酸替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0186] 在上文和PCT公开文本No.WO 2012/130831中描述的Fc域以外,具有降低的Fc受体结合和/或效应器功能的Fc域还包括那些具有Fc域残基238,265,269,270,297,327和329中一个或多个的替代的(美国专利No.6,737,056)(编号方式依照Kabat EU索引)。此类Fc突变体包括具有在氨基酸位置265,269,270,297和327的两个或更多个处的替代的Fc突变体,包括所谓的“DANA”Fc突变体,其具有残基265和297到丙氨酸的替代(美国专利No.7,332,581)。

[0187] 可以使用本领域中公知的遗传或化学方法通过氨基酸删除,替代,插入或修饰来制备突变体Fc域。遗传方法可以包括编码DNA序列的位点特异性诱变,PCR,基因合成等。正确的核苷酸变化可以通过例如测序来验证。

[0188] 可以容易地测定对Fc受体的结合,例如通过ELISA或通过使用标准仪器诸如BIAcore仪(GE Healthcare)的表面等离子共振(SPR)进行,并且Fc受体诸如可通过重组表达获得。或者,可使用已知表达特定Fc受体的细胞系,如表达Fc $\gamma$  IIIa受体的人NK细胞来估测Fc域或包含Fc域的抗体对Fc受体的结合亲和力。

[0189] 可通过本领域中已知的方法来测量Fc域或包含Fc域的抗体的效应器功能。评估感兴趣分子的ADCC活性的体外测定法的例子记载于美国专利No.5,500,362;Hellstrom等,

Proc Natl Acad Sci USA 83,7059-7063(1986)和Hellstrom等,Proc Natl Acad Sci USA 82,1499-1502(1985);美国专利No.5,821,337;Bruggemann等,J Exp Med 166,1351-1361(1987)。或者,可采用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定法(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA);和CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定法(Promega,Madison,WI))。对于此类测定法有用的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外,可体内评估感兴趣分子的ADCC活性,例如在动物模型中,诸如披露于Clynes等,Proc Natl Acad Sci USA 95,652-656(1998)的。

[0190] 在一些实施方案中,Fc域对补体成分(特别是对C1q)的结合是降低的。因而,在其中Fc域工程化为具有降低的效应器功能的一些实施方案中,所述降低的效应器功能包括降低的CDC。可实施C1q结合测定法来测定Fc域或包含Fc域的抗体是否能够结合C1q并因此具有CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可实施CDC测定法(参见例如Gazzano-Santoro等,J Immunol Methods 202,163(1996);Cragg等,Blood 101,1045-1052(2003);以及Cragg和Glennie,Blood 103,2738-2743(2004))。

[0191] 还可以使用本领域已知方法实施FcRn结合和体内清除/半衰期测定(见例如Petkova,S.B.et al.,Int'l Immunol.18(12):1759-1769(2006);WO 2013/120929)。

[0192] 本发明的特定方面

[0193] 在一个方面,本发明提供一种包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物,

[0194] 其中该突变体IL-2多肽是包含氨基酸替代F42A,Y45A和L72G(编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO:19)的人IL-2分子;且

[0195] 其中该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变区(VH),和(b)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0196] 在一个方面,本发明提供一种包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物,

[0197] 其中该突变体IL-2多肽是包含氨基酸替代T3A,F42A,Y45A,L72G和C125A(编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO:19)的人IL-2分子;且

[0198] 其中该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变区(VH),和(b)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0199] 在一个方面,本发明提供一种包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物,

[0200] 其中该突变体IL-2多肽包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;且

[0201] 其中该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变区(VH),和(b)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0202] 在依照本发明的任何上述方面的一个实施方案中,该抗体是IgG类免疫球蛋白,其包含由第一和第二亚基构成的人IgG<sub>1</sub> Fc域,

[0203] 其中在该Fc域的第一亚基中位置366处的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W),且在该Fc域的第二亚基中位置407处的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V)且任选地位置366处的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且位置368处的亮氨酸残基用丙氨酸残基

替换(L368A)(编号方式依照Kabat EU索引),且其中进一步地该Fc域的每个亚基包含氨基酸替代L234A,L235A和P329G(Kabat EU索引编号方式)。

[0204] 在这个实施方案中,该突变体IL-2多肽可以经由SEQ ID NO:21的接头肽在它的氨基末端氨基酸处与该Fc域的第一亚基的羧基末端氨基酸融合。

[0205] 在一个方面,本发明提供一种免疫缀合物,其包含包含与SEQ ID NO:22的序列至少约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的多肽,包含与SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24的序列至少约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的多肽,和包含与SEQ ID NO:25的序列至少约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的多肽。

[0206] 多核苷酸

[0207] 本发明还提供分离的多核苷酸,其编码如本文中描述的免疫缀合物或其片段。在一些实施方案中,所述片段是抗原结合片段。

[0208] 可以将编码本发明的免疫缀合物的多核苷酸以编码完整免疫缀合物的单一多核苷酸表达,或以共表达的多种(例如两种或更多种)多核苷酸表达。由共表达的多核苷酸编码的多肽可以经由例如二硫键或其它手段联合以形成功能性免疫缀合物。例如,抗体的轻链部分可以与免疫缀合物中包含抗体的重链部分和突变体IL-2多肽的部分由分开的多核苷酸编码。当共表达时,重链多肽会与轻链多肽联合以形成免疫缀合物。在另一个例子中,免疫缀合物中包含两个Fc域亚基之一和突变体IL-2多肽的部分可以与免疫缀合物中包含两个Fc域亚基中另一个的部分由分开的多核苷酸编码。当共表达时,Fc域亚基会联合以形成Fc域。

[0209] 在一些实施方案中,所述分离的多核苷酸编码整个依照本文所述发明的免疫缀合物。在其它实施方案中,所述分离的多核苷酸编码依照本文所述发明的免疫缀合物中包含的多肽。

[0210] 在一个实施方案中,本发明的分离的多核苷酸编码该免疫缀合物中包含的抗体的重链(例如免疫球蛋白重链),和该突变体IL-2多肽。在另一个实施方案中,本发明的分离的多核苷酸编码该免疫缀合物中包含的抗体的轻链。

[0211] 在某些实施方案中,所述多核苷酸或核酸是DNA。在其它实施方案中,本发明的多核苷酸是RNA,例如以信使RNA(mRNA)的形式。本发明的RNA可以是单链或双链的。

[0212] 重组方法

[0213] 在本发明中有用的突变体IL-2多肽可使用本领域公知的遗传或化学方法通过删除,替代,插入或修饰来制备。遗传方法可包括编码DNA序列的位点特异性诱变,PCR,基因合成,等等。可通过例如测序来验证正确的核苷酸变化。在这点上,天然IL-2的核苷酸序列已经记载于Taniguchi et al.,Nature 302,305-10(1983),而且编码人IL-2的核酸可得自公开的保藏机构,诸如美国典型培养物保藏中心(Rockville,MD)。天然人IL-2的序列显示于SEQ ID NO:19。替代或插入可涉及天然以及非天然氨基酸残基。氨基酸修饰包括公知的化学修饰方法,诸如添加糖基化位点或碳水化合物附着,等等。

[0214] 可以获得本发明的免疫缀合物,例如通过固相肽合成(例如Merrifield固相合成)或重组生成进行。对于重组生成,分离一种或多种编码所述免疫缀合物(片段)的多核苷酸(例如如上文描述的),并将其插入一种或多种载体中用于在宿主细胞中进一步克隆和/或

表达。可以使用常规规程容易分离并测序此类多核苷酸。在一个实施方案中,提供包含一种或多种本发明的多核苷酸的载体(优选为表达载体)。可以使用本领域技术人员公知的方法来构建含有免疫缀合物(片段)的编码序列以及适宜的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术,合成技术和体内重组/遗传重组。参见例如记载于Maniatis等,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,Cold Spring Harbor Laboratory,N.Y.(1989);和Ausubel等,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,Green Publishing Associates and Wiley Interscience,N.Y(1989)的技术。表达载体可以是质粒,病毒的一部分或可以是核酸片段。表达载体包含表达盒,其中在与启动子和/或其它转录或翻译控制元件的可操作联合中克隆编码免疫缀合物(片段)的多核苷酸(即编码区)。如本文中使用的,“编码区”是核酸中由翻译成氨基酸的密码子组成的一部分。尽管“终止密码子”(TAG, TGA或TAA)不翻译成氨基酸,但可将其视为编码区的一部分(若存在的话),但任何侧翼序列例如启动子,核糖体结合位点,转录终止子,内含子,5'和3'非翻译区等,不是编码区的一部分。两个或更多个编码区可以存在于单一多核苷酸构建体中(例如单一载体上),或存在于分开多核苷酸构建体中,例如在分开的(不同的)载体上。此外,任何载体可含有单个编码区,或可包含两个或更多个编码区,例如本发明的载体可以编码一种或多种多肽,其经由蛋白水解切割在翻译后或共翻译分开成最终蛋白质。另外,本发明的载体,多核苷酸或核酸可以编码异源编码区,其与编码本发明的免疫缀合物或其变体或衍生物的多核苷酸融合或未融合。异源编码区包括但不限于特殊化的元件或基序,如分泌信号肽或异源功能域。当基因产物例如多肽的编码区与一种或多种调节序列以某种方式联合从而使得该基因产物的表达置于该调节序列的影响或控制下时,即为可操作联合。若诱导启动子功能导致编码期望的基因产物的mRNA的转录并且如果两个DNA片段之间的连接的性质不干扰表达调节序列指导该基因产物表达的能力或不干扰DNA模板被转录的能力,则两个DNA片段(如多肽编码区和与其联合的启动子)为“可操作联合的”。如此,如果启动子能够实现编码多肽的核酸的转录,那么该启动子区将是与该核酸可操作联合。所述启动子可以是细胞特异性启动子,其仅在预先确定的细胞中指导DNA的实质性转录。除启动子以外,其它转录控制元件例如增强子,操纵基因,阻遏物和转录终止信号能与多核苷酸可操作联合以指导细胞特异性转录。在本文中公开了合适的启动子和其它转录控制区。多种转录控制区是本领域技术人员已知的。这些包括但不限于在脊椎动物细胞中发挥功能的转录控制区,如但不限于来自巨细胞病毒的启动子和增强子区段(例如立即早期启动子,以及内含子-A),猿病毒40(例如早期启动子)和逆转录病毒(如例如劳斯(Rous)肉瘤病毒)。其它转录控制区包括那些自脊椎动物基因如肌动蛋白,热休克蛋白,牛生长激素和家兔 $\beta$ -珠蛋白衍生的,以及能够控制真核细胞中基因表达的其它序列。另外的合适的转录控制区包括组织特异性启动子和增强子以及诱导型启动子(例如四环素诱导型启动子)。类似地,多种翻译控制元件是本领域普通技术人员已知的。这些包括但不限于核糖体结合位点,翻译起始和终止密码子以及自病毒系统衍生的元件(具体地,内部核糖体进入位点或IRES,也称作CITE序列)。表达盒还可以包含其它特征,如复制起点和/或染色体整合元件,如逆转录病毒长末端重复(LTR)或腺伴随病毒(AAV)反向末端重复(ITR)。

[0215] 本发明的多核苷酸和核酸编码区可以与编码分泌或信号肽的另外的编码区联合,所述分泌或信号肽指导由本发明的多核苷酸编码的多肽的分泌。依照信号假说,由哺乳动



物细胞分泌的蛋白质具有信号肽或分泌前导序列,一旦启动将生长的蛋白质链跨越粗面内质网输出,就将该信号肽或分泌前导序列从成熟的蛋白质切去。本领域中普通技术人员知晓由脊椎动物细胞分泌的多肽一般具有融合至多肽N端的信号肽,其从所翻译的多肽切去以生成分泌性或“成熟”形式的多肽。例如,与在多肽N端的20个氨基酸的信号序列一起翻译人IL-2,前者随后被切掉以生成成熟的133个氨基酸的人IL-2。在某些实施方案中,使用天然的信号肽,例如IL-2信号肽或免疫球蛋白重链或轻链信号肽,或该序列的保留指导与其可操作联合的多肽分泌的能力的功能性衍生物。或者,可以使用异源哺乳动物信号肽或其功能性衍生物。例如,可以将野生型前导序列用人组织血纤维蛋白溶酶原激活剂(TPA)或小鼠 $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶的前导序列替代。

[0216] 可以将编码能用于促进后期纯化(例如组氨酸标签)或辅助标记免疫缀合物的短蛋白序列的DNA纳入免疫缀合物(片段)编码多核苷酸内或其末端。

[0217] 在一个别的实施方案中,提供包含本发明的一种或多种多核苷酸的宿主细胞。在某些实施方案中,提供包含本发明的一种或多种载体的宿主细胞。多核苷酸和载体可以单独地或组合地掺入本文中分别关于多核苷酸和载体所描述的任何特征。在一个此类实施方案中,宿主细胞包含一种或多种载体(例如已用该载体转化或转染),所述一种或多种载体包含编码本发明免疫缀合物的一种或多种多核苷酸。如本文中使用的,术语“宿主细胞”指任何能工程化以生成本发明的免疫缀合物或其片段的细胞系统种类。适用于复制并支持免疫缀合物表达的宿主细胞是本领域中公知的。在适当时,可用特定的表达载体转染或转导此类细胞,并且可以培养大量的含载体细胞以用于接种大规模发酵罐,从而获得充足量的免疫缀合物用于临床应用。合适的宿主细胞包括原核微生物如大肠杆菌,或各种真核细胞,如中国仓鼠卵巢细胞(CHO),昆虫细胞等。例如,可以在细菌中生成多肽,尤其在不需糖基化时。在表达后,可以将多肽在可溶性级分中从细菌细胞糊分离并可以进一步纯化。除了原核生物外,真核微生物如丝状真菌或酵母也是适合编码多肽的载体的克隆或表达宿主,包括其糖基化途径已被“人源化”,导致生成具有部分或完全人的糖基化样式的多肽的真菌和酵母菌株。参见Gerngross, *Nat Biotech* 22,1409-1414(2004),和Li等, *Nat Biotech* 24,210-215(2006)。适用于表达(糖基化)多肽的宿主细胞还自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)衍生。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已鉴定出可与昆虫细胞一起使用的大量杆状病毒株,特别是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。也可以将植物细胞培养物用作宿主。参见例如美国专利No.5,959,177,6,040,498,6,420,548,7,125,978和6,417,429(描述用于在转基因植物中生成抗体的PLANTIBODIES™技术)。脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如,适应于在悬液中生长的哺乳动物细胞系可以是有用的。可用的哺乳动物宿主细胞系的其它例子是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(293或293T细胞,如例如记载于Graham等, *J Gen Virol* 36,59(1977)),幼仓鼠肾细胞(BHK),小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4细胞,如例如记载于Mather, *Biol Reprod* 23,243-251(1980)的),猴肾细胞(CV1),非洲绿猴肾细胞(VERO-76),人宫颈癌细胞(HELA),犬肾细胞(MDCK),牛鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A),人肺细胞(W138),人肝细胞(Hep G2),小鼠乳房肿瘤细胞(MMT 060562),TRI细胞(如例如记载于Mather等, *Annals N.Y.Acad Sci* 383,44-68(1982)的),MRC 5细胞和FS4细胞。其它可用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括dhfr<sup>-</sup>CHO细胞(Urlaub等, *Proc Natl Acad Sci USA* 77,4216(1980));和骨

髓瘤细胞系如Y0, NS0, P3X63和Sp2/0。对于某些适用于蛋白质生产的哺乳动物宿主细胞系的综述, 参见例如Yazaki和Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷 (B.K.C.Lo编, Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)。宿主细胞包括培养的细胞, 例如哺乳动物培养细胞, 酵母细胞, 昆虫细胞, 细菌细胞和植物细胞等, 但还包括在转基因动物, 转基因植物或培养的植物或动物组织中包含的细胞。在一个实施方案中, 宿主细胞是真核细胞, 优选为哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 人胚肾 (HEK) 细胞或淋巴样细胞 (例如Y0, NS0, Sp20细胞)。

[0218] 本领域中已知在这些系统中表达外来基因的标准技术。可以将表达与抗体的重链或轻链融合的突变体IL-2多肽的细胞工程化改造为使得还表达另一抗体链, 从而使得表达的突变体IL-2融合产物是具有重链和轻链两者的抗体。

[0219] 在一个实施方案中, 提供了生成依照本发明的免疫缀合物的方法, 其中所述方法包括在适合于所述免疫缀合物表达的条件下培养包含编码免疫缀合物的一种或多种多核苷酸的宿主细胞 (如本文中提供的), 并任选从宿主细胞 (或宿主细胞培养基) 回收所述免疫缀合物。

[0220] 在本发明的免疫缀合物中, 可以将突变体IL-2多肽与抗体遗传融合或化学缀合。IL-2多肽与抗体的遗传融合可以设计成使得IL-2序列与多肽直接或经由接头序列间接融合。接头的组成和长度可以依照本领域公知方法来确定且可以针对功效进行测试。本文中描述了特定的接头肽。在想要时, 还可以包括另外的序列以掺入切割位点来分开融合物的各个构件, 例如内肽酶识别序列。另外, 也可以使用本领域公知的多肽合成的方法 (例如 Merrifield 固相合成) 化学合成IL-2融合蛋白。可以使用公知的化学缀合方法将突变体IL-2多肽与其它分子, 例如抗体化学缀合。可以将本领域已知的双官能交联试剂, 诸如同官能和异官能交联试剂用于这个目的。要使用的交联试剂的类型取决于要与IL-2偶联的分子的性质, 而且可以由本领域技术人员容易地鉴定。或者/另外, 可以化学衍生化突变体IL-2和/或意图与其缀合的分子, 使得二者可以在分开的反应中缀合, 这也是本领域公知的。

[0221] 本发明的免疫缀合物包含抗体。用于生成抗体的方法是本领域公知的 (见例如 Harlow and Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。非天然发生抗体可以使用固相肽合成来构建, 可以重组生成 (例如如美国专利No. 4, 816, 567记载的), 或者可以例如通过筛选包含可变重链和可变轻链的组合文库来获得 (参见例如授予McCafferty的美国专利No. 5, 969, 108)。免疫缀合物, 抗体, 和用于生成它们的方法还详细描述于例如PCT公开文本No. WO 2011/020783, WO 2012/107417, 和 WO 2012/146628, 通过援引将其每一篇完整收入本文。

[0222] 可以在本发明的免疫缀合物中使用任何动物物种的抗体。在本发明中有用的非限制性抗体可以是鼠, 灵长类, 或人起源的。如果该免疫缀合物意图供人使用, 那么可以使用嵌合形式的抗体, 其中抗体的恒定区来自人。也可以依照本领域中公知的方法制备人源化或完全人形式的抗体 (参见例如Winter的美国专利No. 5, 565, 332)。人源化可以通过各种方法实现, 包括但不限于 (a) 将非人 (例如供体抗体) CDR嫁接到人 (例如受体抗体) 框架和恒定区上, 保留或不保留关键的框架残基 (例如那些对于保留较好的抗原结合亲和力或抗体功能重要的残基), (b) 仅将非人特异性决定区 (SDR或a-CDR; 对于抗体-抗原相互作用关键的残基) 嫁接到人框架和恒定区上, 或 (c) 移植完整的非人可变域, 但通过替换表面残基用人

样部分来“掩饰(cloak)”它们。人源化抗体及其生成方法综述于例如Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), 并且进一步记载于例如Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); 美国专利No. 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321和7,087,409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (描述了特异性决定区(SDR)嫁接); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (描述了“重修表面”); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (描述了“FR改组”); 和 Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) 和 Klimka et al., *Br. J. Cancer* 83:252-260 (2000) (描述了FR改组的“引导选择”方法)。可以用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合(best-fit)”方法选择的框架区(见例如 Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); 自轻或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列衍生的框架区(见例如 Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 和 Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); 人成熟的(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(见例如 Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); 和通过筛选FR文库衍生的框架区(见例如 Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 和 Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996))。

[0223] 可以使用本领域中已知的多种技术来生成人抗体。一般地,人抗体记载于 van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001) 和 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)。可以通过对转基因动物施用免疫原来制备人抗体,所述转基因动物已经修饰为响应抗原性攻击而生成完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有所有或部分人免疫球蛋白基因座,其替换内源免疫球蛋白基因座,或者其在染色体外存在或随机整合入动物的染色体中。在此类转基因小鼠中,一般已经将内源免疫球蛋白基因座灭活。关于自转基因动物获得人抗体的方法的综述,见 Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。还可见例如美国专利No. 6,075,181和6,150,584,其描述了 XENOMOUSE™ 技术;美国专利No. 5,770,429,其描述了 HUMAB® 技术;美国专利No. 7,041,870,其描述了 K-M MOUSE® 技术,和美国专利申请公开文本No. US 2007/0061900,其描述了 VELOCIMOUSE® 技术)。可以例如通过与不同人恒定区组合进一步修饰来自此类动物生成的完整抗体的人可变区。

[0224] 也可以通过基于杂交瘤的方法生成人抗体。已经描述了用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系(见例如 Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 和 Boerner et al., *J. Immunol.*, 147:86 (1991))。经由人B细胞杂交瘤技术生成的人抗体也记载于 Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)。其它方法包括那些例如记载于美国专利No. 7,189,826 (其描述了自杂交瘤细胞系生成单克隆人IgM抗体) 和 Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (其描述了人-人杂交瘤)的。人杂交瘤技术(Trioma技术)也记载于 Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 和 Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)。

[0225] 也可以通过自抗体文库分离来生成人抗体,如本文中描述的。

[0226] 可以通过对组合文库筛选具有期望的一种或多种活性的抗体来分离在本发明中有用的抗体。用于筛选组合文库的方法综述于例如Lerner et al., Nature Reviews 16: 498-508 (2016)。例如,用于生成噬菌体展示文库并对此类文库筛选拥有期望结合特征的抗体的多种方法是本领域中已知的。此类方法综述于例如Frenzel et al., mAbs 8:1177-1194 (2016); Bazan et al., Human Vaccines and Immunotherapeutics 8:1817-1828 (2012) 和Zhao et al., Critical Reviews in Biotechnology 36:276-289 (2016) 和Hoogenboom et al., 于Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等编, Human Press, Totowa, NJ, 2001) 和Marks and Bradbury, 于Methods in Molecular Biology 248: 161-175 (Lo编, Human Press, Totowa, NJ, 2003)。

[0227] 在某些噬菌体展示方法中,将VH和VL基因的全集分别通过聚合酶链式反应(PCR)克隆,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以对所述噬菌体文库筛选抗原结合噬菌体,如记载于Winter et al., Annual Review of Immunology 12:433-455 (1994)的。噬菌体通常以单链Fv (scFv) 片段或以Fab片段展示抗体片段。来自经免疫的来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。或者,可以(例如自人)克隆未免疫全集以在没有任何免疫接种的情况中提供针对一大批非自身和还有自身抗原的抗体的单一来源,如由Griffiths et al., EMBO Journal 12:725-734 (1993)描述的。最后,也可以通过自干细胞克隆未重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物编码高度可变的CDR3区并在体外实现重排来合成生成未免疫文库,如由Hoogenboom and Winter, Journal of Molecular Biology 227:381-388 (1992)所描述的。描述人抗体噬菌体文库的专利公开文本包括例如:美国专利No. 5,750,373; 7,985,840; 7,785,903和8,679,490和美国专利公开文本No. 2005/0079574, 2007/0117126, 2007/0237764和2007/0292936。本领域知道的用于对组合文库筛选具有一种或多种期望活性的抗体的方法的别的例子包括核糖体和mRNA展示,以及用于在细菌,哺乳动物细胞,昆虫细胞或酵母细胞上展示和选择抗体的方法。用于酵母表面展示的方法的综述见例如Scholler et al., Methods in Molecular Biology 503:135-56 (2012) 和Cherf et al., Methods in Molecular biology 1319:155-175 (2015) 以及Zhao et al., Methods in Molecular Biology 889:73-84 (2012)。用于核糖体展示的方法的记载见例如He et al., Nucleic Acids Research 25:5132-5134 (1997) 和Hanes et al., PNAS 94:4937-4942 (1997)。

[0228] 可能需要对本发明的免疫缀合物的别的化学修饰。例如,可以通过与实质性直链聚合物,诸如聚乙二醇(PEG)或聚丙烯二醇(PPG)缀合来改善免疫原性和半衰期短的问题(见例如WO 87/00056)。

[0229] 可以通过本领域已知的技术如高效液相层析术,离子交换层析术,凝胶电泳,亲和层析术,大小排阻层析术等来纯化如本文中描述制备的免疫缀合物。用于纯化特定蛋白质的实际条件将部分地取决于诸如净电荷,疏水性,亲水性等因素,并且对于本领域技术人员将是显而易见的。对于亲和层析术纯化,可以使用与免疫缀合物结合的抗体,配体,受体或抗原。例如,可以使用特异性结合突变体IL-2多肽的抗体。为了本发明的免疫缀合物的亲和层析术纯化,可以使用具有蛋白A或蛋白G的基质。例如,可以基本上如实施例描述依次使用蛋白A或G亲和层析术和大小排阻层析术分离免疫缀合物。免疫缀合物的纯度可以通过各种熟知的分析方法中的任何一种加以测定,包括凝胶电泳,高压液相层析术等。

[0230] 组合物, 配制剂和施用路径

[0231] 在一个别的方面, 本发明提供包含如本文中描述的免疫缀合物的药学组合物, 例如用于以下任一种治疗方法。在一个实施方案中, 药学组合物包含本文中提供的任一种免疫缀合物以及药学可接受载体。在另一个实施方案中, 药学组合物包含本文中提供的任一种免疫缀合物以及至少一种另外的治疗剂, 例如如下文描述的。

[0232] 还提供以适于体内施用的形式生成本发明的免疫缀合物的方法, 所述方法包括 (a) 获得依照本发明的免疫缀合物, 并 (b) 将所述免疫缀合物与至少一种药学可接受载体配制在一起, 由此配制成用于体内施用的免疫缀合物制剂。

[0233] 本发明的药学组合物包含治疗有效量的在药学可接受载体中溶解或分散的免疫缀合物。短语“药学或药理学可接受的”指在所采用的剂量和浓度一般对接受者无毒性, 即在适当时对动物如例如人施用时不产生不利, 变应性或其它不当反应的分子实体和组合物。根据本公开, 制备含有免疫缀合物以及任选地另外的活性成分的药学组合物将是本领域技术人员已知的, 如由 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990 例示的, 其通过提述并入本文。此外, 对于动物 (例如人) 施用, 会理解制剂应当满足 FDA 生物标准部门 (FDA Office of Biological Standards) 或其它国家的相应机构要求的无菌性, 热原性 (pyrogenicity), 一般安全性和纯度标准。优选的组合物是冻干配制剂或水性溶液。如本文中使用的, “药学可接受载体” 包括任何和所有的溶剂, 缓冲剂, 分散介质, 涂料材料, 表面活性剂, 抗氧化剂, 防腐剂 (例如抗细菌剂, 抗真菌剂), 等张剂, 吸收延缓剂, 盐, 防腐剂, 抗氧化剂, 蛋白质, 药物, 药物稳定剂, 聚合物, 凝胶, 粘合剂, 赋形剂, 崩解剂 (disintegration agent), 润滑剂, 甜味剂, 芳香剂, 染料, 此类类似的材料及其组合, 如本领域普通技术人员将已知的 (参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, 通过提述并入本文)。除非任何常规载体与活性成分不相容, 涵盖其用于治疗或药学组合物中的使用。

[0234] 可以通过任何合适的手段来施用本发明的免疫缀合物 (和任何另外的治疗剂), 包括胃肠外, 肺内, 和鼻内, 和若期望用于局部治疗的话, 损伤内施用。胃肠外输注包括肌肉内, 静脉内, 动脉内, 腹膜内, 或皮下施用。部分根据施用是短暂的还是长期的, 剂量给药可以是任何合适的途径, 例如通过注射, 诸如静脉内或皮下注射。

[0235] 胃肠外组合物包括那些设计用于通过注射施用, 例如皮下, 皮内, 损伤内, 静脉内, 动脉内, 肌内, 鞘内或腹膜内注射施用的组合物。对于注射, 可以将本发明的免疫缀合物在水性溶液, 优选地在生理学相容的缓冲液中配制, 所述生理学相容的缓冲液如汉克 (Hanks) 氏溶液, 林格 (Ringer) 氏溶液或生理学盐水缓冲液。溶液可以含有配制剂如悬浮剂, 稳定剂和/或分散剂。或者, 免疫缀合物可以为粉末形式, 用于在使用前用合适的媒介物例如无菌无热原水构成。根据需要, 通过将本发明的免疫缀合物以需要的量掺入到具有下文列举的各种其它成分的合适溶剂中来制备无菌可注射溶液。可以容易地实现无菌, 例如通过过滤流过无菌过滤膜进行。一般地, 通过将各种无菌活性成分掺入到无菌媒介物中来制备分散剂, 所述无菌媒介物含有基础分散介质和/或其它成分。在制备无菌可注射溶液, 悬液或乳剂的无菌粉末的情况下, 优选的制备方法是真空干燥或冷冻干燥技术, 其将活性成分以及任何另外的期望成分的粉末从其先前无菌过滤的液体介质产生。液体介质在必要时应当是适当缓冲的, 并且在用充足的盐水或葡萄糖注射前首先使液体稀释液等张。组合物在制备

和贮存条件下必须是稳定的,并且针对微生物如细菌和真菌的污染作用提供保护。会领会的是,应当将内毒素污染最少保持于安全水平,例如低于0.5ng/mg蛋白质。合适的药学可接受载体包括但不限于:缓冲剂如磷酸盐,柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵(hexamethonium chloride);苯扎氯铵;苄索氯铵;酚,丁醇或苯甲醇;烷基对羟基苯甲酸酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(低于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清清蛋白,明胶,或免疫球蛋白;亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,组氨酸,精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖,和其它碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖,甘露醇,海藻糖或山梨糖醇;形成盐的反荷离子如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子型表面活性剂如聚乙二醇(PEG)。水性注射悬液可以含有提高悬液粘度的化合物,如羧甲基纤维素钠,山梨糖醇,葡聚糖等。任选地,悬液还可以含有合适的稳定剂或增加化合物溶解度以允许制备高度浓缩的溶液的试剂。另外,可以将活性化合物的悬液制备为合适的油性注射悬液。合适的亲脂溶剂或媒介物包括脂肪油如芝麻油或合成的脂肪酸酯,如油酸乙酯或甘油三酯或脂质体。

[0236] 可以将活性成分在例如分别通过凝聚技术或通过界面聚合作用制备的微囊剂,例如羟甲基纤维素或明胶微囊剂和聚-(甲基丙烯酸酯)微囊剂中,在胶体药物投递系统(例如脂质体,清蛋白微球,微乳剂,纳米颗粒和纳米胶囊)或在粗乳液(macroemulsion)中包载。此类技术披露于Remington's Pharmaceutical Sciences(18th Ed. Mack Printing Company, 1990)。可以制备持续释放的制剂。合适的持续释放制剂的例子包括含多肽的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质为成形制品例如膜或微囊剂的形式。在具体的实施方案中,可以通过在组合物中使用吸收延迟剂如例如单硬脂酸铝,明胶或其组合,来产生可注射组合物的延长吸收。

[0237] 在先前描述的组合物外,免疫缀合物还可以配制为贮存(depot)制剂。可以通过植入(例如皮下或肌内)或通过肌内注射来施用此类长效配制剂。如此,例如所述免疫缀合物可以用合适的聚合或疏水性材料(例如作为可接受油中的乳剂)或离子交换树脂配制,或配制为微溶性衍生物,例如微溶性盐。

[0238] 可以通过常规的混合,溶解,乳化,包囊,包载或冻干过程来制备包含本发明的免疫缀合物的药学组合物。可以以常规方式配制药学组合物,其使用一种或多种有助于将蛋白质加工成可药学使用的制剂的生理学可接受载体,稀释剂,赋形剂或辅助剂。合适的配制剂依赖于选择的施用路径。

[0239] 可以将免疫缀合物以游离酸或碱,中性或盐形式配制成组合物。药学可接受盐是基本保留游离酸或碱的生物学活性的盐。这些包括酸加成盐(acid addition salt),例如与蛋白质性组合物的游离氨基基团形成的那些,或与无机酸(例如如氢氯酸或磷酸)或与有机酸如乙酸,草酸,酒石酸或扁桃酸形成的。与游离羧基基团形成的盐还可以自无机碱如例如氢氧化钠,钾,铵,钙或铁;或有机碱如异丙胺,三甲胺,组氨酸或普鲁卡因(procaine)衍生。药用盐倾向于比相应的游离碱形式更可溶于水性溶剂和其它质子溶剂中。

[0240] 治疗方法和组合物

[0241] 可以将本文中提供的任一种免疫缀合物用在治疗方法中。本发明的免疫缀合物可

用作免疫治疗剂,例如在癌症的治疗中。

[0242] 对于在治疗方法中的使用,将以与优良医学实践一致的方式配制,给药和施用本发明的免疫缀合物。在此背景中考虑的因素包括治疗的特定病症,治疗的特定哺乳动物,个体患者的临床状况,病症的起因,药剂的投递部位,施用方法,施用时间安排以及医学从业人员已知的其它因素。

[0243] 本发明的免疫缀合物在治疗刺激宿主的免疫系统是有益的疾病状态中可能是特别有用的,特别是想要增强细胞免疫应答的状况。这些可包括宿主免疫应答不足或缺陷的疾病状态。可施用本发明的免疫缀合物的疾病状态包括例如细胞免疫应答对于特异性免疫力会是至关重要的机制的肿瘤或感染。可以施用本发明的免疫缀合物本身或在任何合适的药学组合物中的免疫缀合物。

[0244] 在一个方面,提供用作药物的本发明的免疫缀合物。在别的方面,提供用于治疗疾病的本发明的免疫缀合物。在某些实施方案中,提供用于治疗方法的本发明的免疫缀合物。在一个实施方案中,本发明提供如本文中描述的免疫缀合物,用于治疗有此需要的个体中的疾病。在某些实施方案中,本发明提供免疫缀合物,用于治疗患有疾病的个体的方法,所述方法包括对所述个体施用治疗有效量的免疫缀合物。在某些实施方案中,待治疗的疾病是增殖性病症。在一个具体的实施方案中,所述疾病是癌症。在某些实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用治疗有效量的至少一种另外的治疗剂,例如抗癌剂(如果待治疗的疾病是癌症的话)。在别的实施方案中,本发明提供如本文中描述的免疫缀合物,用于刺激免疫系统。在某些实施方案中,本发明提供免疫缀合物,用于在个体中刺激免疫系统的方法,该方法包括对该个体施用有效量的免疫缀合物以刺激免疫系统。依照上文任何实施方案的“个体”是哺乳动物,优选是人。依照任何上述实施方案的“刺激免疫系统”可包括免疫功能整体升高,T细胞功能升高,B细胞功能升高,淋巴细胞功能恢复,IL-2受体表达升高,T细胞响应性升高,天然杀伤细胞活性或淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞活性升高,等等中任一项或多项。

[0245] 在一个别的方面,本发明提供本发明的免疫缀合物在制造或制备药物中的用途。在一个实施方案中,所述药物用于治疗有此需要的个体中的疾病。在一个实施方案中,所述药物用于治疗疾病的方法,该方法包括对患疾病的个体施用治疗有效量的药物。在某些实施方案中,待治疗的疾病是增殖性病症。在一个具体的实施方案中,所述疾病是癌症。在一个实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用治疗有效量的至少一种另外的治疗剂,例如抗癌剂(如果待治疗的疾病是癌症的话)。在一个别的实施方案中,所述药物用于刺激免疫系统。在别的实施方案中,所述药物用于在个体中刺激免疫系统的方法,所述方法包括对该个体施用有效量的药物以刺激免疫系统。依照上文任何实施方案的“个体”可以是哺乳动物,优选是人。依照任何上述实施方案的“刺激免疫系统”可包括免疫功能整体升高,T细胞功能升高,B细胞功能升高,淋巴细胞功能恢复,IL-2受体表达升高,T细胞响应性升高,天然杀伤细胞活性或淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞活性升高,等等中任一项或多项。

[0246] 在一个别的方面,本发明提供用于治疗个体中的疾病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括对患有此类疾病的个体施用治疗有效量的本发明的免疫缀合物。在一个实施方案中,对所述个体施用组合物,其包含药学可接受的形式本发明的免疫缀合物。在某些实施方案中,待治疗的疾病是增殖性病症。在一个具体的实施方案中,所述疾病是癌症。在

某些实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用治疗有效量的至少一种另外的治疗剂,例如抗癌剂(如果待治疗的疾病是癌症的话)。在又一个方面,本发明提供一种用于刺激个体中的免疫系统的方法,所述方法包括对该个体施用有效量免疫缀合物以刺激免疫系统。依照任何上述实施方案的“个体”可以是哺乳动物,优选人。依照任何上述实施方案的“刺激免疫系统”可包括免疫功能整体升高,T细胞功能升高,B细胞功能升高,淋巴细胞功能恢复,IL-2受体表达升高,T细胞响应性升高,天然杀伤细胞活性或淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞活性升高,等等中任一项或多项。

[0247] 在某些实施方案中,所述待治疗的疾病是增殖性病症,特别是癌症。癌症的非限制性例子包括膀胱癌,脑癌,头和颈癌,胰腺癌,肺癌,乳腺癌,卵巢癌,子宫癌,宫颈癌,子宫内膜癌,食道癌,结肠癌,结肠直肠癌,直肠癌,胃癌,前列腺癌,血液癌,皮肤癌,鳞状细胞癌,骨癌和肾癌。其它可使用本发明的免疫缀合物治疗的细胞增殖病症包括但不限于位于下列各项中的新生物:腹部,骨,乳房,消化系统,肝,胰,腹膜,内分泌腺(肾上腺,副甲状腺,垂体,睾丸,卵巢,胸腺,甲状腺),眼,头和颈,神经系统(中枢和外周),淋巴系统,骨盆,皮肤,软组织,脾,胸区,和泌尿生殖系统。还包括癌症前期状况或损伤以及癌症转移。在某些实施方案中,所述癌症选自肾癌,皮肤癌,肺癌,结肠直肠癌,乳腺癌,脑癌,头和颈癌,前列腺癌和膀胱癌组成的组。熟练技术人员容易地认可在许多情况下,免疫缀合物可能不提供治愈而仅可以提供部分益处。在一些实施方案中,具有一些益处的生理学变化也被视为治疗有益的。如此,在一些实施方案中,提供生理学变化的免疫缀合物的量被视为“有效量”或“治疗有效量”。需要治疗的受试者,患者或个体通常为哺乳动物,更特定地为人。

[0248] 在一些实施方案中,对细胞施用有效量的本发明的免疫缀合物。在其它实施方案中,对个体施用治疗有效量的本发明的免疫缀合物以治疗疾病。

[0249] 为了预防或治疗疾病,本发明的免疫缀合物的合适剂量(当单独或与一种或多种其它另外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗的疾病的类型,施用路径,患者的体重,分子的类型(例如是否包含Fc域),疾病的严重程度和进程,施用免疫缀合物是为了预防还是治疗目的,先前或同时的治疗干预,患者的临床史和对免疫缀合物的响应,以及主治医师的判断。负责施用的从业人员将在任何事件中确定组合物中活性成分的浓度和用于个体受试者的合适剂量。本文中涵盖各种给药方案,包括但不限于在各个时间点的单次或多次施用,推注施用,和脉冲输注。

[0250] 所述免疫缀合物适宜地在一次或一系列治疗里对患者施用。根据疾病的类型和严重程度,约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $15\text{mg}/\text{kg}$ (例如 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ - $10\text{mg}/\text{kg}$ )的免疫缀合物可以是用于对患者施用的起始候选剂量,不管是例如通过一次或多次分开的施用,还是通过连续输注进行。根据上文提及的因素,一种典型的每日剂量的范围可以从约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多。对于在数天或更长时间里的重复施用,根据状况,治疗一般将持续直至发生对疾病症状的期望的抑制。免疫缀合物的一种例示性剂量将在约 $0.005\text{mg}/\text{kg}$ 至约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的范围内。在其它非限制性例子中,剂量还可包括每次施用从约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,约 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,约 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,约 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,约 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,约 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,约 $350\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,约 $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重,约 $5\text{mg}/\text{kg}$ 体重,约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重,约 $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重,约 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重,约 $200\text{mg}/\text{kg}$ 体重,约 $350\text{mg}/\text{kg}$ 体重,约 $500\text{mg}/\text{kg}$ 体重,至约 $1000\text{mg}/\text{kg}$ 体重或更多,以及其中可导出的任何范围。在从本文列出的数量可导出的范围的非限制性



例子中,基于上文描述的数目,可以施用约5mg/kg体重至约100mg/kg体重的范围,约5微克/kg体重至约500毫克/kg体重的范围等。如此,可以对患者施用一剂或多剂的约0.5mg/kg, 2.0mg/kg, 5.0mg/kg或10mg/kg (或其任意组合)。可以间歇地施用此类剂量,例如每周或每3周(例如使得患者接受约2至约20,或例如约6剂的免疫缀合物)。可以施用起始较高的加载剂量,继之以一剂或多剂较低剂量。然而,可以使用其它剂量方案。通过常规技术和测定法容易监测该疗法的进行。

[0251] 本发明的免疫缀合物一般将以对于实现意图的目的有效的量使用。对于治疗或预防疾病状况的用途,以治疗有效量施用或应用本发明的免疫缀合物,或其药学组合物。治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力以内,尤其根据本文中提供的详细公开内容。

[0252] 对于系统性施用,能从体外测定法如细胞培养测定法初步估算出治疗有效剂量。然后可以在动物模型中配制剂量以达到包含如在细胞培养中测定的 $IC_{50}$ 的循环浓度范围。可以将此类信息用于更准确地确定人中的可用剂量。

[0253] 使用本领域中公知的技术,还能从体内数据例如动物模型估算出初始剂量。本领域中的普通技术人员能容易地基于动物数据优化对人的施用。

[0254] 可以分别调整剂量量和时间间隔以提供足以维持治疗效果的免疫缀合物的血浆水平。通过注射施用的可用患者剂量的范围为从约0.1至50mg/kg/天,通常约0.5至1mg/kg/天。可以通过每日施用多剂实现治疗有效的血浆水平。可以例如通过HPLC测量血浆中的水平。

[0255] 在局部施用或选择性摄取的情况中,免疫缀合物的有效局部浓度可能与血浆浓度无关。本领域技术人员会能够在无需过度实验的情况下优化治疗有效的局部剂量。

[0256] 本文中描述的免疫缀合物的治疗有效剂量一般将提供治疗益处,而不导致实质性毒性。可以通过在细胞培养物或实验动物中的标准药理学规程来测定免疫缀合物的毒性和治疗功效。可以使用细胞培养测定法和动物研究来测定 $LD_{50}$  (对50%的群体致命的剂量)和 $ED_{50}$  (在50%的群体中治疗有效的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比率为治疗指数,其可以表述为 $LD_{50}/ED_{50}$ 比。优选展现出较大治疗指数的免疫缀合物。在一个实施方案中,依照本发明的免疫缀合物展现出高治疗指数。可以将从细胞培养测定法和动物研究获得的数据用来制定适用于人的剂量范围。优选地,剂量处于具有很小或无毒性的循环浓度(包含 $ED_{50}$ )的范围内。剂量在此范围内可以随多种因素,例如采用的剂量形式,利用的施用路径,受试者的状况等而变化。鉴于患者的状况,各个内科医生可以选择确切的配制剂,施用路径和剂量(参见例如Fingl等,1975,于:The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch.1, p.1, 通过提述完整并入本文)。

[0257] 用本发明的免疫缀合物治疗的患者的主治内科医生将知晓如何及何时终止,中断或调整施用(由于毒性,器官功能障碍等)。相反,如果临床应答不适当(排除毒性),主治内科医生还将知晓如何将治疗调整至更高水平。在感兴趣的病症的管理中的施用剂量的量级将随待治疗的状况的严重程度,施用路径等而变化。可以例如部分地通过标准的预后评估方法来评估状况的严重程度。另外,剂量以及可能的给药频率也将随个体患者的年龄,体重和应答而变化。

[0258] 可以自包含野生型IL-2的免疫缀合物使用的最大治疗剂量提高如本文中描述的包含突变体IL-2多肽的免疫缀合物的最大治疗剂量。

### [0259] 其它药剂和治疗

[0260] 依照本发明的免疫缀合物可以与一种或多种其它药剂在疗法中组合施用。例如，本发明的免疫缀合物可以与至少一种另外的治疗剂共施用。术语“治疗剂”涵盖施用以治疗需要此类治疗的个体中的症状或疾病的任何药剂。此类另外的治疗剂可以包含任何适用于所治疗的特定适应征的活性成分，优选地具有不会彼此不利影响的互补活性的那些活性成分。在某些实施方案中，另外的治疗剂是免疫调控剂，细胞抑制剂，细胞粘着的抑制剂，细胞毒剂，细胞凋亡的激活剂，或提高细胞对凋亡诱导剂的敏感性的药剂。在一个具体的实施方案中，另外的治疗剂是抗癌剂，例如微管破坏物，抗代谢物，拓扑异构酶抑制剂，DNA嵌入剂，烷化剂，激素疗法，激酶抑制剂，受体拮抗剂，肿瘤细胞凋亡的激活剂，或抗血管生成剂。

[0261] 此类其它药剂以对意图目的有效的量适宜地组合存在。此类其它药剂的有效量取决于使用的免疫缀合物的量，病症或治疗的类型以及上文所述其它因素。所述免疫缀合物一般以与本文中描述的相同的剂量和施用路径，或以本文中描述的剂量的约1至99%，或通过凭经验/临床上确定为合适的任何剂量和任何路径使用。

[0262] 上文记载的此类组合疗法涵盖组合施用（其中在同一组合物或分开的组合物中包含两种或更多种治疗剂）和分开施用，在该情况中，本发明的免疫缀合物的施用可以在施用另外的治疗剂和/或辅助剂之前，同时和/或之后发生。本发明的免疫缀合物还可以与放射疗法组合使用。

### [0263] 制品

[0264] 在本发明的另一个方面，提供含有可用于治疗，预防和/或诊断上文描述的病症的材料的制品。所述制品包含容器和容器上或与容器联合的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶，管形瓶，注射器，IV溶液袋等。所述容器可从多种材料如玻璃或塑料形成。所述容器容纳组合物，其自身或与另一组合物组合对于治疗，预防和/或诊断状况是有效的，并且可以具有无菌的存取口（例如，容器可以是具有由皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或管形瓶）。组合物中至少一种活性成分是本发明的免疫缀合物。标签或包装插页指示该组合物用于治疗选择的状况。此外，所述制品可以包含（a）其中含有组合物的第一容器，其中所述组合物包含本发明的免疫缀合物；和（b）其中含有组合物的第二容器，其中所述组合物包含另外的细胞毒性或其它方面治疗剂。本发明的这一实施方案中的制品还可以包含包装插页，其指示该组合物可用于治疗特定状况。或者/另外，所述制品还可以包含第二（或第三）容器，其包含药学可接受缓冲液，如抑菌性注射用水（BWF1），磷酸盐缓冲盐水，林格（Ringer）氏溶液和右旋糖溶液。它可以进一步包含从商业和用户观点看期望的其它材料，包括其它缓冲液，稀释剂，滤器，针，和注射器。

### [0265] 附图简述

[0266] 图1：包含突变体IL-2多肽的IgG-IL-2免疫缀合物格式的示意图。

[0267] 图2：PD1-IL2v对PHA激活的PBMC内的CD4 T细胞（A）和CD8 T细胞（B）的结合，与PD1 IgG和CEA-IL2v比较。

[0268] 图3：PD1-IL2v，CEA-IL2v，和PD1 IgG加CEA-IL2v的组合对PBMC内的NK细胞（A），CD8 T细胞（B）和CD4 T细胞（C）的增殖。包括PD1 IgG作为对照。

[0269] 图4：PD1-IL2v，CEA-IL2v，和PD1 IgG加CEA-IL2v的组合对PBMC内的NK细胞（A），CD8 T细胞（B）和CD4 T细胞（C）的激活。包括PD1 IgG作为对照。使用NK细胞，CD4 T细胞和

CD8 T细胞上的CD25表达作为激活的标志物。

[0270] 图5:PD1-IL2v,CEA-IL2v,和PD1 IgG加CEA-IL2v的组合对PBMC内的PHA预激活的CD8 T细胞(A)和CD4 T细胞(B)的增殖。包括PD1 IgG作为对照。

[0271] 图6:PD1-IL2v,CEA-IL2v,和PD1 IgG加CEA-IL2v的组合对PBMC内的PHA预刺激的CD8 T细胞(A)和CD4 T细胞(B)的激活。包括PD1 IgG作为对照。使用CD4 T细胞和CD8 T细胞上的CD25表达作为激活的标志物。

[0272] 图7:由PD-L1-IL2v(与CEA-IL2v比较)(A)或PD-L1-IL2v(与PD1-IL2v比较)(B)诱导的人NK细胞系NK92的增殖,在2天后测量。

[0273] 图8:PD-L1-muIL2v和PD-L1 muIgG1对PD-L1阳性小鼠T细胞系CTLL2的结合。

[0274] 图9:由PD1-muIL2v(与CEA-muIL2v比较)(A)或PD1-muIL2v(与PD-L1-muIL2v比较)(B)诱导的鼠PD-L1阳性T细胞系CTLL2的增殖,在3天后测定。

[0275] 图10:用PD1-IL2v,PD-L1-IL2v或PD1和PD-L1抗体作为单一药剂的功效实验的结果。将Panc02-H7-Fluc转染子胰腺癌细胞系注射入Black 6小鼠的胰腺以研究胰腺同位同系模型中的存活。

[0276] 图11:用PD1-IL2v,PD-L1-IL2v或PD1和PD-L1抗体作为单一药剂的功效实验的结果。将Panc02-H7-Fluc转染子胰腺癌细胞系注射入Black 6小鼠中的胰腺以借助生物发光研究胰腺同位同系模型中的存活。

[0277] 图12:在单独的抗PD-1或抗PD-L1,与IL-2v组合,或作为融合蛋白存在下用CMV免疫原性蛋白pp65回忆48小时后CD4 T细胞分泌IL-2(A),IL-2和IFN- $\gamma$ (B)或IFN- $\gamma$ (C)的能力。

[0278] 图13:在单独的抗PD-1或抗PD-L1,与IL-2v组合,或作为融合蛋白存在下用CMV免疫原性蛋白pp65回忆48小时后分泌仅IL-2(A),IL-2和IFN- $\gamma$ 二者(B),或仅IFN- $\gamma$ (C和D)的病毒特异性CD4 T细胞的分化状态。

[0279] 图14:PD1和PD1-IL2v对激活的常规和调节性T细胞的竞争性结合测定法。在 $T_{conv}$ 较之 $T_{reg}$ 上结合的频率(A)和对 $T_{conv}$ 和 $T_{reg}$ 的结合(B)的变化。

[0280] 图15: $T_{conv}$ 的 $T_{reg}$ 遏制的PD1-IL2v逆转。共培养5天后由 $T_{conv}$ 分泌的粒酶B(A)和干扰素- $\gamma$ (B)受到 $T_{reg}$ 遏制的百分比。

[0281] 图16:作为单一药剂和组合比较muPD1-IL2v与muFAP-IL2v和muPD-1抗体的功效实验的结果。

[0282] 图17:比较muPD1-IL2v与FAP-IL2v,muPD1和它们的组合的功效实验的结果。

[0283] 图18A和18B:针对抗小鼠CD3染色的胰腺肿瘤的免疫组织化学图像(图18A)和T细胞量化分析(图18B)。

[0284] 图19:针对抗小鼠PD1染色的胰腺肿瘤的免疫组织化学图像。

[0285] 图20:针对抗小鼠ICOS染色的胰腺肿瘤的免疫组织化学图像。

[0286] 图21:作为单一药剂和组合比较muPD1-IL2v与FAP-IL2v和muPD1的功效实验的结果。

[0287] 图22:用两种不同剂量比较muPD1-IL2v与FAP-IL2v,muPD1和它们的组合的功效实验的结果。

[0288] 图23:针对抗小鼠CD3染色的胰腺肿瘤的免疫组织化学图像。

[0289] 图24A和24B:针对抗小鼠CD8染色的胰腺肿瘤的免疫组织化学图像(图24A)和T细胞量化分析(图24B)。

[0290] 图25A和25B:针对抗粒酶B染色的胰腺肿瘤的免疫组织化学图像(图25A)和粒酶B标志物面积量化分析(图25B)。

[0291] 图26A和26B:针对抗小鼠PD1染色的胰腺肿瘤的免疫组织化学图像(图26A)和PD1阳性细胞量化分析(图26B)。

[0292] 图27:在单独的抗PD-1,与IL-2v组合,或作为融合蛋白存在下用CMV免疫原性蛋白pp65回忆48小时后CD4 T细胞分泌IL-2(A),IL-2和IFN- $\gamma$ (B)或IFN- $\gamma$ (C)和增殖(D)的能力。

[0293] 图28:在单独的抗PD-1,与IL-2v组合,或作为融合蛋白存在下用CMV免疫原性蛋白pp65回忆48小时后分泌IFN- $\gamma$ 的病毒特异性CD4 T细胞的分化状态(遵照CD45RO和CD62L的表达)。

[0294] 图29:第一供体的静息的PBMC的STAT5测定法(CD8 T细胞(A),NK细胞(B),CD4 T细胞(C)和调节性T细胞(D))。

[0295] 图30:第二供体的静息的PBMC的STAT5测定法(CD4 T细胞(A),CD8 T细胞(B),调节性T细胞(C)和NK细胞(D))。

[0296] 图31:第三供体的静息的PBMC的STAT5测定法(CD8 T细胞(A),NK细胞(B),CD4 T细胞(C)和调节性T细胞(D))。

[0297] 图32:第四供体的静息的PBMC的STAT5测定法(CD8 T细胞(A),NK细胞(B),CD4 T细胞(C)和调节性T细胞(D))。

[0298] 氨基酸序列

[0299]

	氨基酸序列	SEQ ID NO
PD-1最低限度 HVR-H1	SSYT	1
PD-1最低限度 HVR-H2	SGGGRDIY	2
PD-1最低限度 HVR-H3	GRVYF	3
PD-1最低限度 HVR-L1	TSDNSF	4
PD-1最低限度 HVR-L2	RSSTLES	5
PD-1最低限度 HVR-L3	NYDVPW	6
FR-H3的片段 (RDN在Kabat 位置71-73处)	RDN	7
PD-1 HVR-H1	GFSFSSY	8
PD-1 HVR-H2	GGR	9
PD-1 HVR-H3	TGRVYFALD	10
PD-1 HVR-L1	SESVDTSDNSF	11
PD-1 HVR-L2	RSS	12
PD-1 HVR-L3	NYDVPW	13
PD-1 VH (1, 2, 3, 4)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTM <sub>SWVRQAPGKGLEWV</sub> ATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN <sub>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC</sub> VLLTGRVYFALDSWGQGT <sub>LVTVSS</sub>	14
PD-1 VL (1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPK LLIYRSSTLES <sub>GV</sub> PDRFSGSGGTDFLT <sub>TISS</sub> LQAEDVA <sub>VYYC</sub> QQNYDVP WTFGQGTKVEIK	15
PD-1 VL (2)	DVVMTQSPLSLPVT <sub>LG</sub> QPASISCRASESVDTSDNSFIHWYQQRPGQSPR LLIYRSSTLES <sub>GV</sub> PDRFSGSGGTDFL <sub>KISR</sub> VEAEDV <sub>GVYYC</sub> QQNYDV PWTFGQGTKVEIK	16

[0300]

PD-1 VL (3)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPRL LIYRSSTLESIGIPARFSGSGGTDFLTLSISLEPEDFAVYYCQQNYDVPW TFGQGTKVEIK	17
PD-1 VL (4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPRL LIYRSSTLESIGIPARFSGSGGTDFLTLSISLEPEDFAVYYCQQNYDVPW TFGQGTKVEIK	18
人IL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFKYMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKG SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	19
人IL-2 (T3A, F42A, Y45Y, L72G, C125A)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKG SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	20
接头	GGGGSGGGSGGGGS	21
PD-1 IL2v – HC有IL2v (Fc 节, LALAPG)	evqllesggglvqpggsrlscaasgfsfssytmswvrqapgkglewvatisgggrdiyyppsvkgrftisrd nskntlylqmnsraedtavyyvlltgrvfyaldswgqgtlvtvssastkgpsvflapsskstsggtaalgl vkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssgylsylvvtpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepk scdkthtcppcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpvtcvvvdvshedpevkfwnvyvdgvevhnak tkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalgapiektiskakgqprepqvvtlpprdeltkn qvslwclvkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflvskltdksrwqqgnvfscsvmheal hnhytqkslspspgggsgggsggggsapassstkkqlqlehlldlqmilnginnyknpkltrmltakfa mpkkatelkhlqcleelkpleevlngaqsknfhlrprdlisinvivlelkgsettfmceyadetativeflnr witfaqsiistlt	22
PD-1 IL2v – HC无IL2v (Fc 穴, LALAPG)	evqllesggglvqpggsrlscaasgfsfssytmswvrqapgkglewvatisgggrdiyyppsvkgrftisrd nskntlylqmnsraedtavyyvlltgrvfyaldswgqgtlvtvssastkgpsvflapsskstsggtaalgl vkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssgylsylvvtpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepk scdkthtcppcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpvtcvvvdvshedpevkfwnvyvdgvevhnak tkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalgapiektiskakgqprepqvvtlpprdeltkn qvslscavkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflvskltdksrwqqgnvfscsvmheal hnhytqkslsps	23
PD-1 IL2v – HC无IL2v (Fc 穴, LALAPG, HYRF)	evqllesggglvqpggsrlscaasgfsfssytmswvrqapgkglewvatisgggrdiyyppsvkgrftisrd nskntlylqmnsraedtavyyvlltgrvfyaldswgqgtlvtvssastkgpsvflapsskstsggtaalgl vkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssgylsylvvtpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepk scdkthtcppcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpvtcvvvdvshedpevkfwnvyvdgvevhnak tkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalgapiektiskakgqprepqvvtlpprdeltkn qvslscavkgfypsdiavewesngqpennyktpvldsdgsfflvskltdksrwqqgnvfscsvmheal hnrftqkslsps	24
PD-1 IL2v – LC	divmtqspdslavslgeratinckasesvdtstdnsfihwyqqkpgqspklliyrsstlesgvpdrfsgsgsgtdf tltslqaedvavyycqnydvpwtfqggtkveikrtvaapsvflfppsdeqlksgtasvcllnnfyreak vqwkvdnalqsgnsqesvteqdsdstyssltskadyekhkvyacevthqglsspvtksfngec	25
hIL-2信号肽	MYRMQLLSICIALSLALVTNS	26
hPD-1 (无信号序列)	PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVEGDNATFTCSFSNTSEFVLNWR MSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRTVQLPNGRDFHMSVVRARRN DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRAGQF QTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICRAARGTIGARRTGQPLKEDPS AVPVFSDY GELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPA RRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL	27
hPD-1 (有信号序列)	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVEG DNATFTCSFSNTSEFVLNWRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRF RVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELR VTERRAEVPTAHPSPSPRAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSDY GELDFQWREKTPEPPV CVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL	28
人IL-2 (C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFKYMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKG SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	29

[0301]

人IgG1 Fc域	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	30
人卡帕CL域	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	31
人拉姆达CL域	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS	32
人IgG1重链恒定区(CH1-CH2-CH3)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	33
鼠替代物PD-1 IL2v – HC有 IL2v	evqlqesgpglvkpsqslstcsvtgysitssyrwnwirkfpgnrlewmgyinsagisnynpslkrisitrds knqfflqvnsvttedaatyycarsdnmgttptywggqtlvtvssaktppsvyplapgsaaqtnsmvtlgclv kgyfpepvtvtwnsgslsghvhtfpavqlsdlytsssvtvpstwpstvtcnvahpasstkvdkkivprdc gckpcictvpevssvfifppkpkdvlitltltpkvctvvaaiskddpevqfswfvdddevhtaqtkpreeqinst frsvselpimhqdwlngkefkcrvnsaafgapiektisktkgrpkapqvvtippkqmakdkvsltemitn ffpeditvewqwnqpaenyntqpimtdtdgsyfvysdlnvqksnweagntftcsvlheglhnhhteks ls hspggggsgggsggggsapassstssstaeaqqqqqqqqqhqlmldlqellsrmenymklpr mltakfalpkqatelkdlqcledeglprhvltdgtqsksfqledaenfisnirvtvklkgsdntfecqfddesat vvdflrrwifaqsiistspq	34
鼠替代物PD-1 IL2v – HC无 IL2v	evqlqesgpglvkpsqslstcsvtgysitssyrwnwirkfpgnrlewmgyinsagisnynpslkrisitrds knqfflqvnsvttedaatyycarsdnmgttptywggqtlvtvssaktppsvyplapgsaaqtnsmvtlgclv kgyfpepvtvtwnsgslsghvhtfpavqlsdlytsssvtvpstwpstvtcnvahpasstkvdkkivprdc gckpcictvpevssvfifppkpkdvlitltltpkvctvvaaiskddpevqfswfvdddevhtaqtkpreeqinst frsvselpimhqdwlngkefkcrvnsaafgapiektisktkgrpkapqvvtippkqmakdkvsltemit nffpeditvewqwnqpaenyntqpimkttdgsyfvysklvqksnweagntftcsvlheglhnhhteks lshsp	35
鼠替代物PD-1 IL2v – LC	divmtqgtlpnvpvsgesvsitcrssksllsydgktylnwylqrpqspqlliywmstrasgvsdrfsgsgsgt dftlkisgveaedvgiycqqlgfptfgggtklelkrtdaaptvsi fppsseqltsggasvvcflnnfypkdinv kwkidgserqngvlnswtdqdskdstysmsstltltdkdeyerhnsytceathktstspivksfmrnc	36
PD-L1 IL2v – HC有 IL2v (Fc 节, LALAPG)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGSAPASSSTKKTQLQLEHL LLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFAQSIISTLT	37
PD-L1 IL2v – HC无 IL2v (Fc 穴, LALAPG)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	38

[0302]

PD-L1 IL2v – LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASFLYSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	39
鼠替代物 PD-L1 IL2v – HC有IL2v	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEW VAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CARRHWPGGFDYWGQGLTVTSAAKTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVT LGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPS TWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIPPK PKDVLITITLTPKVTCTVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPRE E QFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRP KAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENY DNTQPIMDTDGSYFVYSDLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLNHHTE KSLSHSPGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQ QHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRLTAKFALPKQATELKDLC LEDELGPLRHVLDGTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTEFCQ FDESATVVDFLRRWIAFAQSIISTSPQ	40
鼠替代物 PD-L1 IL2v – HC无IL2v	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEW VAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CARRHWPGGFDYWGQGLTVTSAAKTPPSVYPLAPGSAQAQTNMVT LGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPS TWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIPPK PKDVLITITLTPKVTCTVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPRE E QFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRP KAPQVYTIPPPKQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENY KNTQPIMKTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLNHHTE KSLSHSP	41
鼠替代物 PD-L1 IL2v – LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASFLYSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFG QGTKVEIKRADAAPTIVSIFPPSDEQLTSGGASVVCFLNFPKIDINVKW KIDGSRQNGVLNSWTDQSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEA THKTSTSPIVKSFNRECE	42
hPD-1胞外域 (ECD)	PGWFLDSPDRPWNPTFSPALLVVTGDNATFTCSFSNTSESVLNWYR MSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCFRVTVQLPNGRDFHMSVVRARRN DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAQGF QTLV	43
muCEA HC-Fc (DD)-muIL2v	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLE WMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSAKTPPSVYPLAPGSAQAQ TNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS VTVPSSTWPSQVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSS VFIPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTA Q TKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISK TKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQ PAENYDNTQPIMDTDGSYFVYSDLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLH NHHTEKSLSHSPGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTSSSTAEAQQQQQQ QQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLPRLTAKFALPKQATEL KDLQCLEDELGPLRHVLDGTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDN TFECQFDESATVVDFLRRWIAFAQSIISTSPQ	44
muCEA HC-Fc (KK)-muIL2v	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLE WMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSAKTPPSVYPLAPGSAQAQ TNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS VTVPSSTWPSQVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSS VFIPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTA Q TKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISK TKGRPKAPQVYTIPPPKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQ PAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLH NHHTEKSLSHSPGK	45



muCEA LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASA AVGTYVAWYQQKPKGAPKLLI YSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFT FGQGTKLEIKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVK WKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCE ATHKTSTSPIVKSFNRECE	46
muFAP HC-Fc (DD)-muIL2v	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGWFGGFNYWGQGLTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLG CLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTW PSQTVTCNVAHPASSTKVDK KIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPK DVLITITLTPKVT CVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT KPREEQIN STFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA AFGAPIEK TISKTKGRPKAP QVYTIPPKKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNT QPIMDTDGSYFVYSDLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLS HSPGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTSSSTAE AQQQQQQQQQQHL EQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLMTAKFALPKQATELKD LQCLED ELGPLRHVLDGTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVVKLKGSDNTFECQFDD ESATVVDLRRWIAFAQSIISTSPQ	47
muFAP HC-Fc (KK)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGWFGGFNYWGQGLTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSA AQTNSMVTLG CLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTW PSQTVTCNVAHPASSTKVDK KIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPK DVLITITLTPKVT CVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT KPREEQIN STFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA AFGAPIEK TISKTKGRPKAP QVYTIPPKKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNT QPIMKTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLS HSPGK	48
muFAP LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLIN VGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFA VYYCQQGIMLPPTFG QGTKVEIKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKW KIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEA THKTSTSPIVKSFNRECE	49
抗 muPD1-HC_mI gG2a-LALAP G	EVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSSYRWNWIRKFPGNRLEWM GYINSAGISNYPNPKRRISITRDTSKNQFFLQVNSVTTEDAATYYCARS DNMGTPFTYWGQGLTVTVSSASTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGC LVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWP SQSITCNVAHPASSTKVDK KIEPRGPTIKCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFP PKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHR EDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKG SVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTE LNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNNH HTTKSFSRTPGK	50
抗muPD1-LC	DIVMTQGLTPNPVPSGESVSITCRSSKSLLYSDGKTYLNWYLQRPQSP QLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTDFLTKISGVEAEDVGIYYCQQGLE FPTFGGGTKLELKR TDAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDI NVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNS YTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE	51

实施例

[0304] 下面是本发明的方法和组合物的实施例。要理解, 鉴于上文提供的一般描述, 可以实施各种其它实施方案。

[0305] 实施例1

[0306] 实施例1A: PD1-IL2v融合蛋白的制备

[0307] 通过基因合成生成抗体重链-白介素-2 (IL-2) 融合蛋白 [抗人PD-1抗体的重链可变区, 人IgG<sub>1</sub>重链 (携带突变L234A, L235A和P329G (EU编号方式) 来去除效应器功能, 和突变S354C和T366W (EU编号方式) 来异二聚化 (“节”)), (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>接头, 和人IL-2v (携带突变T3A,

F42A, Y45A, L72G和C125A)]的表达盒, 抗体重链[抗人PD-1抗体的重链可变区, 和人IgG<sub>1</sub>重链(携带突变L234A, L235A和P329G (EU编号方式) 来去除效应器功能, 突变Y349C, T366S, L368A和Y410V (EU编号方式) 来异二聚化(“穴”), 和任选地突变H435R和Y436F (EU编号方式)]的表达盒和抗体轻链[抗人PD-1抗体的轻链可变区, 和人C<sub>H1</sub>恒定区]的表达盒。

[0308] 将它们每个经由HindIII和NheI消化克隆入表达载体, 在CMV启动子控制下, 继以内含子A且以BGH-polyA信号终止。载体进一步含有细菌氨苄青霉素抗性基因和来自大肠杆菌的复制起点。

[0309] 在摇瓶中通过以1:1:1的比用上文描述的载体共转染HEK293F细胞 (Invitrogen) 生成成人PD1-IL-2v融合蛋白 (SEQ ID NO 22, 24和25)。1周后收获上清液并穿过无菌滤器过滤。

[0310] 通过蛋白A亲和层析和大小排阻层析的组合自上清液纯化融合蛋白。对获得的产物表征身份(通过质谱术)和分析性特性诸如纯度(通过毛细电泳(CE-SDS)), 单体含量和稳定性。

[0311] 类似地生成鼠替代物PD1-IL2v融合蛋白 (SEQ ID NO 34-36)。替代物分子包含鼠IgG1抗小鼠PD-1抗体(携带Fc突变来去除效应器功能和异二聚化)和具有与人分子类似的突变的鼠白介素-2。

[0312] 两种融合蛋白均能以好的产量生成且是稳定的。

[0313] 实施例1B: PD-L1-IL2v融合蛋白的制备

[0314] 通过基因合成生成抗体重链-白介素-2 (IL-2) 融合蛋白[抗人PD-L1抗体的重链可变区, 人IgG<sub>1</sub>重链(携带突变L234A, L235A和P329G (EU编号方式) 来去除效应器功能, 和突变S354C和T366W (EU编号方式) 来异二聚化(“节”)), (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>接头, 和人IL-2v(携带突变T3A, F42A, Y45A, L72G和C125A)]的表达盒, 抗体重链[抗人PD-L1抗体的重链可变区, 和人IgG<sub>1</sub>重链(携带突变L234A, L235A和P329G (EU编号方式) 来去除效应器功能, 突变Y349C, T366S, L368A和Y410V (EU编号方式) 来异二聚化(“穴”)]的表达盒, 和抗体轻链[抗人PD-L1抗体的轻链可变区, 和人C<sub>H1</sub>恒定区]的表达盒。由嵌合MPSV启动子驱动抗体表达且合成polyA信号序列位于CDS的3'端。另外, 每个载体含有EBV OriP序列。

[0315] 通过使用聚乙烯亚胺用哺乳动物表达载体共转染悬浮生长的HEK293-EBNA细胞生成分子。以1:1:2比(“载体重链(VH-CH1-CH2-CH3-IL2v)” : “载体重链(VH-CH1-CH2-CH3)” : “载体轻链(VL-CL)”)用相应的表达载体转染细胞。

[0316] 为了转染, 在含有6mM L-谷氨酰胺和250mg/l G418培养基的无血清Excell1培养基中悬浮培养HEK293 EBNA细胞。为了600ml管式转瓶(最大工作体积400mL)中的生成, 在转染前24小时接种600x10<sup>6</sup>个HEK293 EBNA细胞。为了转染, 将细胞以210xg离心5分钟, 并用20ml预温热的CD CHO培养基替换上清液。在20ml CD CHO培养基中混合表达载体至400μg DNA的最终量。添加1080μl PEI溶液(2.7μg/ml)后, 将混合物漩涡震荡15秒, 随后于室温温育10分钟。之后, 混合细胞与DNA/PEI溶液, 转移至600ml管式转瓶并在具有5%CO<sub>2</sub>气氛的温箱中于37°C温育3小时。温育时间后, 添加360ml Excell1+6mM L-谷氨酰胺+5g/L Pepsoy+1.0mM VPA培养基并将细胞培养24小时。转染后1天, 添加7%补料7。培养7天后, 收集上清液来通过以3600xg离心20-30分钟(Sigma 8K离心机)来纯化, 将溶液无菌过滤(0.22mm滤器)并以0.01% (w/v)的终浓度添加叠氮化钠。将溶液保持于4°C。

[0317] 通过一个用蛋白A(MabSelectSure,GE Healthcare)的亲合步骤,继以大小排阻层析(HiLoad 16/60Superdex 200,GE Healthcare)纯化人PD-L1-IL2v构建物(SEQ ID NO 37-39)。为了亲和层析,在用25ml 20mM磷酸钠,20mM柠檬酸钠,pH 7.5平衡的HiTrap蛋白AHP柱(CV=5mL,GE Healthcare)上加载上清液。通过用至少10个柱体积的20mM磷酸钠,20mM柠檬酸钠,pH 7.5清洗来去除未结合的蛋白质并在6个柱体积的20mM柠檬酸钠,100mM氯化钠,100mM甘氨酸,0.01% Tween20 pH 3.0中洗脱靶蛋白。通过添加1/10的0.5M磷酸钠,pH 8.0来中和蛋白质溶液。浓缩并过滤靶蛋白,之后加载到用20mM组氨酸,140mM氯化钠,pH 6.0,0.01% Tween20平衡的HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)上。

[0318] 同样通过一个用蛋白A(MabSelectSure,GE Healthcare)的亲合步骤,继以大小排阻层析(HiLoad 16/60Superdex 200,GE Healthcare)纯化鼠PD-L1-IL2v构建物(SEQ ID NO 40-42)。为了亲和层析,1:1混合上清液与2M甘氨酸,0.6M NaCl pH 8.6并在用25ml 1M甘氨酸,0.3M NaCl pH 8.6平衡的HiTrap蛋白AHP柱(CV=5mL,GE Healthcare)上加载。通过用至少10个柱体积的1M甘氨酸,0.3M NaCl pH 8.6清洗来去除未结合的蛋白质并在6个柱体积的1M甘氨酸,0.3M NaCl pH 4.0中洗脱靶蛋白质。通过添加1/10的0.5M磷酸钠,pH 8.0来中和蛋白质溶液。浓缩并过滤靶蛋白,之后加载到用20mM组氨酸,140mM氯化钠,pH 6.0,0.01% Tween20平衡的HiLoad Superdex 200柱(GE Healthcare)上。

[0319] 人PD-L1-IL2v的最终制备物含有99%单体(于25°C在25mM  $K_2HPO_4$ ,125mM NaCl,200mM L-精氨酸单氢氯化物,0.02% (w/v)  $NaN_3$ ,pH 6.7运行缓冲液中在TSKgel G3000 SW XL分析性大小排阻柱(Tosoh)上测定)且具有100%纯度(在依照制造商的说明书使用的Caliper LabChip GXII系统(Caliper lifescience)上通过非还原性SDS毛细电泳测定)。生成产量是23mg/L。质谱术分析揭示大部分正确组装的分子,痕量(<5%)的分子没有白介素-2(在Agilent LC-MS系统(Agilent Technologies)及NUCLEOGEL RP1000-8,250mm x4.6mm柱(MACHEREY-NAGEL GmbH)和乙腈-甲酸梯度上实施质谱术)。

[0320] 对于鼠替代物PD-L1-IL2v,单体含量是96%,纯度是100%且生成产量是3.8mg/L。

[0321] 实施例1C:鼠替代物CEA-IL2v和鼠替代物FAP-IL2v的制备

[0322] 生成CEA靶向性IL-2变体免疫细胞因子CEA-IL2v的鼠源化替代物分子,称作 $\mu$ CEA- $\mu$ IL2v(也称作 $\mu$ CEA-IL2v),其用于完全免疫胜任小鼠中的体内肿瘤模型以降低抗药物抗体(ADA)的形成。另外,分别生成鼠源化嵌合型式的FAP靶向性IL-2变体免疫细胞因子FAP-IL2v,称作 $\mu$ FAP- $\mu$ IL2v(也称作 $\mu$ FAP-IL2v),其用于完全免疫胜任小鼠中的体内肿瘤模型以降低抗药物抗体(ADA)的形成。在鼠源化替代物分子中,在 $\mu$ IgG1上用DDKK突变替换Fc域节-入-穴突变且在 $\mu$ IgG1上用DAPG突变替换LALAP329G突变(如PCT申请WO 2016/0330350 A1中公开的,通过援引将其完整收录)。

[0323] 例如, $\mu$ CEA- $\mu$ IL2v特征在于下面的特征。作为亲本抗体,应用具有人(源化)可变区但鼠恒定区的人-小鼠嵌合IgG1抗体。为了避免潜在的免疫原性,使用相应的Black 6同种异型(由小鼠基因组计划发表的序列)。通过与在人IL-2v中鉴定的那些同源的三处突变消除对 $\mu$ IL2R $\alpha$ 的结合并去除相应的O-糖基化位点:T23A(O-Glyco),F76A,Y79A,L106G。另外,与阿地白介素中一样,通过C160A突变,突变半胱氨酸残基以避免聚集(编号方式基于UniProt ID P04351,包括信号肽的)。虽然 $\mu$ IgG1早就具有降低的Fc $\gamma$ R结合,但是对鼠Fc $\gamma$ R的结合通过引入DAPG突变(D265A,P329G)完全消除,而 $\mu$ FcRn结合得到保留。 $\mu$ IL-2v经

由非免疫原性  $(G_4S)_2$  接头仅仅与  $\mu$ IgG1 抗体的一条重链的 C 端融合。为了实现这一点, 经由 Fc 域中的 DDKK 突变使用静电操纵改造免疫细胞因子以容许小鼠背景中的异二聚化。

[0324]  $\mu$ CEA- $\mu$ IL2v 的多肽序列如下:

[0325] 具有 DD 突变且融合有  $\mu$ IL2v 的重链 (SEQ ID NO:44):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEW  
 MGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCA  
 RWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVT  
 LGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTW  
 PSQTVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDV  
 LTITLTPKVTVCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTR  
 [0326] SVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIP  
 PPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTD  
 GSYFVYSDLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGGGGG  
 SGGGGSGGGGSAPASSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQEL  
 LSRMENYRNLKLPRMLTAKFALPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDGT  
 QSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIA  
 FAQSIISTSPQ

[0327] 具有 KK 突变的重链 (SEQ ID NO:45):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEW  
 MGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCA  
 RWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVT  
 LGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTW  
 [0328] PSQTVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDV  
 LTITLTPKVTVCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTR  
 SVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIP  
 PPKKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTD  
 GSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK

[0329] 轻链 (SEQ ID NO:46):

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASAAVGTYYVAWYQQKPGKAPKLLIYS  
 ASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQ  
 [0330] GTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNRFYPKDINVKWKID  
 GSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKT  
 STSPIVKSFNREK

[0331]  $\mu$ FAP- $\mu$ IL2v 的多肽序列如下:

[0332] 具有 DD 突变且融合有  $\mu$ IL2v 的重链 (SEQ ID NO:47):

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
 AII GSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKG  
 WFGGFNYWGQGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVK  
 GYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVT  
 CNVAHPASSTKVDK KIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTP  
 KVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELP I  
 [0333] MHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQ  
 MAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFV  
 YSDLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGGGGGGSGGG  
 GSGGGGSAPASSSTSSSTAEAAQQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRM  
 ENYRNLKLPRMLTAKFALPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDGTQSKSF  
 QLEDAENFISNIRVTVVKLKGS DNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFAQSII  
 STSPQ

[0334] 具有KK突变的重链(SEQ ID NO:48):

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
 AII GSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKG  
 WFGGFNYWGQGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVK  
 GYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVT  
 [0335] CNVAHPASSTKVDK KIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTP  
 KVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELP I  
 MHQDWLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQ  
 MAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDG SYFV  
 YSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

[0336] 轻链(SEQ ID NO:49):

EIVLTQSPGTL SLS PGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLIN V  
 GSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGT  
 [0337] KVEIKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDGS  
 ERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTS  
 PIVKSFNRNEC

[0338] muPD1的多肽序列如下:

[0339] 重链(SEQ ID NO:50):

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSSYRWNWIRKFPGNRLEWMG  
 YINSAGISNYNPSLKRRISITRDTSKNQFFLQVNSVTTEDAATYYCARSDN  
 MGTPFTYWGQGTLVTVSSASTTAPSVYPLAPVCGD TTGSSVTLGCLVKG  
 YFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCN  
 [0340] VAHPASSTKVDDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLN  
 ISLSPVITCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRV  
 VSALPIQHGDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP  
 PPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS  
 GSYFMYSKLRVEKKNW VERNYSYSCSVVHEGLHNHHT TKSFSRTPGK  
 [0341] 轻链(SEQ ID N0:51):  
 DIVMTQGTLPNPVPSGESVSITCRSSKSLLYSDGKTYLNWYLQRPQSPQL  
 LIYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYYCQQGLEFPTF  
 [0342] GGGTKLELKRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKW  
 KIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATH  
 KTSTSPIVKSFNREK

[0343] 在下面的实施例中进一步使用这个实施例中制备的免疫缀合物。

[0344] 实施例2

[0345] 实施例2A:PD1-IL2v对激活的CD8和CD4 T细胞的结合

[0346] 将来自健康人供体的新鲜分离的PBMC用CD3和CD28刺激过夜以诱导T细胞上PD1的上调。在培养基(RPMI1640,10% FCS,2mM谷氨酰胺)中将PBMC接种入用1μg/ml CD3(克隆OKT3,#317304,BioLegend)于37°C包被1小时的细胞培养烧瓶。以2μg/ml的浓度在溶液中将CD28添加至PBMC(克隆CD28.2,#302914,BioLegend)。次日,收获PBMC并转移入96孔圆底板(200'000个细胞每孔)。用FACS缓冲液(PBS,2% FBS,5mM EDTA,0.025%NaN<sub>3</sub>)清洗细胞并于4°C在FACS缓冲液中用40μl指定分子(PD1 IgG,PD1-IL2v和CEA-IL2v)染色30分钟。将细胞用FACS缓冲液清洗两次以去除未结合的分子。然后,将40μl稀释的PE抗人Fc特异性二抗(#109-116-170,Jackson ImmunoResearch)添加至细胞。于4°C温育30分钟后,将细胞用FACS缓冲液清洗两次。为了检测T细胞,将PBMC用40μl CD3 FITC(克隆UCHT1,#300406,BioLegend),CD4 APC(克隆RPA-T4,300514,BioLegend)和CD8 BV421(克隆RPA-T8,#301036,BioLegend)的混合物于4°C染色30分钟。通过用FACS缓冲液清洗两次来去除未结合的抗体。最后,用含1% PFA的FACS缓冲液固定细胞并使用BD Fortessa测量,在CD3+CD4+细胞(CD4 T细胞)和CD3+CD8+细胞(CD8 T细胞)上设门控。

[0347] 如图2中显示的,PD1-IL2v和相应的PD1 IgG相似地结合CD4和CD8 T细胞。一种类似的免疫细胞因子(CEA-IL2v,靶向肿瘤细胞上的CEA,代替PD1)充当非靶向性对照以与单独的并非靶向PD1的基于IL2v的免疫细胞因子的效果比较。

[0348] 实施例2B:PD1-IL2v对T细胞和NK细胞的激活和增殖

[0349] 将来自健康人供体的新鲜分离的PBMC温育过夜,然后用CFSE(5(6)-羧基荧光素二乙酸盐N-琥珀酰亚胺基酯,#21888,Sigma-Aldrich)标记。简言之,将30x10<sup>6</sup>个PBMC用PBS清

洗一次。平行地,将CSFE储液(2mM,在DMSO中)在PBS中1:20稀释。在30ml预温热的PBS中重悬浮PBMC,添加30 $\mu$ l CFSE溶液并立即混合细胞。为了最佳的标记,将细胞于37 $^{\circ}$ C温育15分钟。然后,添加10ml预温热的培养基(RPMI1640,10% FCS,1%谷氨酰胺)以停止标记反应。将细胞以400xg旋下10分钟并在20ml新鲜培养基中重悬浮并于37 $^{\circ}$ C温育另外30分钟。最后,将细胞用培养基清洗一次并以1x10<sup>6</sup>个细胞每ml在新鲜培养基中重悬浮。在96孔圆底板中接种经过标记的PBMC(200'000个细胞每孔)并用指定分子(PD1-IL2v,CEA-IL2v,PD1 IgG,和PD1 IgG加CEA-IL2v的组合)处理5天。温育后,将细胞用FACS缓冲液清洗一次并用20 $\mu$ l CD3 APC/Cy7(克隆UCHT1,#300426,BioLegend),CD56 APC(克隆HCH56,3#18310,BioLegend),CD4 PE(克隆RPA-T4,#300508,BioLegend)和CD25 BV421(克隆M-A251,BioLegend)在FACS缓冲液中的混合物于4 $^{\circ}$ C染色30分钟。之后,将PBMC用FACS缓冲液清洗两次,之后用含1% PFA的FACS缓冲液固定它们并用BD Fortessa测量荧光。通过测量CD8 T细胞(CD3+CD4-),CD4 T细胞(CD3+CD4+)和NK细胞(CD3-CD56+)的CFSE稀释来测定增殖。

[0350] 如图3中显示的,PD1-IL2v的活性与CEA-IL2v,和CEA-IL2v与PD1 IgG的组合的活性相当。单独的PD1 IgG在这种设置中没有活性。

[0351] 图4显示PD1-IL2v诱导NK细胞,CD8 T细胞和CD4 T细胞激活(如通过CD25的上调测量的)。由CEA-IL2v和CEA-IL2v与PD1 IgG的组合诱导的激活是相似的。单独的PD1 IgG在这种设置中并不诱导激活。

[0352] 实施例2C:PD1-IL2v对预激活的CD8和CD4 T细胞的激活和增殖

[0353] 用CFSE(5(6)-羧基荧光素二乙酸盐N-琥珀酰亚胺基酯,#21888,Sigma-Aldrich)标记来自健康人供体的新鲜分离的PBMC。简言之,将30x10<sup>6</sup>个PBMC用PBS清洗一次。平行地,在PBS中1:20稀释CSFE储液(2mM,在DMSO中)。在30ml预温热的PBS中重悬浮PBMC,添加30 $\mu$ l CFSE溶液并立即混合细胞。为了最佳的标记,将细胞于37 $^{\circ}$ C温育15分钟。然后,添加10ml预温热的培养基(RPMI1640,10% FCS,1%谷氨酰胺)以停止标记反应。将细胞以400xg旋下10分钟并在20ml新鲜培养基中重悬浮并于37 $^{\circ}$ C温育另外30分钟。最后,将细胞用培养基清洗一次并以1x10<sup>6</sup>个细胞每ml在新鲜培养基中重悬浮。将CFSE标记的PBMC用1 $\mu$ g/ml PHA(#L8902,Sigma-Aldrich)预激活过夜以诱导T细胞上PD-1的上调。次日,收集预激活的PBMC并计数。然后,在96孔圆底板中接种PBMC(200'000个细胞每孔)并用指定分子(PD1-IL2v,CEA-IL2v,PD1 IgG,和PD1 IgG加CEA-IL2v的组合)处理4天。温育后,将细胞用FACS缓冲液清洗一次并用20 $\mu$ l CD3 APC/Cy7(克隆UCHT1,#300426,BioLegend),CD8 APC(克隆SK1,BioLegend)和CD25 BV421(克隆M-A251,BioLegend)在FACS缓冲液中的混合物于4 $^{\circ}$ C染色30分钟。之后,将PBMC用FACS缓冲液清洗两次,之后用含1% PFA的FACS缓冲液固定它们并用BD Fortessa测量荧光。通过测量CD8 T细胞(CD3+CD8+)和CD4 T细胞(CD3+CD8-)的CFSE稀释来测定增殖。

[0354] 图5显示PD1-IL2v诱导表达PD-1的PHA激活的CD8和CD4 T细胞增殖。活性与CEA-IL2v和CEA-IL2v与PD1 IgG的组合相当。单独的PD1 IgG在这种设置中没有活性。在这种设置中观察不到PD-1阻断的另外的效果,大概是由于PD-L1阳性肿瘤细胞的缺失。

[0355] 如图6中显示的,PD1-IL2v诱导表达PD-1的PHA激活的CD8和CD4 T细胞激活(使用CD25表达作为激活的标志物)。CEA-IL2v和CEA-IL2v与PD1 IgG的组合诱导相当的T细胞激活。单独的PD1 IgG在这种设置中没有活性。在这种设置中观察不到PD-1阻断的另外的效

果,大概是由于PD-L1阳性肿瘤细胞的缺失。

[0356] 实施例2D:PD1-IL2v和PD-L1-IL2v对NK92的增殖

[0357] 收获NK92细胞,计数并评估存活力。将细胞用PBS清洗三次以去除残留的IL-2并在没有IL-2的培养基(RPMI1640,10% FCS,1%谷氨酰胺)中重悬浮。将经过清洗的NK92细胞在细胞温箱中温育2小时(IL-2饥饿)。饥饿后,将细胞在没有IL-2的新鲜培养基中重悬浮至200'000细胞每ml并将50μl细胞悬浮液转移至96孔细胞培养处理的平底板并补充50μl稀释的抗体(在没有IL-2的培养基中),Proleukin(1.5μg/ml终浓度)或培养基(对照孔)以达到100μl每孔的终体积。将板在温箱中温育2天。2天后,将CellTiter-Glo(Promega)试剂和细胞培养板平衡至室温。如制造商的说明书中所述制备CellTiter-Glo溶液并将100μl溶液添加至每个孔。温育10分钟后,通过移液来重悬浮剩余聚集物并将150μl混合物转移至白色平底板。用Tecan Spark 10M多模式读数仪测量发光。

[0358] 图7小图A显示PD-L1-IL2v像CEA-IL2v一样有效地诱导NK92细胞增殖。图7小图B显示PD-L1-IL2v和PD1-IL2v在诱导NK92细胞增殖方面具有相同活性。NK92细胞是PD1阴性的。

[0359] 实施例2E:PD-L1-IL2v对CTLL2细胞的结合

[0360] 鼠T细胞系CTLL2表达PD-L1。使用这些细胞来测试PD-L1-IL2v(鼠替代物)对PD-L1的结合。收获细胞,检查存活力并将它们转移入96孔圆底板(200'000个细胞每孔)。用FACS缓冲液(PBS,2% FBS,5mM EDTA,0.025%NaN<sub>3</sub>)清洗细胞并用40μl FACS缓冲液中的指定分子于4℃染色30分钟。将细胞用FACS缓冲液清洗两次以去除未结合的分子。然后,将40μl稀释的APC抗小鼠Fc特异性二抗(#115-136-071,Jackson ImmunoResearch)添加至细胞。于4℃温育30分钟后,将细胞用FACS缓冲液清洗两次。用BD LSR Fortessa分析细胞。

[0361] 图8显示PD-L1-IL2v像相应的PD-L1 μIgG1一样好地结合CTLL2细胞。这些细胞是PD1阴性。

[0362] 实施例2F:PD1-IL2v和PD-L1-IL2v对CTLL2细胞的增殖

[0363] 收获CTLL2细胞,计数并评估存活力。将细胞用PBS清洗三次(以去除残留的IL-2),在没有IL-2的培养基(RPMI1640,10% FCS,1%谷氨酰胺)中重悬浮并在细胞温箱中温育2小时(IL-2饥饿)。饥饿后,在没有IL-2的新鲜培养基中重悬浮200'000个CTLL2细胞每ml并将50μl细胞悬浮液转移至96孔细胞培养处理的平底板。将50μl稀释的鼠替代物PD1-IL2v,鼠替代物PD-L1-IL2v,鼠替代物CEA-IL2v,稀释的Proleukin(1.5μg/ml终浓度)或单独的培养基(均使用无IL-2培养基)添加至孔至100μl/孔的终体积。将样品在细胞温箱中温育3天并使用CellTiter-Glo依照制造商的说明书评估增殖。简言之,将100μl试剂添加至每个孔并温育10分钟。通过移液来重悬浮剩余聚集物并将150μl混合物转移至白色平底板。用Tecan Spark 10M多模式读数仪测量发光。

[0364] 图9小图A显示PD-L1-IL2v诱导CTLL2细胞增殖。活性看来与CEA-IL2v相比更高,大概是由于CTLL2细胞上PD-L1的表达。图9小图B再次显示PD1-IL2v诱导CTLL2细胞增殖。活性看来与PD-L1-IL2v相比更低,大概是因为这些细胞只表达PD-L1但不表达PD1。

[0365] 实施例3

[0366] PD1-IL2v和PD-L1-IL2v在同系小鼠肿瘤模型中的体内功效

[0367] 在Panc02-Fluc同系模型中对PD1-IL2v和PD-L1-IL2v免疫缀合物(鼠替代物)单独地和与相应的PD1和PD-L1抗体比较地测试它们的抗肿瘤功效。



[0368] Panc02-H7细胞(小鼠胰腺癌)最初自MD Anderson癌症中心(Texas, USA)获得并在扩充后保藏于Roche-Glycart内部细胞库。Panc02-H7-Fluc细胞系通过钙转染和亚克隆技术内部生成。在含有10% FCS(Sigma), 500 $\mu$ g/ml潮霉素和1% Glutamax的RPMI培养基中培养Panc02-H7-Fluc。在5% CO<sub>2</sub>的水饱和气氛中于37 $^{\circ}$ C培养细胞。将第23代用于移植。细胞存活力是90.4%。使用0.3ml结核菌素注射器(BD Biosciences, Germany)将1 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞每只动物注射入Black 6小鼠的胰腺。为此,在麻醉的小鼠的左腹部位做一小切口。打开腹膜壁并用钳子小心分离胰腺。在胰尾中注射10 $\mu$ l (RPMI培养基中的1 $\times$ 10<sup>5</sup>个Panc02-H7-Fluc细胞)细胞悬浮液。使用5/0可分解缝合线关闭腹膜壁和皮肤伤口。

[0369] 依照承诺的指南(GV-Solas; Felasa; TierschG)以12小时光亮/12小时黑暗的日周期在无特定病原体条件下维持实验开始时10-12周龄的雌性Black 6小鼠(Charles Rivers, Lyon, France)。实验性研究方案得到当地政府审查和批准(ZH193/2014)。到达后,将动物维持1周以适应新环境和观察。定期进行连续健康监测。

[0370] 在研究第0天给小鼠胰腺内注射1 $\times$ 10<sup>5</sup>个Panc02-Fluc细胞,随机化并称重。注射肿瘤细胞后1周,给小鼠静脉内注射PD1-IL2v, PD-L1-IL2v或PD1和PD-L1抗体,一周一次,持续四周。

[0371] 给所有小鼠静脉内注射200 $\mu$ l适宜溶液。给媒介组中的小鼠注射组氨酸缓冲液且给治疗组注射鼠替代物PD1-IL2v和PD-L1-IL2v缀合物或相应的PD1和PD-L1抗体,在适宜时用组氨酸缓冲液稀释。以mg/kg计给每只小鼠注射的抗体的量如下:1.5mg/kg PD1-IL2v和PD-L1-IL2v, 10mg/kg PD1和PD-L1抗体。

[0372] 图10和表1显示PD1-IL2v介导与所测试的所有其它单一药剂(值得注意的是包括PD-L1-IL2v)相比显著卓越的就增强的中值和总体存活而言的功效。

[0373] 表1:Panc02-Fluc同系肿瘤模型中,用PD1-IL2v, PD-L1-IL2v, PD1或PD-L1抗体处理的Black 6小鼠的中值和总体存活

组	以天计的中值存活	与对照比较的p值	总体存活
muPD1-IL2v	未达到	<0.0001***	7/8
muPD-L1-IL2v	43	0.0045*	0/8
muPD1	58	0.0002**	0/8
muPD-L1	28	0.0985	0/8
媒介	24	1	0/8

[0375] 为了通过IVIS<sup>®</sup> SPECTRUM的生物发光成像,在生物发光成像采集(BLI)前10分钟给小鼠腹膜内注射150mg/kg D-萤光素,稍后用4%异氟烷麻醉。随后,将小鼠转移入隔离室,放置入IVIS<sup>®</sup> SPECTRUM。通过采集发光信号达10-50秒来实施体内BLI采集。作为辐射率(光子)/sec/cm<sup>2</sup>/sr保存数据。用Living Image<sup>®</sup> 4.4软件实施体内BLI数据分析并以肿瘤抑制曲线表示。

[0376] 图11显示PD1-IL2v与所有其它组(值得注意的是包括PD-L1-IL2v)相比卓越的就降低的生物发光信号(光子/秒)而言的功效。早至在第7天第一次疗法施用之后就通过IVIS<sup>®</sup> SPECTRUM在数个治疗组中检测到Panc02-Fluc生物发光信号的降低,但是只有PD1-IL2v显示持续实验的整个持续时间大多数小鼠中BLI信号的完全消失,指示8只小鼠中7只

中的完全响应。

#### [0377] 实施例4

[0378] 经由PD-1或PD-L1阻断对耗竭的病毒特异性T细胞投递IL-2v的效果

[0379] 已经作为长期暴露于病毒抗原的后果第一次描述在耗竭的病毒特异性T细胞上的PD-1表达,而且已经将它与T细胞没有能力发起有效的抗病毒应答联系起来。能够同时分泌IL-2和IFN- $\gamma$ 的病毒特异性CD4<sup>+</sup>T细胞赋予保护免于慢性感染中的病毒再激活。事实上,已经将CD4<sup>+</sup>T细胞的多功能签名与受到巨细胞病毒(CMV),埃巴二氏病毒(EBV)和单纯疱疹病毒(HSV)感染的健康个体中以及那些受到人免疫缺陷病毒(HIV)感染的但数年保持没有症状的个体中的病毒控制联系起来。

[0380] 因此,我们在慢性病毒感染的背景中开发了一种体外测定法来评估PD-1和PD-L1靶向将突变型式的IL-2(IL-2v)投递至功能障碍性抗原特异性T细胞的效果。为了避免限制对于我们的测定法合适的供体的量,鉴于大约80%的群体是CMV血清阳性的,我们选择一种CMV免疫原性病毒蛋白(pp65)作为用于T细胞的回忆抗原。因此,在以10 $\mu$ g/ml的浓度添加我们的构建物之前我们将健康人供体外周血单个核细胞(PBMC)用CMV-pp65刺激几个小时。43小时后,我们通过添加Golgi Plug(布雷菲德菌素A)和Golgi Stop(莫能菌素)并将细胞于37 $^{\circ}$ C温育另外5小时来阻断来自高尔基体的蛋白质转运。然后,清洗细胞,在表面上用抗人CD3,CD4,CD8,CD62L和CD45RO抗体染色,之后用固定/透化缓冲液(BD Bioscience)固定/透化。最后,我们针对IL-2,IFN- $\gamma$ 和Ki67(均来自eBioscience)实施细胞内染色。

[0381] 我们观察到PD1-IL2v和PD-L1-IL2v二者,以及相应的IgG抗体与IL-2v的组合以相当的水平提高多功能性(图12小图B)和IL-2和IFN- $\gamma$ 单功能性(分别是图12小图A和小图C)CD4<sup>+</sup>T细胞的频率,提供分别与抗PD-1和抗PD-L1阻断相比增强的效果。多功能性(图13小图B)和IFN- $\gamma$ 单功能性CD4<sup>+</sup>T细胞(图13小图C和小图D)中的扩充群体显示效应-记忆(CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>)和终末分化效应子概况(CD45RO<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>)。相反,受到PD-L1拮抗作用诱导且因IL-2v共投递而进一步扩充的IL-2单功能性CD4<sup>+</sup>T细胞展示幼稚签名(CD62L<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>) (图13小图A)。

[0382] 我们能得出结论,经由PD1-IL-2v融合蛋白将IL-2v投递至耗竭的CMV特异性CD4<sup>+</sup>T细胞导致以共分泌IL-2和IFN- $\gamma$ 的能力为特征的长命保护性病毒特异性群体扩充。

#### [0383] 实施例5

[0384] 实施例5A。PD1-IL2v优先结合激活的常规T细胞胜过激活的调节性T细胞

[0385] 在一种竞争性结合测定法中评估PD1-IL2v对激活的常规和调节性T细胞的结合特性。用两步调节性T细胞分离试剂盒(Miltenyi, #130-094-775)分离CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>dim</sup>调节性T细胞(T<sub>reg</sub>)。平行地,通过收集CD25正选择(Miltenyi, #130-092-983)的负级分,继以CD4<sup>+</sup>富集(Miltenyi, #130-045-101)来分离CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>常规T细胞(T<sub>conv</sub>)。用CFSE(eBioscience, #65-0850-84)标记T<sub>conv</sub>并用细胞痕迹紫(ThermoFisher scientific, C34557)标记T<sub>reg</sub>以跟踪这两种群体的增殖。将T<sub>conv</sub>和T<sub>reg</sub>一起接种入用1 $\mu$ g/ml CD3(克隆OKT3, #317315, BioLegend)于4 $^{\circ}$ C包被过夜的培养板。在溶液中以1 $\mu$ g/ml CD28(克隆CD28.2, #302923, BioLegend)的浓度添加CD28。刺激5天后,用均内部用AF647标记的PD1(0376)和PD1-IL2v(0590)进行结合测定法。

[0386] PD1-IL2v双特异性抗体显示与PD1相当的结合概况(图14小图A和小图B)。图14小

图A显示在相同样品内的 $T_{conv}$ 较之 $T_{reg}$ 上结合的给定抗体的频率的变化。每个符号代表一名分开的供体,水平线表示中值, $N=4$ 。由于 $T_{conv}$ 上比 $T_{reg}$ 上更高表达水平的PD-1,两种分子均显示对 $T_{conv}$ 胜过 $T_{reg}$ 的更高的结合能力(图14小图B;来自一名代表性供体的数据显示对 $T_{conv}$ (黑色线)和 $T_{reg}$ (灰色)的结合)。因此,PD1-IL2v双特异性抗体维持PD1的结合特性,尽管IL2v与抗体偶联。

[0387] 实施例5B:在 $T_{reg}$ 遏制测定法中PD1-IL2v处理后对 $T_{conv}$ 效应器功能的挽救

[0388] 在下一步中测试PD1-IL2v是否能逆转 $T_{conv}$ 的 $T_{reg}$ 遏制。因此,建立了一种遏制性功能测定法,其中在有或没有阻断性抗体的情况下在来自无关供体,用于同种(allo-specific)刺激的 $CD4^+CD25^-$ 存在下将 $T_{conv}$ 和 $T_{reg}$ 一起培养5天。为此目的,如上文所述分离并标记 $T_{conv}$ 和 $T_{reg}$ 。通过在FACS染色之前应用蛋白质转运抑制剂(GolgiPlug#555029, BD和GolgiStop#554724, BD)达5小时来增强高尔基复合体中细胞因子的积累。

[0389] 测量增殖的 $T_{conv}$ 在 $T_{reg}$ 存在和缺失下分泌粒酶B(GrzB;图15小图A)和干扰素伽马( $IFN\ \gamma$ ;图15小图B)的能力。用下面的公式计算 $T_{reg}$ 遏制:

[0390]  $\% \text{细胞因子遏制} = 100 - ((\% \text{细胞因子}_{T_{conv}+T_{reg}\pm\text{阻断性抗体}}) / (\% \text{细胞因子}_{T_{conv}\text{未处理}})) * 100$ , 其中 $\% \text{细胞因子}_{T_{conv}+T_{reg}\pm\text{阻断性抗体}}$ 是在 $T_{reg}\pm$ 阻断性抗体存在下由 $T_{conv}$ 分泌的细胞因子的水平, $\% \text{细胞因子}_{T_{conv}\text{未处理}}$ 是在 $T_{reg}$ 缺失下由 $T_{conv}$ 分泌的细胞因子的水平。在图15小图A和小图B中,每个符号代表一名分开的供体,水平线指示中值, $N=5$ ,0%处的点线代表不受 $T_{reg}$ 遏制。 $P$ 是使用单向ANOVA计算的( $*p<0.05$ , $**p<0.01$ , $***p<0.001$ , $****p<0.0001$ )。

[0391] 图15小图A显示与未处理组中的中值68.6%遏制相比,用PD1抗体(0376)处理导致中值为47.7%的 $T_{conv}$ 功能遏制(没有统计学显著性)。同样,用阿特殊单抗(Atezolizumab),纳武单抗(Nivolumab)和匹迪单抗(Pembrolizumab)阻断PD-1/PD-L1相互作用显示与PD1抗体相同的趋势。有趣的是,DP47-IL2v(中值=-11.3%, $p=0.0011$ )和PD1-IL2v(中值=-43.6%, $p<0.0001$ )自 $T_{reg}$ 遏制挽救 $T_{conv}$  GrzB效应器功能。而且,PD1-IL2v甚至比单独的PD1抗体显著( $p=0.0026$ )更加有力。

[0392] 平行地,关于 $T_{reg}$ 对 $T_{conv}$ 的 $IFN\ \gamma$ 遏制实施相同的分析(图15小图B)。DP47-IL2v(中值=51.77%, $p=0.0251$ )和PD1-IL2v(中值=31.23%, $p=<0.0001$ )自 $T_{reg}$ 遏制挽救 $T_{conv}$   $IFN\ \gamma$ 效应器功能。

[0393] 实施例6

[0394] 作为单一药剂和组合与PD1和FAP-IL2v抗体比较PD1-IL2v免疫缀合物在小鼠肿瘤细胞系的同系模型中的体内功效

[0395] 在同系模型中与鼠替代物PD1和鼠替代物FAP-IL2v(muFAP-IL2v)的组合比较对鼠替代物PD1-IL2v免疫缀合物(muPD1-IL2v)测试它的抗肿瘤功效。所使用的同系模型是Panc02-Fluc胰腺同系模型。

[0396] 在胰腺内注射入Black 6小鼠的小鼠胰腺Panc02-Fluc转染子细胞系中测试鼠替代物PD1-IL2v免疫缀合物。Panc02-H7细胞(小鼠胰腺癌)最初自MD Anderson癌症中心(Texas, USA)获得并在扩充后保藏于Roche-Glycart内部细胞库。Panc02-H7-Fluc细胞系通过钙转染和亚克隆技术内部生成。在含有10% FCS(Sigma), 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 潮霉素和1% Glutamax的RPMI培养基中培养Panc02-H7-Fluc。在5%  $\text{CO}_2$ 的水饱和气氛中于37 $^\circ\text{C}$ 培养细胞。将第23代用于移植。细胞存活力是87.5%。使用0.3ml结核菌素注射器(BD

Biosciences, Germany) 将 $1 \times 10^5$ 个细胞每只动物注射入小鼠的胰腺。为此,在麻醉的Black 6小鼠的左腹部做一小切口。打开腹膜壁并用钳子小心分离胰腺。在胰尾中注射 $10 \mu\text{l}$  (RPMI培养基中的 $1 \times 10^5$ 个Panc02-H7-Fluc细胞)细胞悬浮液。使用5/0可分解缝合线关闭腹膜壁和皮肤伤口。

[0397] 依照承诺的指南(GV-Solas; Felasa; TierschG)以12小时光亮/12小时黑暗的日周期在无特定病原体条件下维持实验开始时10-12周龄的雌性Black 6小鼠(Charles Rivers, Lyon, France)。实验性研究方案得到当地政府审查和批准(ZH193/2014)。到达后,将动物维持1周以适应新环境和观察。定期进行健康监测。

[0398] 在研究第0天给小鼠胰腺内注射 $1 \times 10^5$ 个Panc02-Fluc细胞,随机化并称重。注射肿瘤细胞后1周,给小鼠静脉内注射两种不同剂量的PD1-IL2v并与PD1和FAP-IL2v抗体的组合比较,一周一次,持续四周。

[0399] 给所有小鼠静脉内注射 $200 \mu\text{l}$ 适宜溶液。给媒介组中的小鼠注射组氨酸缓冲液且给治疗组注射PD1-IL2v (0.5mg/kg或1mg/kg), PD1 (10mg/kg) 和FAP-IL2v (2.5mg/kg) 抗体或PD1和FAP-IL2v (10mg/kg PD1和2.5mg/kg FAP-IL2v) 抗体的组合。为了获得适宜量的免疫缀合物每 $200 \mu\text{l}$ ,在必要时依照表2用组氨酸缓冲液稀释储液。

[0400] 表2:化合物,剂量,配制缓冲液和储液浓度

化合物	剂量	配制缓冲液	储液的浓度 (mg/mL)
[0401] muPD1-IL2v	10 $\mu\text{g}$ 和30 $\mu\text{g}$	20mM 组氨酸, 140mM NaCl, 0.01% Tween20; pH6.0	3.63
muFAP-IL2v	50 $\mu\text{g}$	20mM 组氨酸, 140mM NaCl, 0.01% Tween20; pH6.0	4.91
muPD1	200 $\mu\text{g}$	20mM 组氨酸, 140mM NaCl, 0.01% Tween20; pH6.0	5.84

[0402] 为了通过IVIS® SPECTRUM的生物发光成像,在生物发光成像采集(BLI)前10分钟给小鼠腹膜内注射150mg/kg D-萤光素,稍后用4%异氟烷麻醉。随后,将小鼠转移入隔离室,放置入IVIS® SPECTRUM。通过采集发光信号达10-50秒来实施体内BLI采集。作为辐射率(光子)/sec/cm<sup>2</sup>/sr保存数据。用Living Image® 4.4软件实施体内BLI数据的分析并以肿瘤抑制曲线表示。

[0403] 为了通过组织学来评估免疫药效学,在第一次疗法后4天通过颈脱位处死3只小鼠每组。收获胰腺肿瘤并立即在福尔马林10%中固定。将组织在福尔马林溶液中留置过夜,稍后为了FFPET加工(Leica 1020, Germany)。随后在切片機(Leica RM2235, Germany)中切出4 $\mu\text{m}$ 石蜡切片。在Leica自动染色仪(Leica ST5010, Germany)中遵循制造商的方案实施小鼠CD3, PD1和ICOS免疫组织化学。用Olympus扫描仪扫描图像。

[0404] 图16显示作为单一药剂和组合比较鼠替代物PD1-IL2v与鼠替代物FAP-IL2v和鼠替代物PD-1抗体的功效实验的结果。将Panc02-H7-Fluc转染子胰腺癌细胞系注射入Black 6小鼠中的胰腺以研究胰腺同位同系模型中的存活。以mg/kg计给每只小鼠注射的抗体的量

如下:0.5和1mg/kg鼠替代物PD1-IL2v,10mg/kg鼠替代物PD1和2.5mg/kg鼠替代物FAP-IL2v抗体。静脉内注射抗体,每周一次,持续4周。与所有其它单一药剂和鼠替代物PD-1和鼠替代物FAP-IL2v的组合相比,在0.5和1mg/kg鼠替代物PD1-IL2v中观察到显著卓越中值和总体存活。图16和表3显示与所有其它单一药剂以及PD1和FAP-IL2v的组合相比,两种剂量的PD1-IL2v均介导卓越的就增强的中值和总体存活而言的功效。

[0405] 表3:Panc02-Fluc同系肿瘤模型中用PD1-IL2v,PD1,FAP-IL2v和PD-1和FAP-IL2v抗体的组合处理的Black 6小鼠的中值和总体存活

组	以天计的中值存活	与对照比较的p值	总体存活
muPD1-IL2v (0.5mg/kg)	未达到	<0.0001***	4/7
muPD1-IL2v (1mg/kg)	未达到	<0.0001***	7/7
muPD1 (10mg/kg)	63	0.0014*	0/7
muFAP-IL2v	45	0.0941	0/6
muPD-1和muFAP-IL2v	75	0.0002***	1/7
媒介	37	1	0/6

[0407] 图17显示比较鼠替代物PD1-IL2v与FAP-IL2v,鼠替代物PD1和它们的组合的功效实验的结果。将Panc02-H7-Fluc转染子胰腺癌细胞系注射入Black 6小鼠中的胰腺以借助生物发光来研究胰腺同位同系模型中的存活。早至在第7天第一次疗法施用之后就通过IVIS® SPECTRUM在数个治疗组中检测到Panc02-Fluc生物发光信号的降低,但是只有PD1-IL2v显示持续实验的整个持续时间大多数小鼠中BLI信号的完全消失,指示0.5mg/kg剂量的7只小鼠中4只和1mg/kg剂量的7只小鼠中7只中的完全响应。图17显示与所有其它单一药剂和组合组相比,两种剂量的PD1-IL2v均介导卓越的就降低生物发光信号(光子/秒)而言的功效。

[0408] 图18A和18B显示针对抗小鼠CD3染色的胰腺肿瘤的免疫组织化学图像(图18A)和T细胞量化分析(图18B)的结果。在自指定处理组衍生的Black 6小鼠胰腺肿瘤上实施CD3 T细胞的免疫组织化学染色。为了免疫组织化学染色制备组织样品:在施用处理后自动收获肿瘤,在福尔马林10% (Sigma,Germany)中固定,稍后为了FFPET (Leica 1020,Germany)加工。随后在切片机 (Leica RM2235,Germany)中切出4μm石蜡切片。在Leica自动染色仪 (Leica ST5010,Germany)中遵循制造商的方案用抗小鼠CD3 (Diagnostic Biosystem,Germany)实施小鼠CD3免疫组织化学。用Olympus扫描仪扫描图像。用Definiens软件 (Definiens,Germany)实施muCD3阳性T细胞的量化。通过单向ANOVA用多重比较检验分析统计学。早至在第一次疗法施用之后,在第4天,就在PD1-IL2v治疗组中检测到CD3阳性T细胞数目与媒介组相比显著增多。还在鼠替代物PD1和鼠替代物FAP-IL2v的组合中看见CD3阳性细胞就媒介而言增多的趋势,但是不显著。图18A和18B显示PD1-IL2v在第一次疗法之后引发胰腺肿瘤中的CD3浸润与所有组相比增多。

[0409] 图19显示针对抗小鼠PD1染色的胰腺肿瘤的免疫组织化学图像的结果。在自指定治疗组衍生的Black 6小鼠胰腺肿瘤上实施PD1阳性T细胞的免疫组织化学染色。为了免疫组织化学染色制备组织样品:在施用处理后自动收获肿瘤,在福尔马林10% (Sigma,Germany)中固定,稍后为了FFPET (Leica1020,Germany)加工。随后在切片机 (Leica RM2235,Germany)中切出4μm石蜡切片。在Leica自动染色仪 (Leica ST5010,Germany)中遵

循制造商的方案用抗小鼠PD1 (R&D System, Germany) 实施小鼠PD1免疫组织化学。用Olympus扫描仪扫描图像。早至在第一次疗法施用之后, 在第4天, 就在PD1-IL2v治疗组中检测到PD1阳性T细胞数目与媒介组相比的很高增多。还在鼠替代物PD1和鼠替代物FAP-IL2v的组合中看见PD1阳性细胞与媒介相比的中等增多。图19显示PD1-IL2v在第一次疗法之后4天引发胰腺肿瘤中的PD1阳性T细胞浸润与所有组相比增多。

[0410] 图20显示针对抗小鼠ICOS染色的胰腺肿瘤的免疫组织化学图像的结果。在自指定治疗组衍生的Black 6小鼠胰腺肿瘤上实施ICOS阳性T细胞的免疫组织化学染色。为了免疫组织化学染色制备组织样品: 在施用处理后自动收获肿瘤, 在福尔马林10% (Sigma, Germany) 中固定, 稍后为了FFPET (Leica1020, Germany) 加工。随后在切片机 (Leica RM2235, Germany) 中切出4 $\mu$ m石蜡切片。在Leica自动染色仪 (Leica ST5010, Germany) 中遵循制造商的方案用抗小鼠ICOS (My Biosource, Germany) 实施小鼠ICOS免疫组织化学。用Olympus扫描仪扫描图像。早至在第一次疗法施用之后, 在第4天, 就在PD1-IL2v治疗组中检测到ICOS阳性T细胞数目与媒介组相比减少。图20显示PD1-IL2v在第一次疗法之后4天引发胰腺肿瘤中的ICOS阳性T细胞浸润与所有组相比减少。

[0411] 实施例7

[0412] 作为单一药剂和组合与PD1和FAP-IL2v抗体(两种不同剂量)比较PD1-IL2v免疫缀合物在小鼠肿瘤细胞系的同系模型中的体内功效

[0413] 在一种同系模型中与鼠替代物PD1加鼠替代物FAP-IL2v组合(两种不同剂量)比较对PD1-IL2v免疫缀合物测试它的抗肿瘤功效。所使用的同系模型是Panc02-Fluc胰腺同系模型。在胰腺内注射入Black 6小鼠的小鼠胰腺Panc02-Fluc转染子细胞系中测试鼠替代物PD1-IL2v免疫缀合物。Panc02-H7细胞(小鼠胰腺癌)最初自MD Anderson癌症中心(Texas, USA)获得并在扩充后保藏于Roche-Glycart内部细胞库。Panc02-H7-Fluc细胞系通过钙转染和亚克隆技术内部生成。在含有10% FCS (Sigma), 500 $\mu$ g/ml潮霉素和1% Glutamax的RPMI培养基中培养Panc02-H7-Fluc。在5% CO<sub>2</sub>的水饱和气氛中于37 $^{\circ}$ C培养细胞。将第16代用于移植。细胞存活力是83.3%。使用0.3ml结核菌素注射器(BD Biosciences, Germany)将1 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞每只动物注射入小鼠的胰腺。为此, 在麻醉的Black 6小鼠的左腹部位做一小切口。打开腹膜壁并用钳子小心分离胰腺。在胰尾中注射10 $\mu$ l (RPMI培养基中的1 $\times$ 10<sup>5</sup>个Panc02-H7-Fluc细胞)细胞悬浮液。使用5/0可分解缝合线关闭腹膜壁和皮肤伤口。

[0414] 依照承诺的指南(GV-Solas; Felasa; TierschG)以12小时光亮/12小时黑暗的日周期在无特定病原体条件下维持实验开始时10-12周龄的雌性Black 6小鼠(Charles Rivers, Lyon, France)。实验性研究方案得到当地政府审查和批准(ZH193/2014)。到达后, 将动物维持1周以适应新环境和观察。定期进行连续健康监测。

[0415] 在研究第0天给小鼠胰腺内注射1 $\times$ 10<sup>5</sup>个Panc02-Fluc细胞, 随机化并称重。注射肿瘤细胞后1周, 给小鼠静脉内注射PD1-IL2v并与PD1+FAP-IL2v Mab的组合(两种不同剂量)比较, 一周一次, 持续三周。

[0416] 给所有小鼠静脉内注射200 $\mu$ l适宜溶液。给媒介组中的小鼠注射组氨酸缓冲液且给治疗组注射PD1-IL2v (1mg/kg), PD1 (10mg/kg) 和FAP-IL2v (0.625mg/kg或1.25mg/kg) 抗体或PD1+FAP-IL2v (10mg/kg+1.25mg/kg或10mg/kg+0.625mg/kg) 抗体的组合。为了获得适宜量的免疫缀合物每200 $\mu$ l, 在必要时依照表4用组氨酸缓冲液稀释储液。

[0417] 表4:化合物,剂量,配制缓冲液和储液浓度

化合物	剂量	配制缓冲液	储液的浓度 (mg/mL)
muPD1-IL2v	10 $\mu$ g和30 $\mu$ g	20mM 组氨酸, 140mM NaCl, 0.01% Tween20; pH6.0	3.63
muFAP-IL2v	50 $\mu$ g	20mM 组氨酸, 140mM NaCl, 0.01% Tween20; pH6.0	4.91
muPD1	200 $\mu$ g	20mM 组氨酸, 140mM NaCl, 0.01% Tween20; pH6.0	5.84

[0419] 为了通过IVIS® SPECTRUM的生物发光成像,在生物发光成像采集(BLI)前10分钟给小鼠腹膜内注射150mg/kg D-萤光素,稍后用4%异氟烷麻醉。随后,将小鼠转移入隔离室,放置入IVIS® SPECTRUM。通过采集发光信号达10-50秒来实施体内BLI采集。作为辐射率(光子)/sec/cm<sup>2</sup>/sr保存数据。用Living Image® 4.4软件实施体内BLI数据的分析并以肿瘤抑制曲线表示。

[0420] 为了通过组织学来评估免疫药效学,在第一次疗法后4天通过颈脱位处死来自选定组的3只小鼠。收获胰腺肿瘤并立即在福尔马林10%中固定。将组织在福尔马林溶液中留置过夜,稍后为了FFPET(Leica 1020,Germany)加工。随后在切片机(Leica RM2235,Germany)中切出4 $\mu$ m石蜡切片。在Leica自动染色仪(Leica ST5010,Germany)中遵循制造商的方案实施小鼠CD3,CD8,PD1和粒酶B免疫组织化学。用Olympus扫描仪扫描图像。

[0421] 图21和表5显示作为单一药剂和组合比较muPD1-IL2v与muFAP-IL2v和muPD-1抗体的功效实验的结果。将Panc02-H7-Fluc转染子胰腺癌细胞系注射入Black 6小鼠中的胰腺以研究胰腺同位同系模型中的存活。以mg/kg计给每只小鼠注射的抗体的量如下:1mg/kg muPD1-IL2v,10mg/kg muPD1和0.625或1.25mg/kg muFAP-IL2v抗体。静脉内注射抗体,每周一次,持续4周。与所有其它单一药剂和muPD-1+muFAP-IL2v的组合(在所测试的两种剂量)相比,在1mg/kg muPD1-IL2v中观察到显著卓越中值和总体存活。如此,可以得出结论,PD1-IL2v介导与所有其它单一药剂以及PD1+FAP-IL2v的组合(在所测试的两种剂量)相比卓越的就增强的中值和总体存活而言的功效。

[0422] 表5:Panc02-Fluc同系肿瘤模型中用PD1-IL2v,PD1,FAP-IL2v和PD-1和FAP-IL2v抗体的组合治疗的Black 6小鼠的中值和总体存活。

组	以天计的中值存活	与对照比较的p值	总体存活
媒介	30	1.0000	0/6
1mg/kg muPD-1-IL2v	未达到	<0.0001***	6/6
[0423] 10mg/kg muPD1 + 0.625mg/kg muFAP-IL2v	62	0.0053*	1/6
10mg/kg muPD1 + 1.25mg/kg muFAP-IL2v	86	0.0005**	0/6
0.625mg/kg muFAP-IL2v	36	0.2607	0/6
1.25mg/kg muFAP-IL2v	31	0.6834	0/6
10mg/kg muPD1	48	0.0005**	0/6

[0424] 图22显示比较muPD1-IL2v至FAP-IL2v, muPD1和它们的组合(两种不同剂量)的功效实验的结果。将Panc02-H7-Fluc转染子胰腺癌细胞系注射入Black6小鼠中的胰腺以借助生物发光研究胰腺同位同系模型中的存活。在研究的过程期间,通过IVIS® SPECTRUM在数个治疗组中检测到Panc02-Fluc生物发光信号降低,但是只有muPD1-IL2v疗法显示持续实验的整个持续时间所有小鼠中BLI信号的完全消失,指示所有6只小鼠中的完全响应。图22显示PD1-IL2v介导与所有其它单一药剂和组合组相比卓越的就降低生物发光信号(光子/秒)而言的功效。

[0425] 图23显示针对抗小鼠CD3染色的胰腺肿瘤的免疫组织化学图像的结果。在自指定治疗组衍生的Black 6小鼠胰腺肿瘤上实施CD3 T细胞的免疫组织化学染色。为了免疫组织化学染色制备组织样品:在施用处理后自动收获肿瘤,在福尔马林10% (Sigma, Germany) 中固定,稍后为了FFPET (Leica1020, Germany) 加工。随后在切片机 (Leica RM2235, Germany) 中切出4μm石蜡切片。在Leica自动染色仪 (Leica ST5010, Germany) 中遵循制造商的方案用抗小鼠CD3 (Diagnostic Biosystem, Germany) 实施小鼠CD3免疫组织化学。用Olympus扫描仪扫描图像。早至在第一次疗法施用之后,在第4天,就在muPD1-IL2v治疗组中检测到CD3阳性T细胞数目与媒介组相比的很高增多。还在所有其它治疗组中看见CD3阳性细胞与媒介相比的中等增多。图23显示PD1-IL2v在第一次疗法之后4天引发胰腺肿瘤中的CD3阳性T细胞浸润与所有组相比增多。

[0426] 图24A和24B和表6显示针对抗小鼠CD8染色的胰腺肿瘤的免疫组织化学图像(图24A)和T细胞量化分析(图24B)的结果。在自指定治疗组衍生的Black6小鼠胰腺肿瘤上实施CD8 T细胞的免疫组织化学染色。为了免疫组织化学染色制备组织样品:在施用处理后自动收获肿瘤,在福尔马林10% (Sigma, Germany) 中固定,稍后为了FFPET (Leica 1020, Germany) 加工。随后在切片机 (Leica RM2235, Germany) 中切出4μm石蜡切片。在Leica自动染色仪 (Leica ST5010, Germany) 中遵循制造商的方案用抗小鼠CD8 (Serotec, Germany) 实施小鼠CD8免疫组织化学。用Olympus扫描仪扫描图像。用Definiens软件 (Definiens, Germany) 实施muCD8阳性T细胞的量化。通过单向ANOVA用多重比较检验分析统计学。早至在第一次疗法施用之后,在第4天,就在muPD1-IL2v治疗组中检测到CD8阳性T细胞数目与所有



其它组相比显著增多。还在所测试的所有其它治疗组中看见CD8阳性细胞增多的趋势,但是不显著。如此,图24A和24B显示PD1-IL2v在第一次疗法之后4天引发胰腺肿瘤中的CD8浸润与所有组相比增多。

[0427] 表6:CD8阳性T细胞

组	CD8阳性T细胞的数目/mm <sup>2</sup>	与对照比较的p值
muPD1-IL2v 1mg/kg	4914	0.0032**
muPD1 10mg/kg	974	0.7395
[0428] muFAP-IL2v 1.25mg/kg	872	0.8066
muPD-1 10mg/kg + muFAP-IL2v 1.25mg/kg	1899	0.2703
媒介	590	1

[0429] 图25A和25B和表7显示针对抗粒酶B染色的胰腺肿瘤的免疫组织化学图像(图25A)和粒酶B标志物面积量化分析(图25B)的结果。在自指定治疗组衍生的Black 6小鼠胰腺肿瘤上实施粒酶B的免疫组织化学染色。为了免疫组织化学染色制备组织样品:在施用处理后自动收获肿瘤,在福尔马林10% (Sigma, Germany) 中固定,稍后为了FFPET (Leica 1020, Germany) 加工。随后在切片机 (Leica RM2235, Germany) 中切出4 $\mu$ m石蜡切片。在Leica自动染色仪 (Leica ST5010, Germany) 中遵循制造商的方案用抗小鼠粒酶B (Abcam, Germany) 实施小鼠粒酶B免疫组织化学。用Olympus扫描仪扫描图像。用Definiens软件 (Definiens, Germany) 实施粒酶B标志物面积的量化。通过单向ANOVA用多重比较检验分析统计学。早至在第一次疗法施用之后,在第4天,就在muPD1-IL2v治疗组中检测到粒酶B与所有其它组相比显著增多。还在所测试的所有其它治疗组中看见粒酶B标志物面积增大的趋势,但是不显著。如此,图25A和25B显示PD1-IL2v在第一次疗法之后4天引发胰腺肿瘤中的粒酶B阳性面积与所有组相比增大。

[0430] 表7:粒酶B阳性面积

组	粒酶B阳性面积的%	与对照比较的p值
muPD1-IL2v 1mg/kg	16.67	0.0006**
muPD1 10mg/kg	1.867	0.6709
[0431] muFAP-IL2v 1.25mg/kg	1.533	0.7442
muPD-1 10mg/kg + muFAP-IL2v 1.25mg/kg	2.033	0.6355
媒介	0.44	1

[0432] 图26A和26B和表8呈现针对抗小鼠PD1染色的胰腺肿瘤的免疫组织化学图像(图26A)和PD1阳性细胞量化分析(图26B)的结果。在自指定治疗组衍生的Black 6小鼠胰腺肿瘤上实施PD1细胞的免疫组织化学染色。为了免疫组织化学染色制备组织样品:在施用处理后自动收获肿瘤,在福尔马林10% (Sigma, Germany) 中固定,稍后为了FFPET (Leica 1020, Germany) 加工。随后在切片机 (Leica RM2235, Germany) 中切出4 $\mu$ m石蜡切片。在Leica

自动染色仪 (Leica ST5010, Germany) 中遵循制造商的方案用抗小鼠PD1 (Serotec, Germany) 实施小鼠PD1免疫组织化学。用Olympus扫描仪扫描图像。用Definiens软件 (Definiens, Germany) 实施muPD1阳性细胞的量化。通过单向ANOVA用多重比较检验分析统计学。早在在第一次疗法施用之后, 在第4天, 在muPD1-IL2v治疗组中检测到PD1阳性细胞的数目与所有其它组相比显著增多。还在所测试的所有其它治疗组中看见PD1阳性细胞增多的趋势, 但是不显著。如此, 图26A和26B显示PD1-IL2v在第一次疗法之后4天引发胰腺肿瘤中的PD1阳性细胞与所有组相比增多。

[0433] 表8:PD1阳性细胞

组	PD1阳性细胞的数目/mm <sup>2</sup>	与对照比较的p值
muPD1-IL2v 1mg/kg	6628	0.0004**
muPD1 10mg/kg	1582	0.5331
[0434] muFAP-IL2v 1.25mg/kg	1350	0.6705
muPD-1 10mg/kg + muFAP-IL2v 1.25mg/kg	3038	0.0803
媒介	858	1

[0435] 实施例7

[0436] 经由PD-1阻断对耗竭的病毒特异性T细胞投递IL-2v的效果

[0437] 已经作为长期暴露于病毒抗原的结果第一次描述在耗竭的病毒特异性T细胞上的PD-1表达, 而且已经将它与T细胞没有能力发起有效的抗病毒应答联系起来。能够同时分泌IL-2和IFN- $\gamma$ 的病毒特异性CD4 T细胞赋予保护免于慢性感染中的病毒再激活。事实上, 已经将CD4 T细胞的多功能签名与受到巨细胞病毒 (CMV), 埃巴二氏病毒 (EBV) 和单纯疱疹病毒 (HSV) 感染的健康个体中以及那些受到人免疫缺陷病毒 (HIV) 感染的但数年保持没有症状的个体中的病毒控制联系起来。

[0438] 因此, 我们在慢性病毒感染的背景中开发了一种体外测定法来评估PD-1靶向将突变型式的IL-2 (IL-2v) 投递至功能障碍性抗原特异性T细胞的效果。为了避免限制对于我们的测定法合适的供体的量, 鉴于大约80%的群体是CMV血清阳性的, 我们选择一种CMV免疫原性病毒蛋白 (pp65) 作为用于T细胞的回忆抗原。因此, 我们在我们的构建物以10 $\mu$ g/ml的浓度存在下用CMV-pp65 (Miltenyi) 刺激健康人供体外周血单个核细胞 (PBMC)。43小时后我们通过添加Golgi Plug (BD Bioscience, 布雷菲德菌素A) 和Golgi Stop (BD Bioscience, 莫能菌素) 并将细胞于37 $^{\circ}$ C温育另外5小时来阻断来自高尔基体的蛋白质转运。然后, 清洗细胞, 在表面上用抗人CD3, CD4, CD8, CD62L和CD45RO抗体染色, 之后用FoxP3转录因子染色缓冲液套组 (eBioscience) 固定/透化。最后, 我们针对IL-2, IFN- $\gamma$  和Ki67 (均来自eBioscience) 实施细胞内染色以测量细胞增殖。

[0439] 图27显示CD4 T细胞在单独的抗PD-1, 与IL-2v组合, 或作为融合蛋白存在下用CMV免疫原性蛋白pp65回忆48小时后分泌IL-2 (A), IL-2和IFN- $\gamma$  (B) 或IFN- $\gamma$  (C) 和增殖 (D) 的能力。与用pp65和抗PD1处理的样品相比, 我们观察到PD1-IL2v能力中提高多功能性CD4 T细胞的频率, 能够共分泌IL-2和IFN- $\gamma$  的趋势 (图27B), 和IFN- $\gamma$  单一分泌群体的显著增多

(图27C)。相反,pp65和非靶向性IL-2v(DP47-IL2v)的组合提高IL-2单功能性CD4 T细胞的频率(图27A)。正如预期的,所有用靶向性或非靶向性IL-2v处理的细胞均增殖,如通过Ki67染色阳性指示的。

[0440] 图28显示在单独的抗PD-1,与IL-2v组合,或作为融合蛋白存在下用CMV免疫原性蛋白pp65回忆48小时后分泌IFN- $\gamma$ 的病毒特异性CD4 T细胞的分化状态(遵照CD45RO和CD62L的表达)。扩充的IFN- $\gamma$ 分泌性病毒特异性CD4 T细胞的表型表征(图28)揭示效应-记忆(CD45RO+CD62L-)概况。我们能得出结论,经由PD1-IL2v融合蛋白将IL-2v投递至耗竭的CMV特异性CD4 T细胞导致以已分化的记忆概况和分泌IL-2和IFN- $\gamma$ 二者的能力为特征的长命保护性病毒特异性群体扩充。

[0441] 实施例8

[0442] 实施例8A:供体1和2的细胞激活(pSTAT5测定法)

[0443] 在温热的培养基(RPMI1640,10% FCS,2mM谷氨酰胺)中将来自健康供体的新鲜分离的PBMC接种入96孔圆底板(200'000个细胞/孔)。将板以300g离心10分钟并去除上清液。在50 $\mu$ l含有IL2分子的培养基中重悬浮细胞并于37 $^{\circ}$ C刺激20分钟。为了保持磷酸化状态,在用等量的预温热的Cytotfix缓冲液(554655,BD Bioscience)于37 $^{\circ}$ C刺激10分钟后立即固定细胞。之后,将板以300g离心10分钟并去除上清液。为了容许细胞内染色,将细胞在200 $\mu$ lPhosflow透化缓冲液III(558050,BD Bioscience)中于4 $^{\circ}$ C透化30分钟。然后,将细胞用150 $\mu$ l冷的FACS缓冲液清洗两次并在两个96孔圆底板中分拆并将每个用20 $\mu$ l抗体混合物I或II在冰箱中染色60分钟。使用抗体混合物I来染色CD4T细胞和调节性T细胞中的pSTAT5并使用抗体混合物II来染色CD8 T细胞和NK细胞中的pSTAT5。之后,将细胞用FACS缓冲液清洗两次并在200 $\mu$ l/孔含有2% PFA的FACS缓冲液中重悬浮。使用BD Fortessa流式细胞仪实施分析。

[0444] 使用依照表9和表10的FACS抗体混合物。

[0445] 表9:FACS抗体混合物I(CD4 T细胞和调节性T细胞)

抗体	体积/样品
CD4 PE/Cy7, 克隆SK3, 小鼠IgG1, $\kappa$ (557852, BD Bioscience)	0.5 $\mu$ l/孔
CD25 APC, 克隆M-A251, 小鼠IgG1, $\kappa$ (356110, BioLegend)	4 $\mu$ l/孔
PE小鼠抗人FoxP3克隆259D/C7 (560046, BD Bioscience)	1 $\mu$ l/孔
A488 pSTAT5 (pY694), 克隆47, 小鼠IgG1 (562075, BD Bioscience)	1 $\mu$ l/孔

[0447] 表10:FACS抗体混合物II(CD8 T细胞和NK细胞)

抗体	体积/样品
CD3 PE/Cy7, 克隆UCHT1, 小鼠IgG1, $\kappa$ (300420, BioLegend)	1 $\mu$ l/孔
CD56APC, 克隆HCD56, 小鼠IgG1, $\kappa$ (318310, BioLegend)	1 $\mu$ l/孔
CD8 PE, 克隆HIT8a, 小鼠IgG1 (555635, BD Bioscience)	1 $\mu$ l/孔
A488pSTAT5 (pY694), 克隆47, 小鼠IgG1 (BD Bioscience)	1 $\mu$ l/孔

[0449] 图29显示用PD1-IL2v,FAP-IL2v和FAP-IL2wt处理供体1的静息的PBMC后CD8 T细

胞(A),NK细胞(B),CD4 T细胞(C)和调节性T细胞(D)中的STAT5磷酸化。所有三种测试的分子对CD8 T细胞,NK细胞和CD4 T细胞(排除Treg)同等有力。FAP-IL2wt在诱导Treg中的STAT5磷酸化方面更加有力,后面是PD1-IL2v。FAP-IL2v具有最低的对Treg的活性。

[0450] 图30显示用FAP-IL2v,PD1-IL2c,FAP-IL2wt和PD1-TIM3-IL2v处理供体2的静息的PBMC后CD4 T细胞(A),CD8 T细胞(B),调节性T细胞(C)和NK细胞(D)中的STAT5磷酸化。所有四种测试的分子对CD8 T细胞,NK细胞和CD4 T细胞(排除Treg)的活性相当。FAP-IL2wt在诱导Treg中的STAT5磷酸化方面更加有力,后面是PD1-IL2v。FAP-IL2v具有最低的对Treg的活性。

[0451] 实施例8B:供体3和4的细胞激活(pSTAT5测定法)

[0452] 融化自健康供体分离的冷冻的PBMC并于37°C培养过夜。次日,在温热的培养基(RPMI1640,10% FCS,2mM谷氨酰胺)中将细胞接种入96孔圆底板(200'000个细胞/孔)。将板以300g离心10分钟并去除上清液。在50μl含有IL2分子的培养基中重悬浮细胞并于37°C刺激20分钟。为了保持磷酸化状态,在用等量的预温热的Cytotfix缓冲液(554655, BD Bioscience)于37°C刺激10分钟后立即固定细胞。之后,将板以300g离心10分钟并去除上清液。为了容许细胞内染色,将细胞在200μl Phosflow透化缓冲液III(558050, BD Bioscience)中于4°C透化30分钟。然后,将细胞用150μl冷的FACS缓冲液清洗两次并在两个96孔圆底板中分拆并将每个用20μl抗体混合物I或II在冰箱中染色60分钟。使用抗体混合物I来染色CD4 T细胞和调节性T细胞中的pSTAT5并使用抗体混合物II来染色CD8 T细胞和NK细胞中的pSTAT5。之后,将细胞用FACS缓冲液清洗两次并在200μl/孔含有2% PFA的FACS缓冲液中重悬浮。使用BD Fortessa流式细胞仪实施分析。使用依照表11和表12的FACS抗体混合物。

[0453] 表11:FACS抗体混合物I(CD4 T细胞和调节性T细胞)

抗体	体积/样品
CD4 PE/Cy7, 克隆SK3, 小鼠IgG1, κ (557852, BD Bioscience)	0.5μl/孔
CD25 APC, 克隆M-A251, 小鼠IgG1, κ (356110, BioLegend)	4μl/孔
PE 小鼠抗人FoxP3 克隆 259D/C7 (560046, BD Bioscience)	1μl/孔
A488 pSTAT5 (pY694), 克隆47, 小鼠IgG1 (562075, BD Bioscience)	1μl/孔

[0455] 表12:FACS抗体混合物II(CD8 T细胞和NK细胞)

抗体	体积/样品
CD3 PE/Cy7, 克隆UCHT1, 小鼠IgG1, κ (300420, BioLegend)	1μl/孔
CD56APC, 克隆HCD56, 小鼠IgG1, κ (318310, BioLegend)	1μl/孔
CD8 PE, 克隆HIT8a, 小鼠IgG1 (555635, BD Bioscience)	1μl/孔
A488pSTAT5 (pY694), 克隆47, 小鼠IgG1 (BD Bioscience)	1μl/孔

[0457] 图31显示用FAP-IL2v,PD1-IL2v,FAP-IL2wt,PD1-TIM3-IL2v处理供体3的静息的PBMC后CD8 T细胞(A),NK细胞(B),CD4 T细胞(C)和调节性T细胞(D)中的STAT5磷酸化。所有四种测试的分子对CD8 T细胞,NK细胞和CD4 T细胞(排除Treg)的活性相当。FAP-IL2wt在诱

导Treg中的STAT5磷酸化方面更加有力,后面是PD1-IL2v。FAP-IL2v具有最低的对Treg的活性。

[0458] 图32显示用FAP-IL2v,PD1-IL2v,FAP-IL2wt,PD1-TIM3-IL2v处理供体4的静息的PBMC后CD8 T细胞(A),NK细胞(B),CD4 T细胞(C)和调节性T细胞(D)中的STAT5磷酸化。所有四种测试的分子对CD8 T细胞,NK细胞和CD4 T细胞(排除Treg)的活性相当。FAP-IL2wt在诱导Treg中的STAT5磷酸化方面更加有力,后面是PD1-IL2v。FAP-IL2v具有最低的对Treg的活性。

[0459] 本发明的方面

[0460] 1.一种免疫缀合物,其包含(i)结合PD-1的抗体和(ii)经由IL-2R $\beta$   $\gamma$ 发信号的多肽,特别是IL-2多肽或IL-15多肽。

[0461] 2.依照方面1的免疫缀合物,其中该IL-2多肽是突变体IL-2多肽,其中该突变体IL-2多肽是包含氨基酸替代F42A,Y45A和L72G(编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO:19)的人IL-2分子。

[0462] 3.依照方面1的免疫缀合物,其中该IL-2多肽是突变体IL-2多肽,其中该突变体IL-2多肽是包含氨基酸替代F42A,Y45A和L72G(编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO:19)的人IL-2分子;且

[0463] 其中该抗体包含(a)重链可变区(VH),其包含包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3,和在依照Kabat编号方式的位置71-73处包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的FR-H3,和(b)轻链可变区(VL),其包含包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3。

[0464] 4.依照方面1的免疫缀合物,其中该IL-2多肽是突变体IL-2多肽,其中该突变体IL-2多肽是包含氨基酸替代F42A,Y45A和L72G(编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO:19)的人IL-2分子;且

[0465] 其中该抗体包含(a)重链可变区(VH),其包含包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3,和(b)轻链可变区(VL),其包含包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L3。

[0466] 5.依照方面1的免疫缀合物,其中该IL-2多肽是突变体IL-2多肽,其中该突变体IL-2多肽是包含氨基酸替代F42A,Y45A和L72G(编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO:19)的人IL-2分子;且

[0467] 其中该抗体包含(a)包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区(VH),和(b)包含与选自SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,和SEQ ID NO:18组成的组的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0468] 6.方面2至5任一项的免疫缀合物,其中该突变体IL-2多肽进一步包含氨基酸替代T3A和/或氨基酸替代C125A。

[0469] 7.方面2至6任一项的免疫缀合物,其中该突变体IL-2多肽包含SEQ ID NO:20的序列。

- [0470] 8. 方面2至7任一项的免疫缀合物,其中该免疫缀合物包含不多于一条突变体IL-2多肽。
- [0471] 9. 方面2至8任一项的免疫缀合物,其中该抗体包含由第一和第二亚基构成的Fc域。
- [0472] 10. 方面9的免疫缀合物,其中该Fc域是IgG类,特别是IgG1亚类Fc域。
- [0473] 11. 方面9或10的免疫缀合物,其中该Fc域是人Fc域。
- [0474] 12. 方面2至11任一项的免疫缀合物,其中该抗体是IgG类,特别是IgG1亚类免疫球蛋白。
- [0475] 13. 方面9至12任一项的免疫缀合物,其中该Fc域包含促进Fc域的第一和第二亚基联合的修饰。
- [0476] 14. 方面9至13任一项的免疫缀合物,其中在该Fc域的第一亚基的CH3域中氨基酸残基用具有更大侧链体积的氨基酸残基替换,由此在该第一亚基的CH3域内生成隆起,其可放置在第二亚基的CH3域内的空腔中,且在该Fc域的第二亚基的CH3域中氨基酸残基用具有更小侧链体积的氨基酸残基替换,由此在该第二亚基的CH3域内生成空腔,在其内可放置第一亚基的CH3域内的隆起。
- [0477] 15. 方面9至14任一项的免疫缀合物,其中在该Fc域的第一亚基中位置366处的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W),且在该Fc域的第二亚基中位置407处的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V)且任选地位置366处的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且位置368处的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L368A)(编号方式依照Kabat EU索引)。
- [0478] 16. 方面15的免疫缀合物,其中在该Fc域的第一亚基中另外位置354处的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换(S354C)或位置356处的谷氨酸残基用半胱氨酸残基替换(E356C),且在该Fc域的第二亚基中另外位置349处的酪氨酸残基用半胱氨酸残基替换(Y349C)(编号方式依照Kabat EU索引)。
- [0479] 17. 方面9至16任一项的免疫缀合物,其中该突变体IL-2多肽在它的氨基末端氨基酸处与该Fc域的亚基之一,特别是该Fc域的第一亚基的羧基末端氨基酸融合,任选地经由接头肽。
- [0480] 18. 方面17的免疫缀合物,其中该接头肽具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列。
- [0481] 19. 方面9至17任一项的免疫缀合物,其中该Fc域包含一处或多处降低对Fc受体,特别是Fc $\gamma$ 受体的结合,和/或效应器功能,特别是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的氨基酸替代。
- [0482] 20. 方面19的免疫缀合物,其中所述一处或多处氨基酸替代在一个或多个选自L234,L235,和P329(Kabat EU索引编号方式)的组的位置处。
- [0483] 21. 方面9至20任一项的免疫缀合物,其中该Fc域的每个亚基包含氨基酸替代L234A,L235A和P329G(Kabat EU索引编号方式)。
- [0484] 22. 方面2至21任一项的免疫缀合物,其包含包含与SEQ ID NO:22的序列至少约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的多肽,包含与SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24的序列至少约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的多肽,和包含与SEQ ID NO:25的序列至少约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的多肽。

- [0485] 23. 方面2至22任一项的免疫缀合物,其本质上由通过接头序列连接的突变体IL-2多肽和IgG1免疫球蛋白分子组成的。
- [0486] 24. 一种或多种分离的多核苷酸,其编码方面2至23任一项的免疫缀合物。
- [0487] 25. 一种或多种载体,特别是表达载体,包含方面24的多核苷酸。
- [0488] 26. 一种宿主细胞,其包含方面24的多核苷酸或方面25的载体。
- [0489] 27. 一种生成包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物的方法,其包含(a)在适合于表达该免疫缀合物的条件下培养方面25的宿主细胞,并任选地(b)回收该免疫缀合物。
- [0490] 28. 一种包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物,其是通过方面27的方法生成的。
- [0491] 29. 一种药学组合物,其包含方面2至23或28任一项的免疫缀合物和药学可接受载体。
- [0492] 30. 方面2至23或28任一项的免疫缀合物,其用作药物。
- [0493] 31. 方面2至23或28任一项的免疫缀合物,其用于治疗疾病。
- [0494] 32. 方面31的用于治疗疾病的免疫缀合物,其中所述疾病是癌症。
- [0495] 33. 方面2至23或28任一项的免疫缀合物在制造用于治疗疾病的药物中的用途。
- [0496] 34. 方面33的用途,其中所述疾病是癌症。
- [0497] 35. 一种治疗个体中的疾病的方法,其包含对所述个体施用治疗有效量的包含处于药学可接受形式的方面2至23或28任一项的免疫缀合物的组合物。
- [0498] 36. 方面35的方法,其中所述疾病是癌症。
- [0499] 37. 一种刺激个体的免疫系统的方法,其包含对所述个体施用有效量的包含处于药学可接受形式的方面2至23或28任一项的免疫缀合物的组合物。
- [0500] 38. 如说明书中描述的本发明。
- [0501] 本发明的别的方面
- [0502] 1. 一种包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物,其中该突变体IL-2多肽是包含氨基酸替代F42A, Y45A和L72G(编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO:19)的人IL-2分子。
- [0503] 2. 一种包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物,其中该突变体IL-2多肽是包含氨基酸替代F42A, Y45A和L72G(编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO:19)的人IL-2分子;且
- [0504] 其中该抗体包含(a)重链可变区(VH),其包含包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3,和在依照Kabat编号方式的位置71-73处包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的FR-H3,和(b)轻链可变区(VL),其包含包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3。
- [0505] 3. 一种包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物,其中该突变体IL-2多肽是包含氨基酸替代F42A, Y45A和L72G(编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO:19)的人IL-2分子;且
- [0506] 其中该抗体包含(a)重链可变区(VH),其包含包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的

HVR-H1, 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H2, 和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3, 和(b)轻链可变区(VL), 其包含包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-L1, 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L2, 和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L3。

[0507] 4. 一种包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物, 其中该突变体IL-2多肽是包含氨基酸替代F42A, Y45A和L72G(编号方式相对于人IL-2序列SEQ ID NO:19)的人IL-2分子; 且

[0508] 其中该抗体包含(a)包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少约95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区(VH), 和(b)包含与选自SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, 和SEQ ID NO:18组成的组的氨基酸序列至少约95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0509] 5. 方面1至4任一项的免疫缀合物, 其中该突变体IL-2多肽进一步包含氨基酸替代T3A和/或氨基酸替代C125A。

[0510] 6. 方面1至5任一项的免疫缀合物, 其中该突变体IL-2多肽包含SEQ ID NO:20的序列。

[0511] 7. 方面1至6任一项的免疫缀合物, 其中该免疫缀合物包含不多于一条突变体IL-2多肽。

[0512] 8. 方面1至7任一项的免疫缀合物, 其中该抗体包含由第一和第二亚基构成的Fc域。

[0513] 9. 方面8的免疫缀合物, 其中该Fc域是IgG类, 特别是IgG<sub>1</sub>亚类Fc域。

[0514] 10. 方面8或9的免疫缀合物, 其中该Fc域是人Fc域。

[0515] 11. 方面1至10任一项的免疫缀合物, 其中该抗体是IgG类, 特别是IgG<sub>1</sub>亚类免疫球蛋白。

[0516] 12. 方面8至11任一项的免疫缀合物, 其中该Fc域包含促进Fc域的第一和第二亚基联合的修饰。

[0517] 13. 方面8至12任一项的免疫缀合物, 其中在该Fc域的第一亚基的CH3域中氨基酸残基用具有更大侧链体积的氨基酸残基替换, 由此在该第一亚基的CH3域内生成隆起, 其可放置在第二亚基的CH3域内的空腔中, 且在该Fc域的第二亚基的CH3域中氨基酸残基用具有更小侧链体积的氨基酸残基替换, 由此在该第二亚基的CH3域内生成空腔, 在其内可放置第一亚基的CH3域内的隆起。

[0518] 14. 方面8至13任一项的免疫缀合物, 其中在该Fc域的第一亚基中位置366处的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W), 且在该Fc域的第二亚基中位置407处的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V)且任选地位置366处的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且位置368处的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L368A)(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0519] 15. 方面14的免疫缀合物, 其中在该Fc域的第一亚基中另外位置354处的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换(S354C)或位置356处的谷氨酸残基用半胱氨酸残基替换(E356C), 且在该Fc域的第二亚基中另外位置349处的酪氨酸残基用半胱氨酸残基替换(Y349C)(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0520] 16. 方面8至15任一项的免疫缀合物, 其中该突变体IL-2多肽在它的氨基末端氨基酸处与该Fc域的亚基之一, 特别是该Fc域的第一亚基的羧基末端氨基酸融合, 任选地经由



接头肽。

[0521] 17. 方面16的免疫缀合物,其中该接头肽具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

[0522] 18. 方面8至16任一项的免疫缀合物,其中该Fc域包含一处或多处降低对Fc受体,特别是Fc $\gamma$ 受体的结合,和/或效应器功能,特别是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的氨基酸替代。

[0523] 19. 方面18的免疫缀合物,其中所述一处或多处氨基酸替代在一个或多个选自L234,L235,和P329(Kabat EU索引编号方式)的组的位置处。

[0524] 20. 方面8至19任一项的免疫缀合物,其中该Fc域的每个亚基包含氨基酸替代L234A,L235A和P329G(Kabat EU索引编号方式)。

[0525] 21. 权利要求1至20任一项的免疫缀合物,其包含包含与SEQ ID NO:22的序列至少约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的多肽,包含与SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24的序列至少约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的多肽,和包含与SEQ ID NO:25的序列至少约80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的多肽。

[0526] 22. 方面1至21任一项的免疫缀合物,其本质上由通过接头序列连接的突变体IL-2多肽和IgG<sub>1</sub>免疫球蛋白分子组成。

[0527] 23. 一种或多种分离的多核苷酸,其编码方面1至22任一项的免疫缀合物。

[0528] 24. 一种或多种载体,特别是表达载体,其包含方面23的多核苷酸。

[0529] 25. 一种宿主细胞,其包含方面23的多核苷酸或方面24的载体。

[0530] 26. 一种生成包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物的方法,其包含(a)在适合于表达该免疫缀合物的条件下培养方面25的宿主细胞,并任选地(b)回收该免疫缀合物。

[0531] 27. 一种包含突变体IL-2多肽和结合PD-1的抗体的免疫缀合物,其是通过方面26的方法生成的。

[0532] 28. 一种药学组合物,其包含方面1至22或27任一项的免疫缀合物和药学可接受载剂。

[0533] 29. 方面1至22或27任一项的免疫缀合物,其用作药物。

[0534] 30. 方面1至22或27任一项的免疫缀合物,其用于治疗疾病。

[0535] 31. 方面30的用于治疗疾病的免疫缀合物,其中所述疾病是癌症。

[0536] 32. 方面1至22或27任一项的免疫缀合物在制造用于治疗疾病的药物中的用途。

[0537] 33. 方面32的用途,其中所述疾病是癌症。

[0538] 34. 一种治疗个体中的疾病的方法,其包含对所述个体施用治疗有效量的包含处于药学可接受形式的方面1至22或27任一项的免疫缀合物的组合物。

[0539] 35. 方面34的方法,其中所述疾病是癌症。

[0540] 36. 一种刺激个体的免疫系统的方法,其包含对所述个体施用有效量的包含处于药学可接受形式的方面1至22或27任一项的免疫缀合物的组合物。

[0541] 37. 本文中上文描述的发明。

[0542] \*\*\*

[0543] 虽然出于清楚理解的目的,前述发明已经作为例示和例子较为详细地进行了描

述,但是说明书和实施例不应解释为限制本发明的范围。通过援引明确将本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容完整收录。

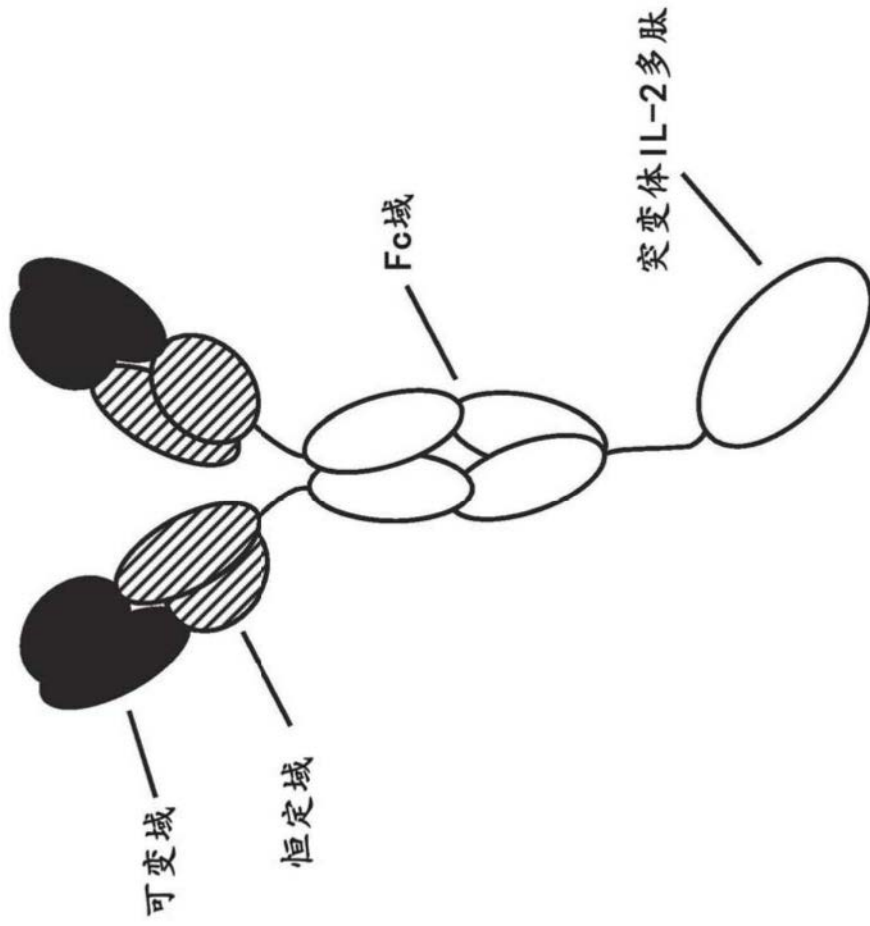


图1

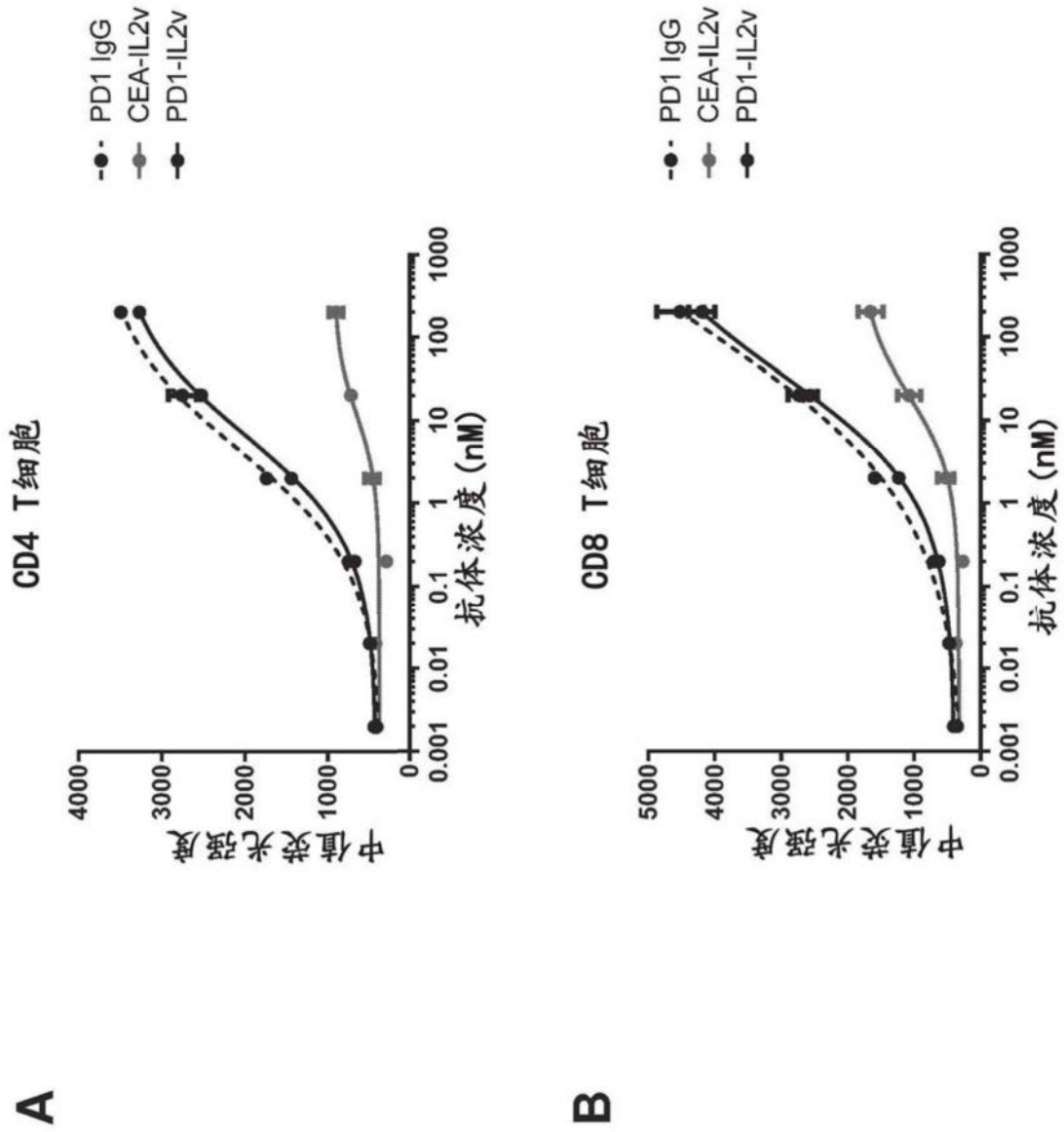


图2

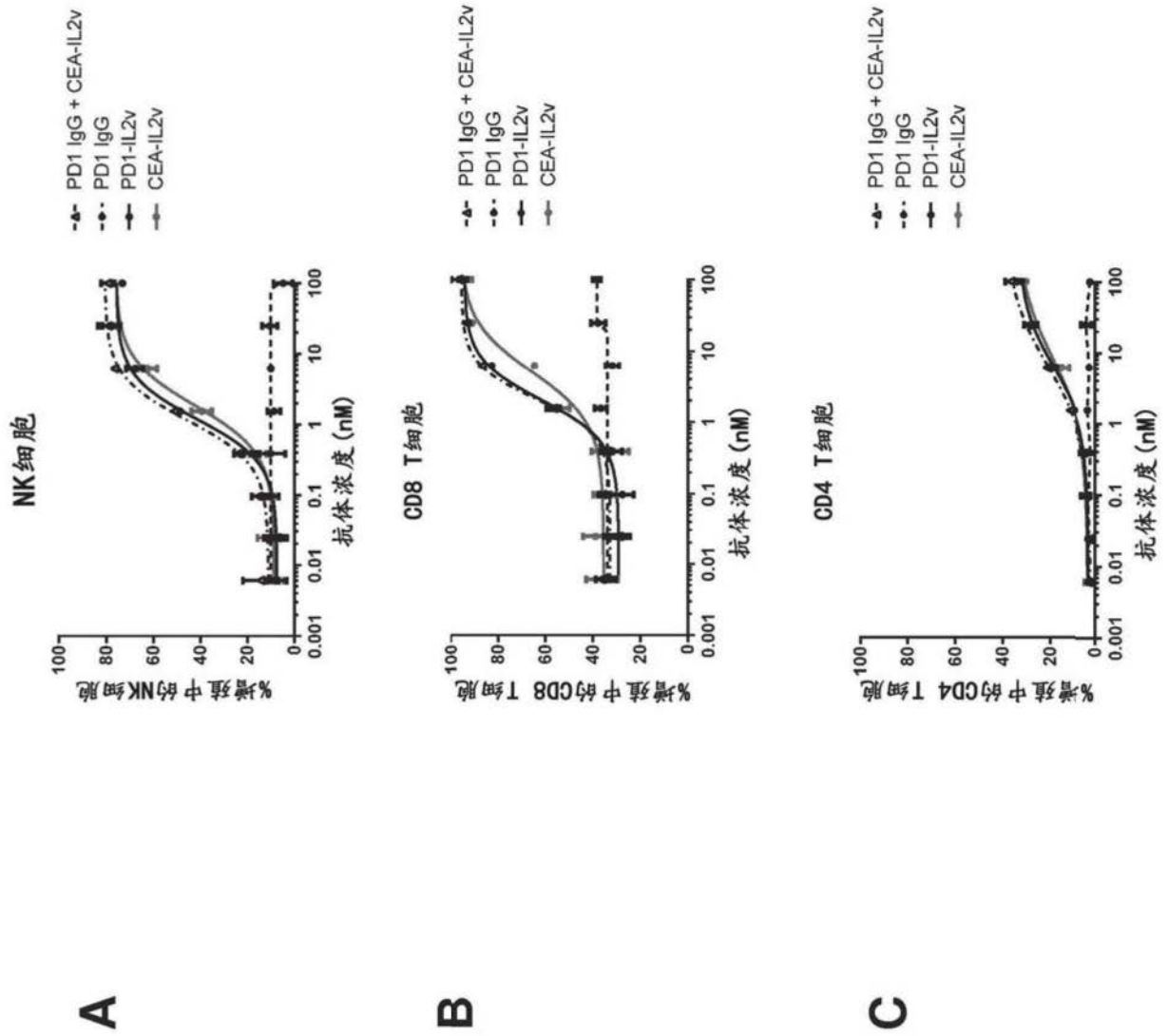


图3

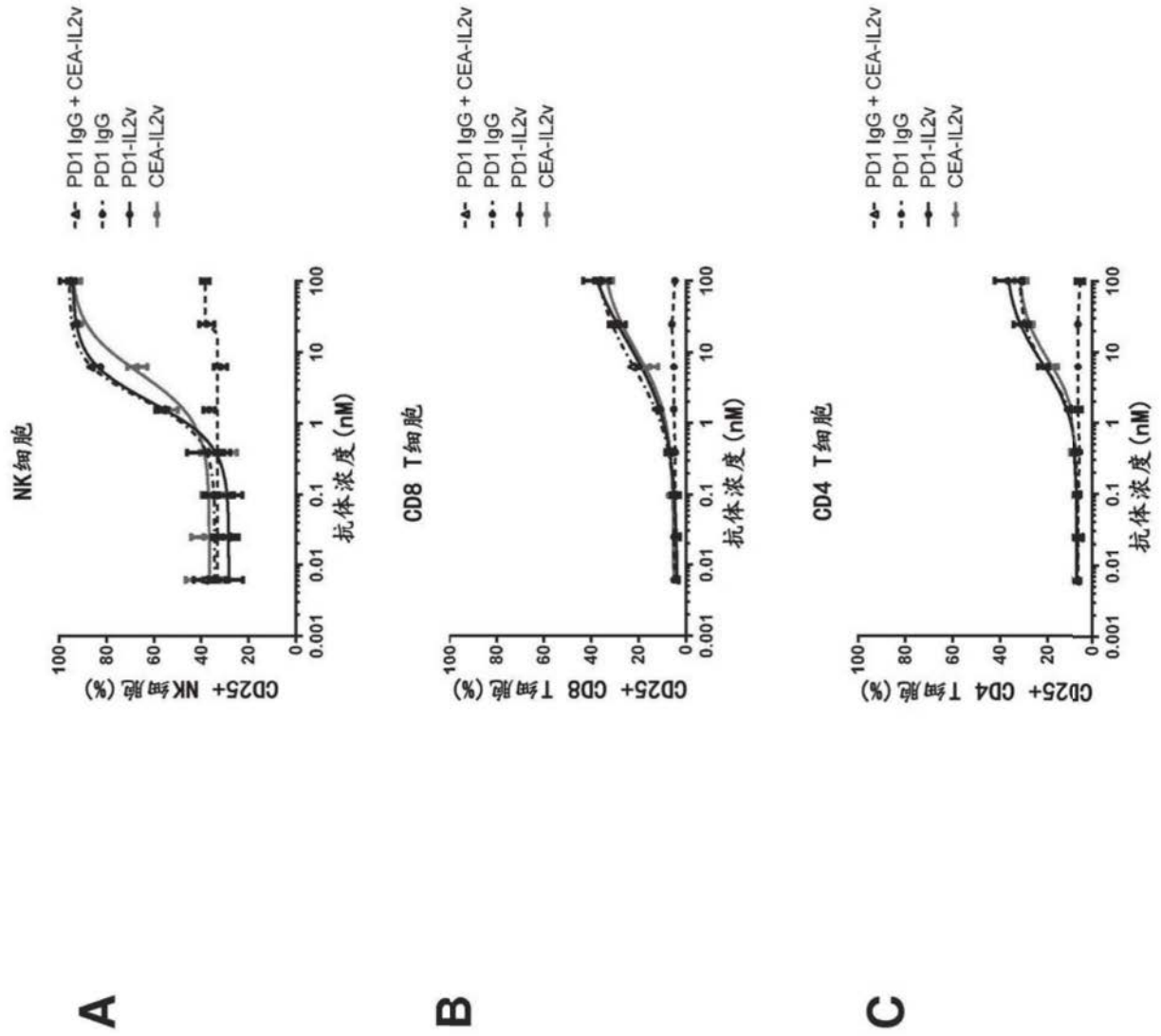


图4

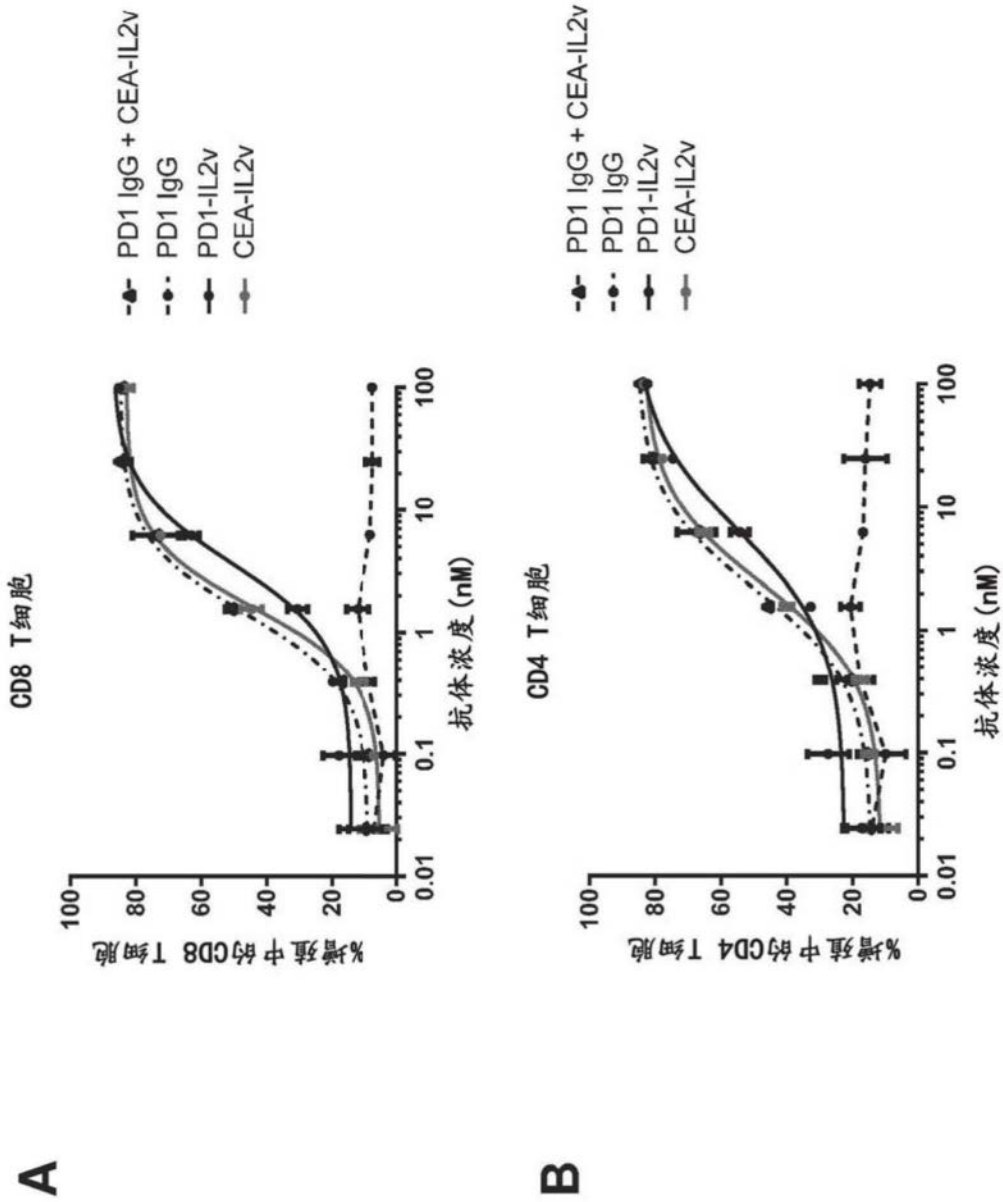


图5

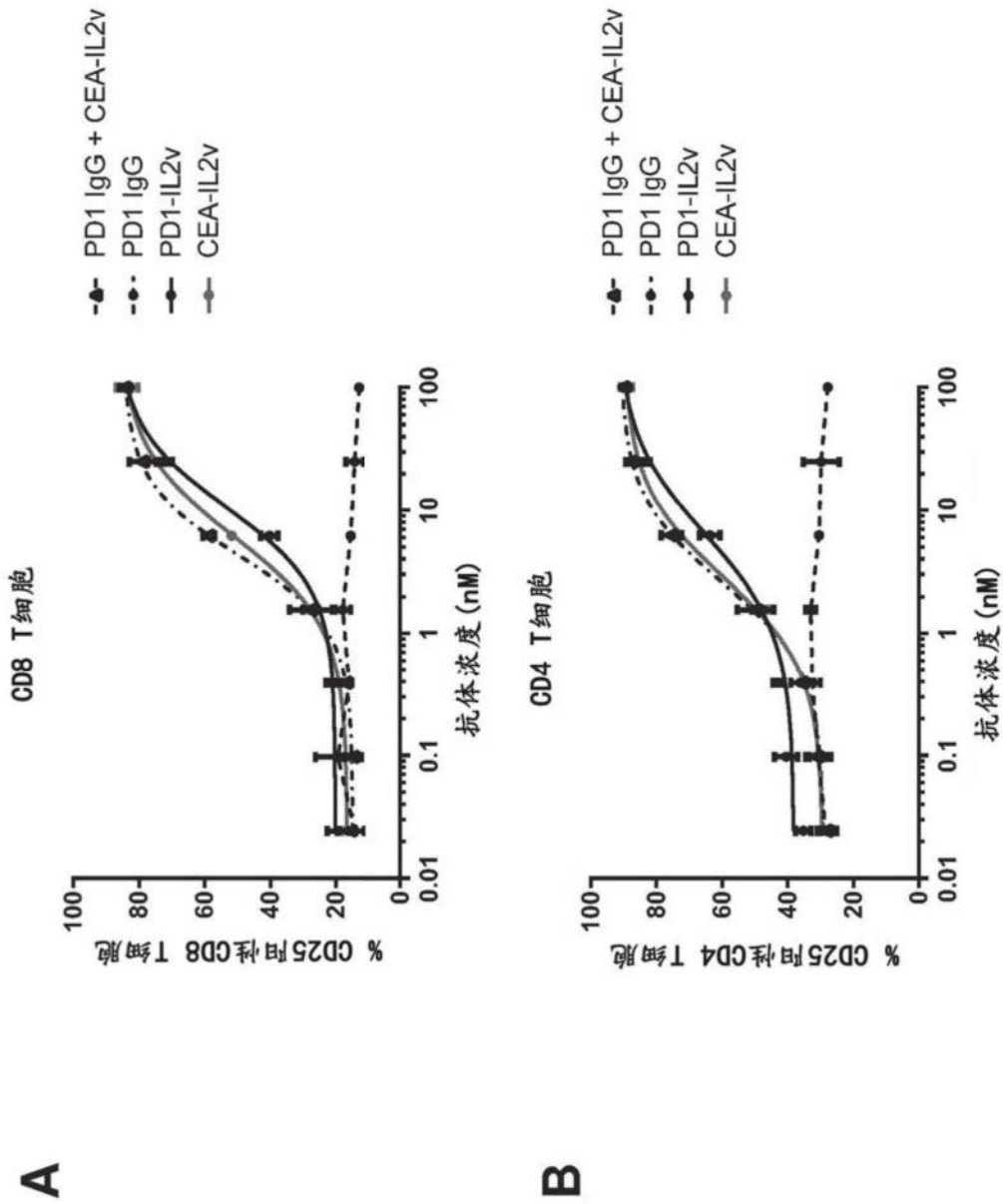


图6



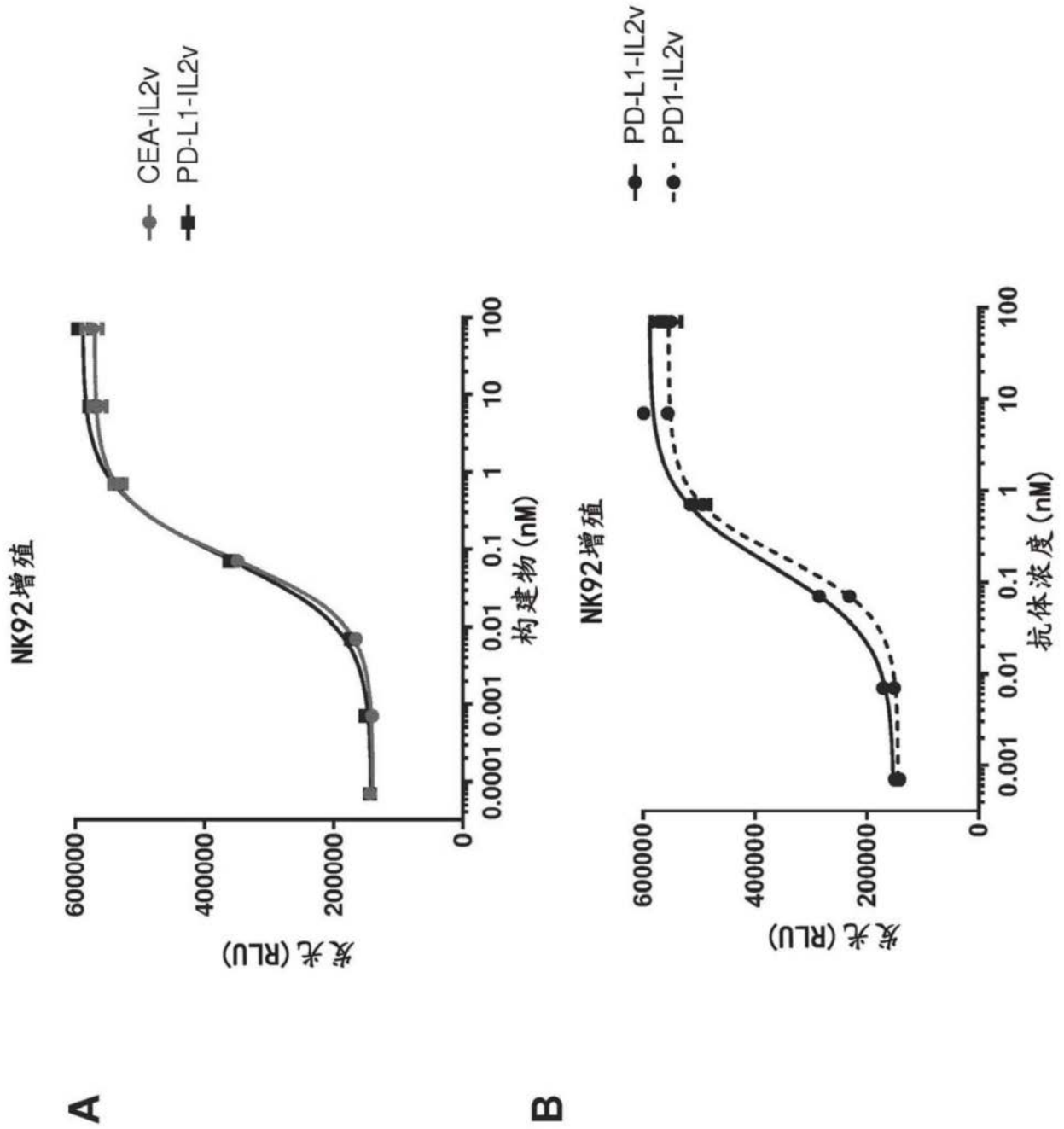


图7

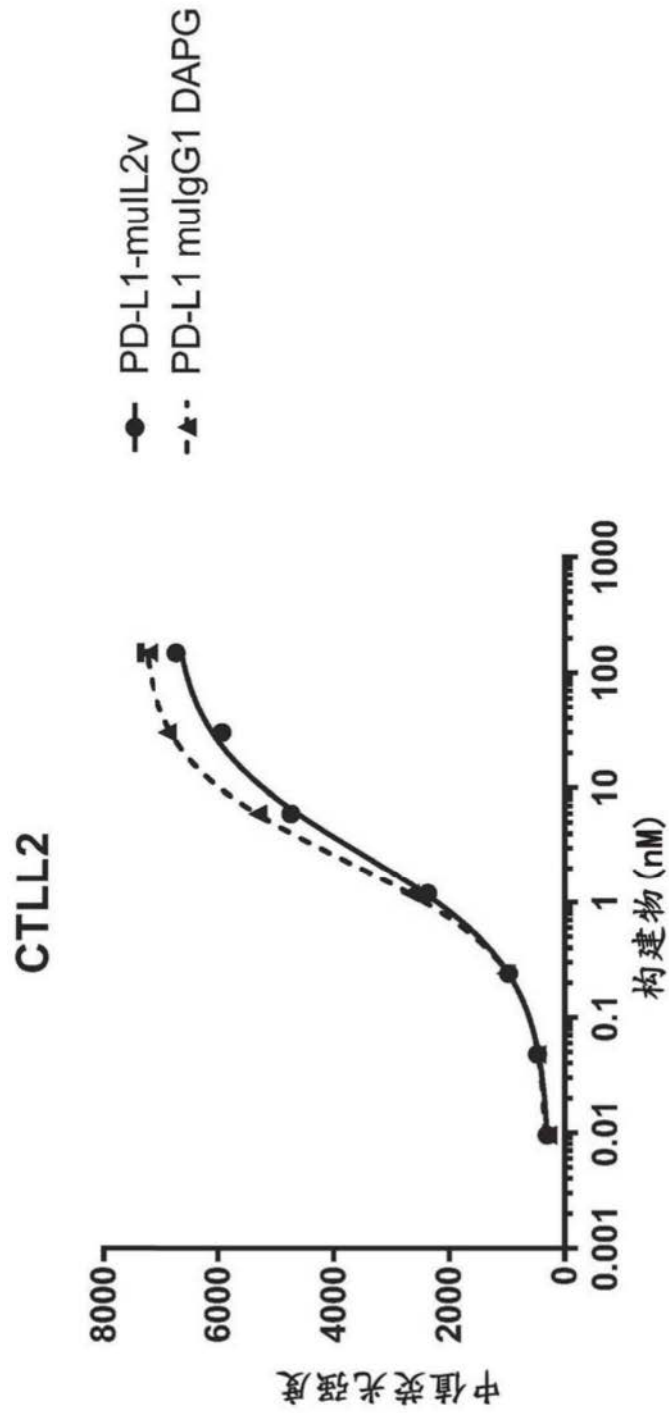


图8

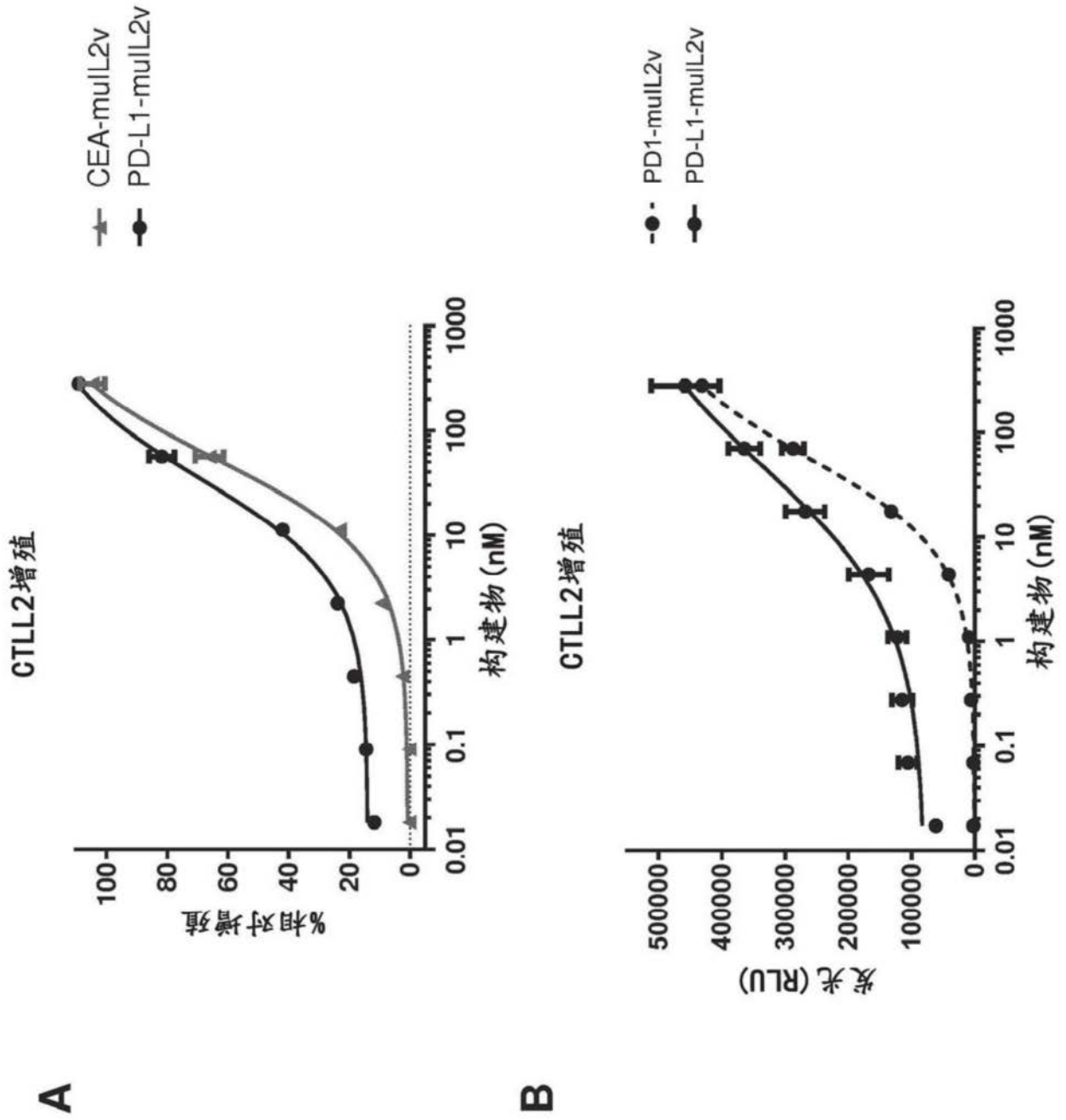


图9

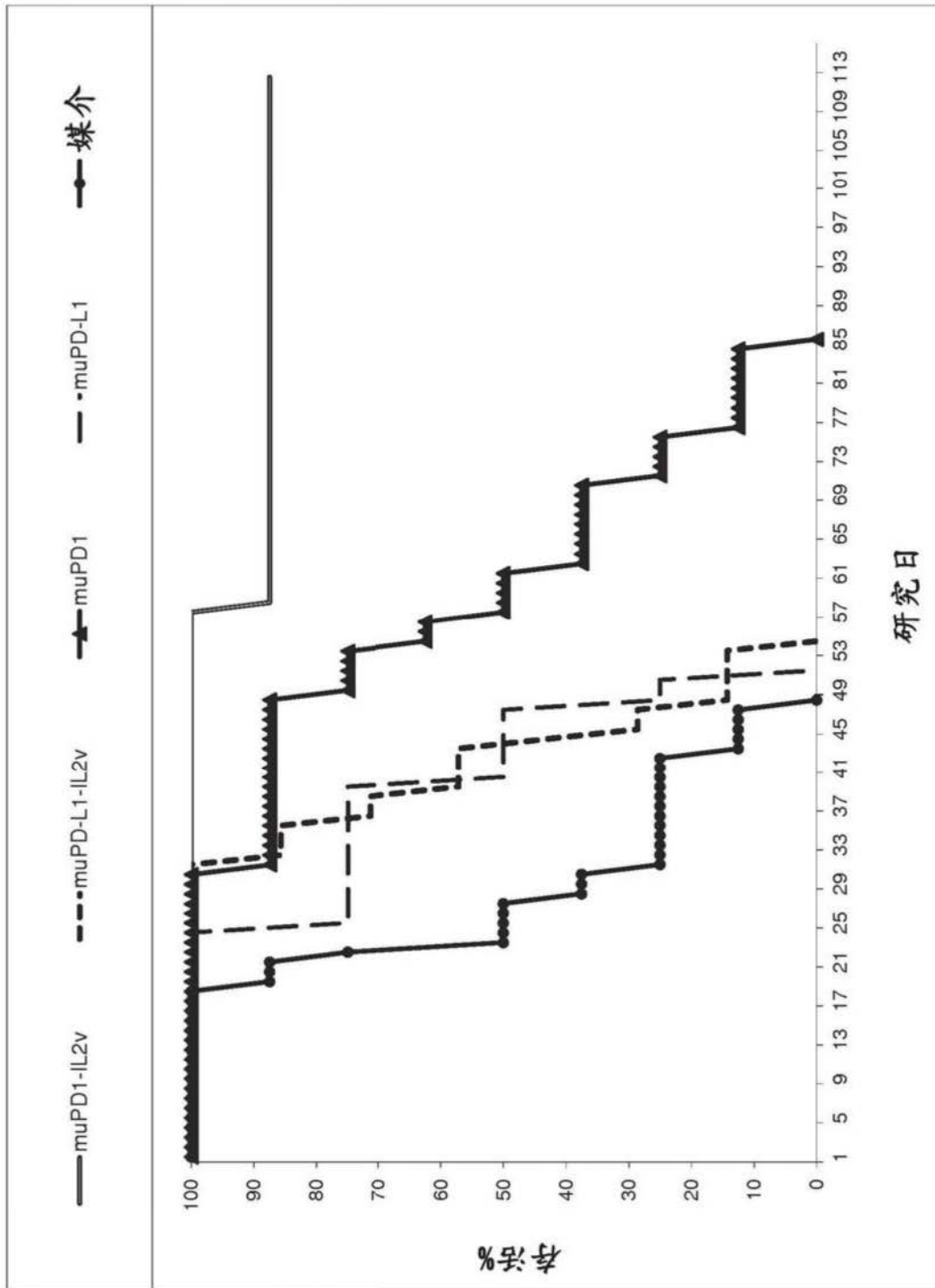


图10

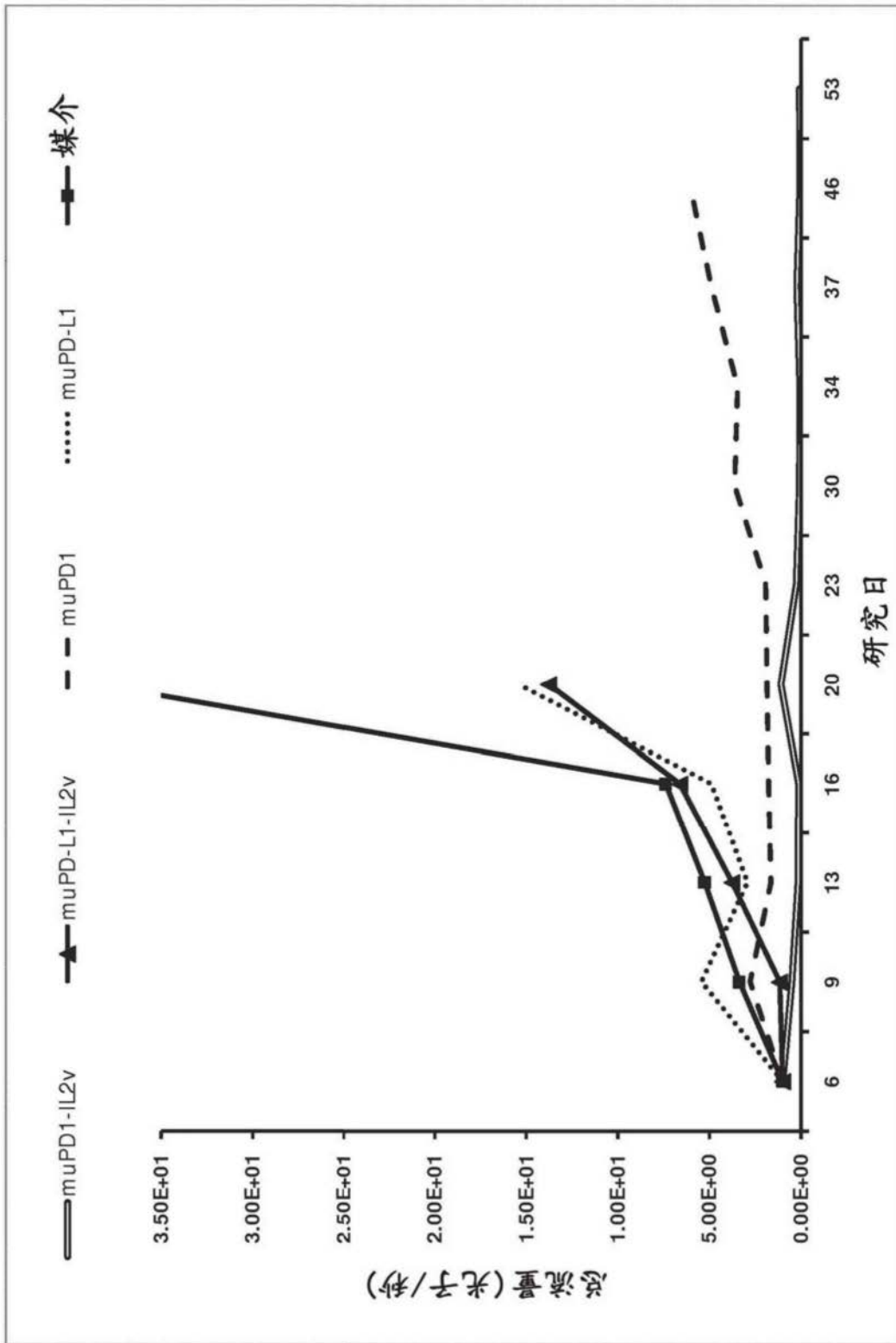


图11

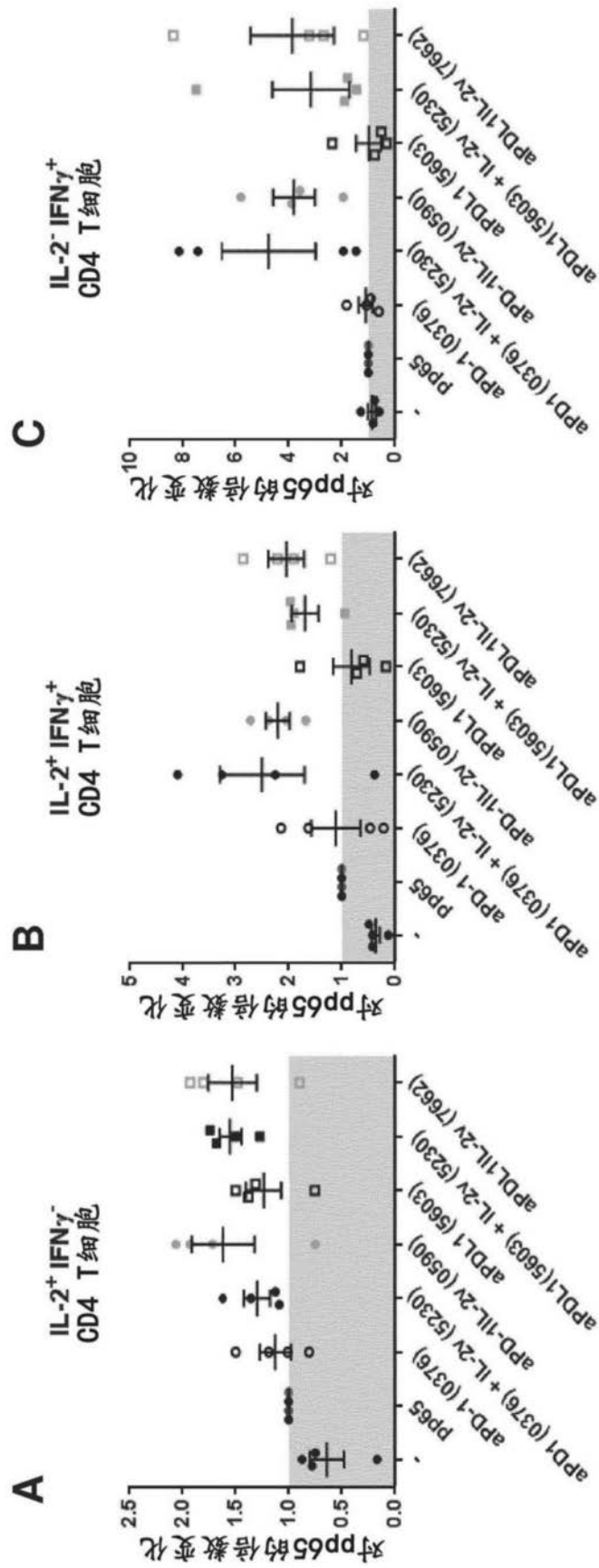


图12

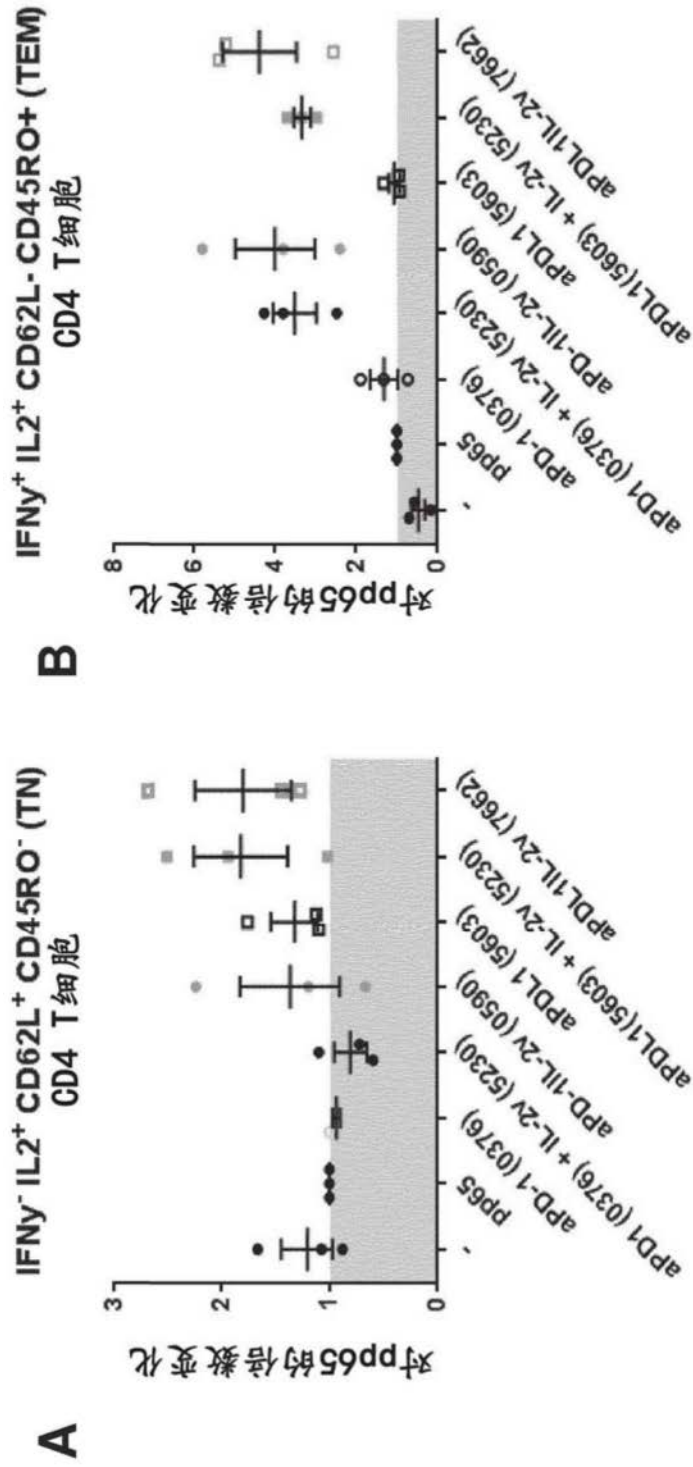


图13

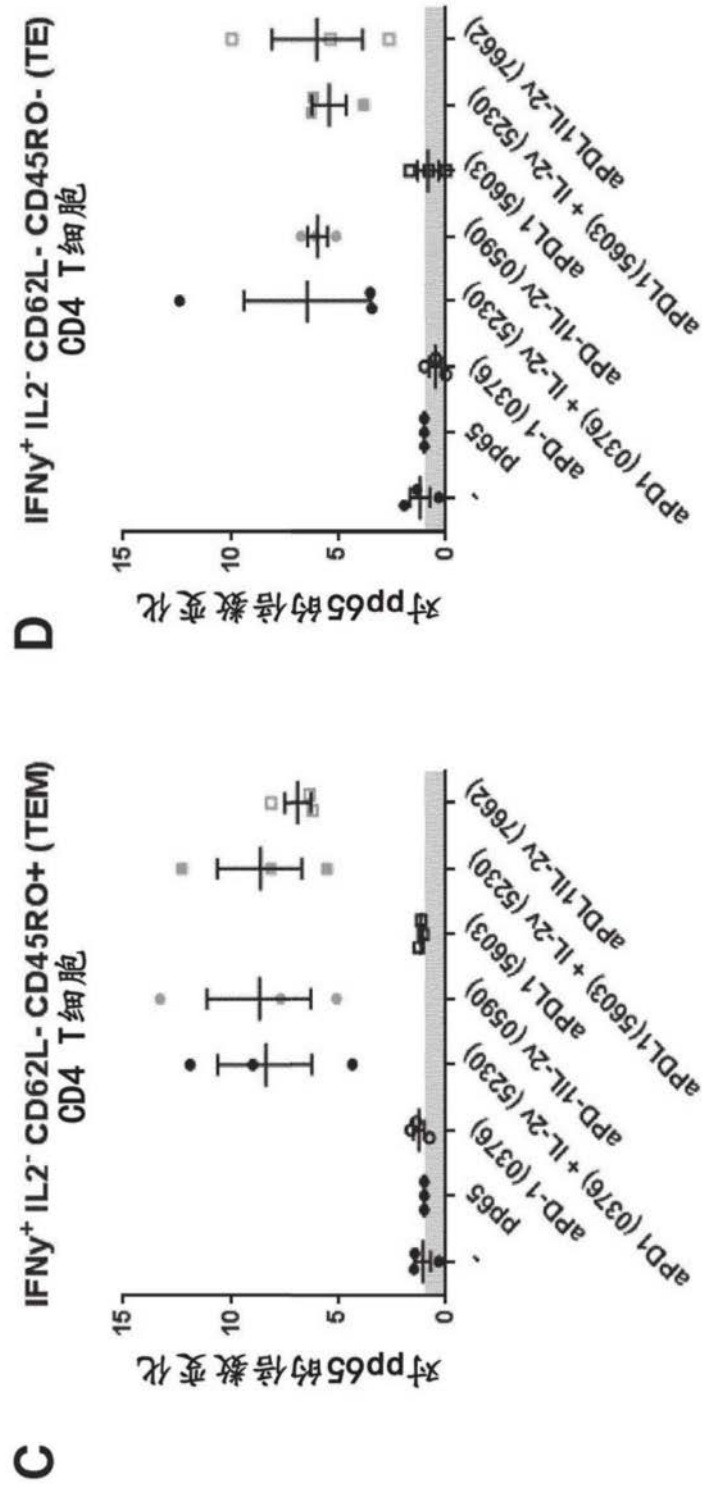


图13(续)



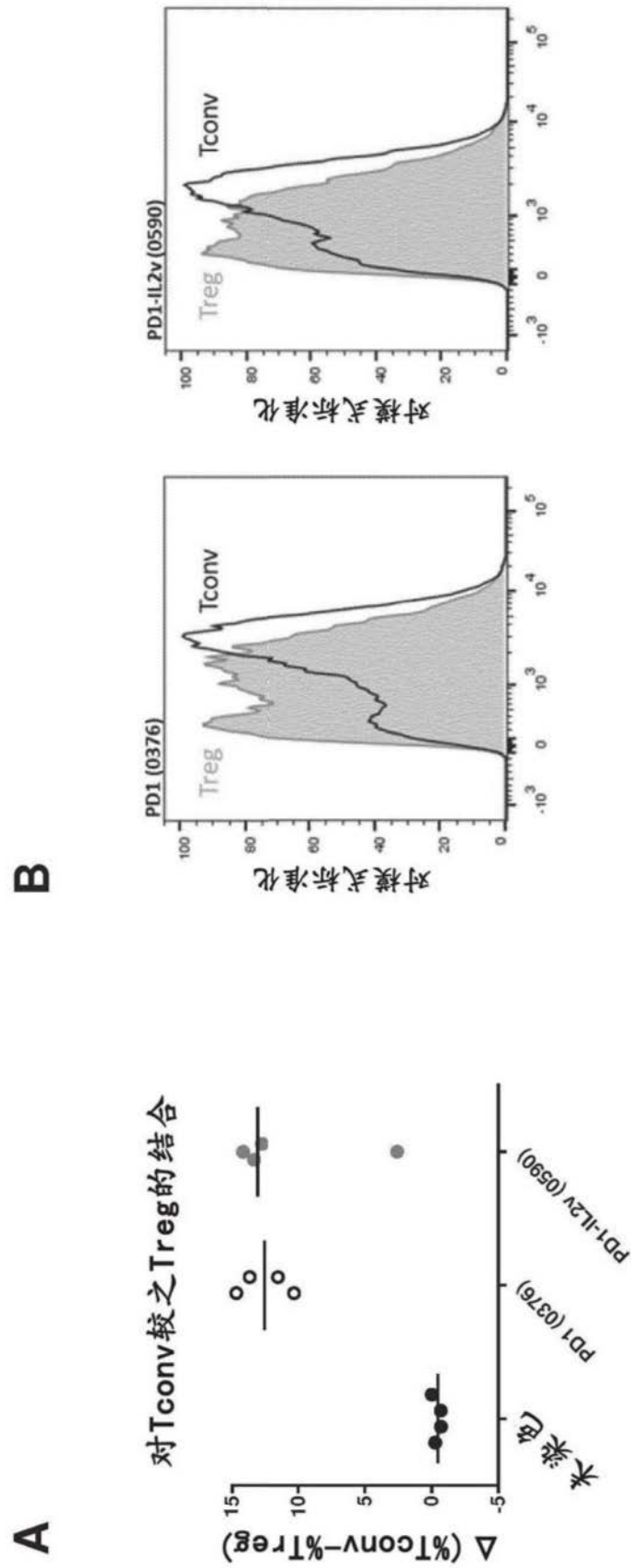


图14

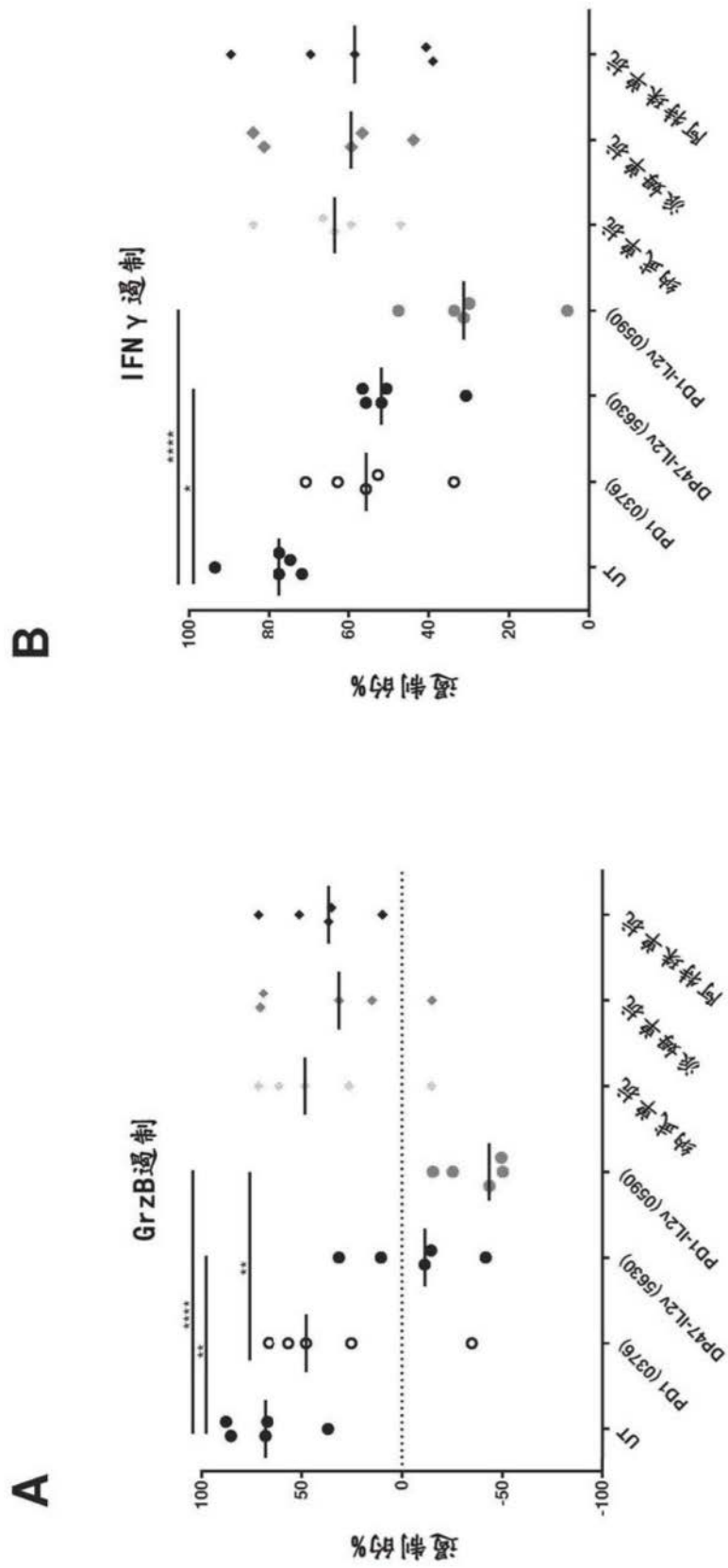


图15

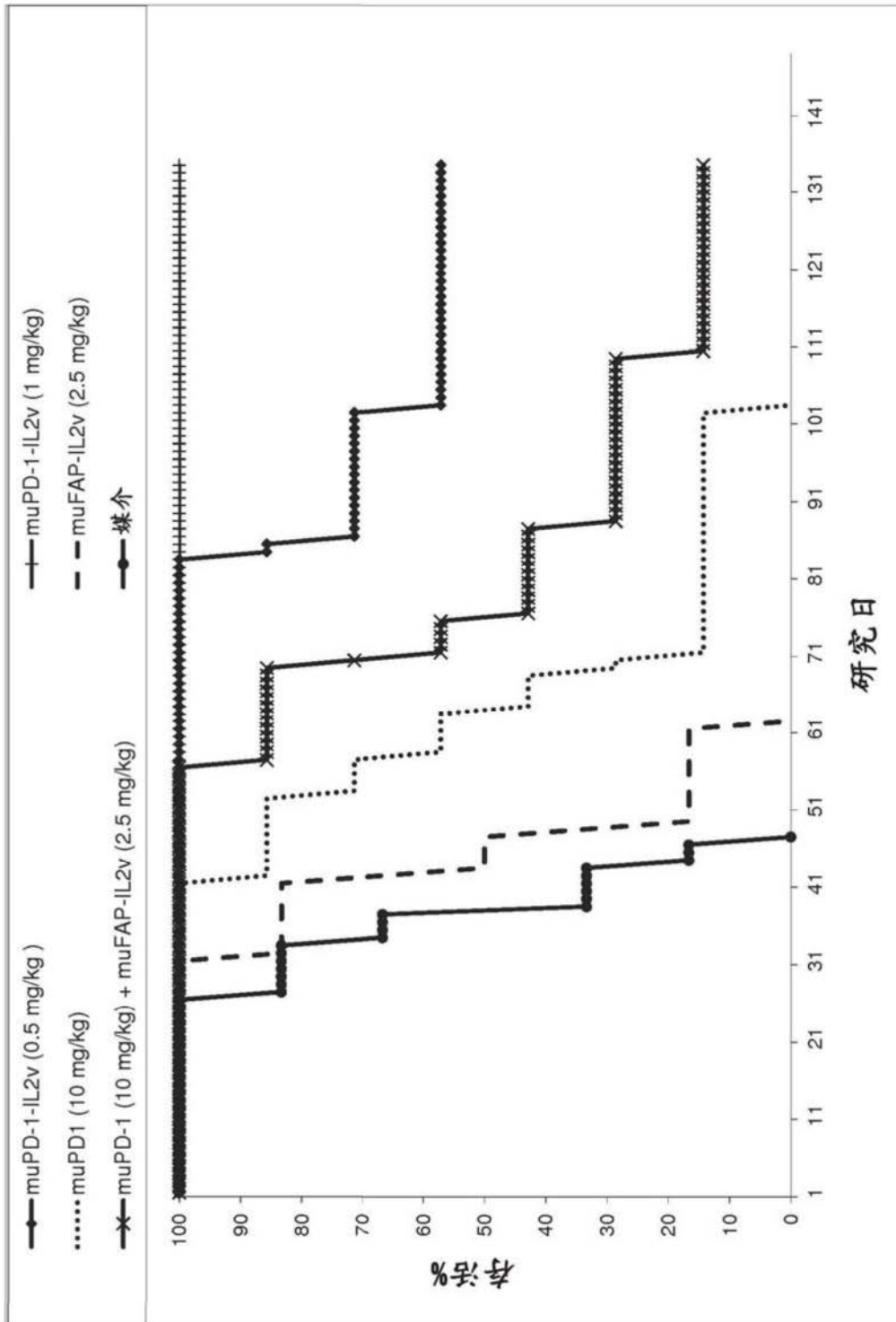


图16

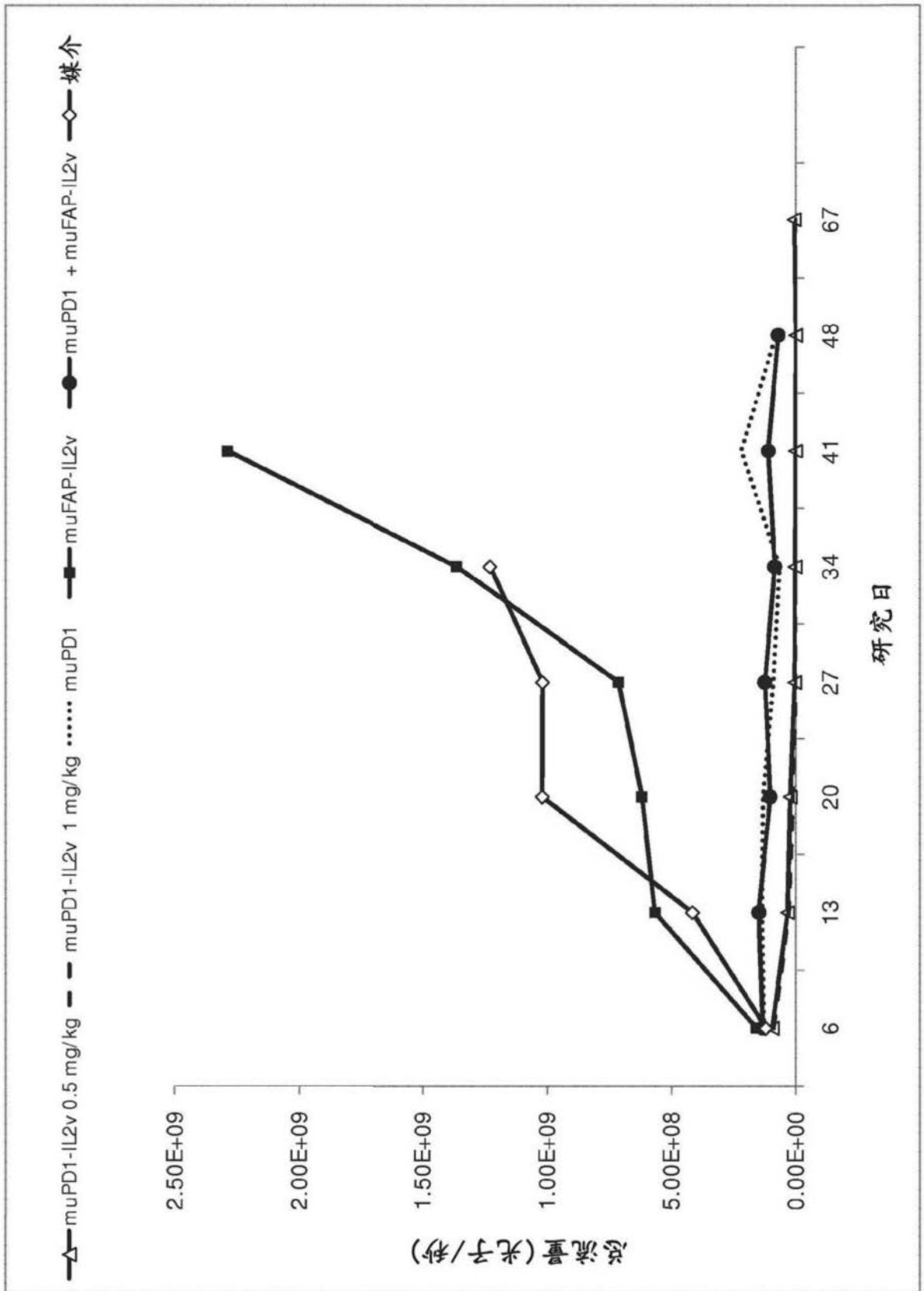


图17

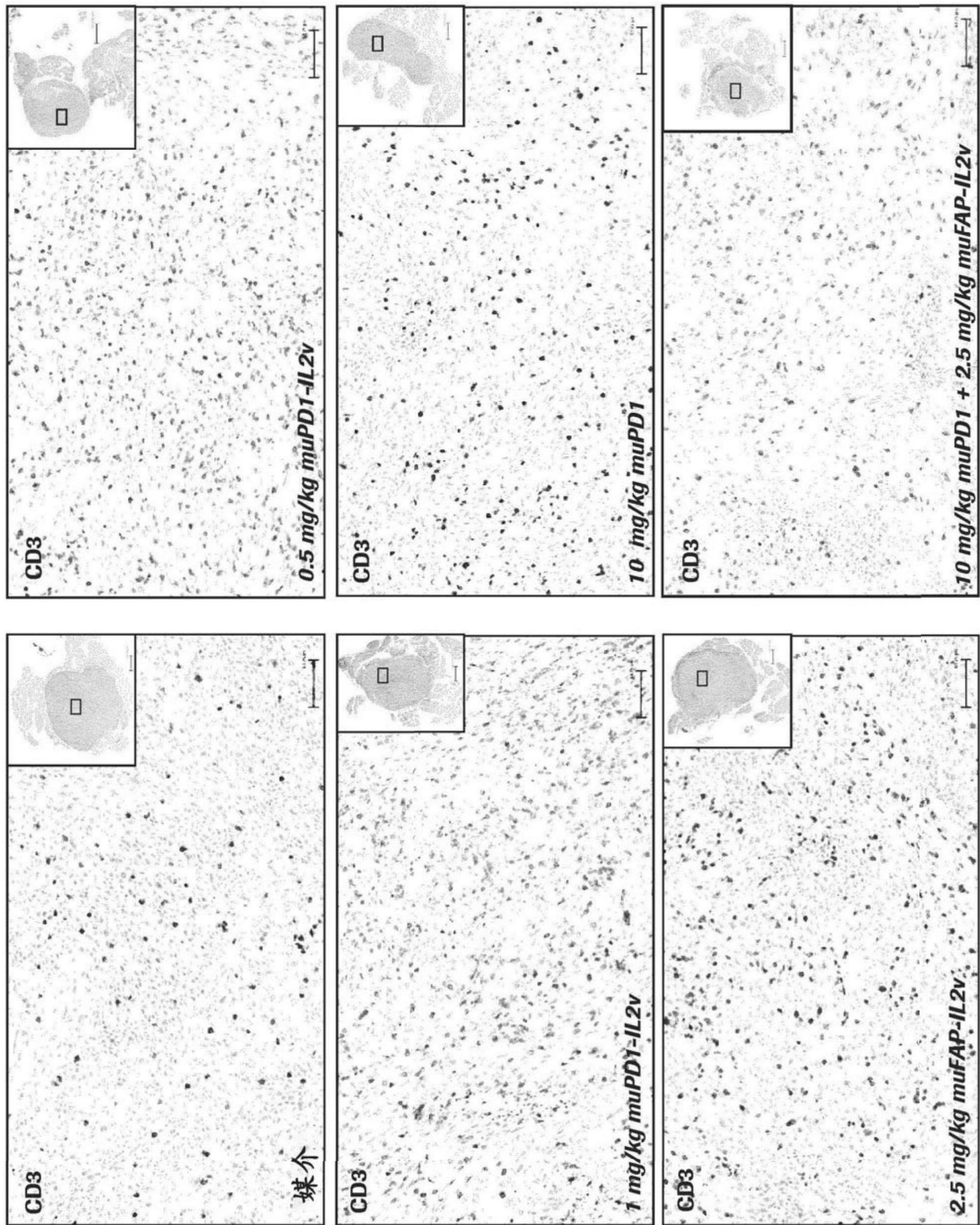


图18A

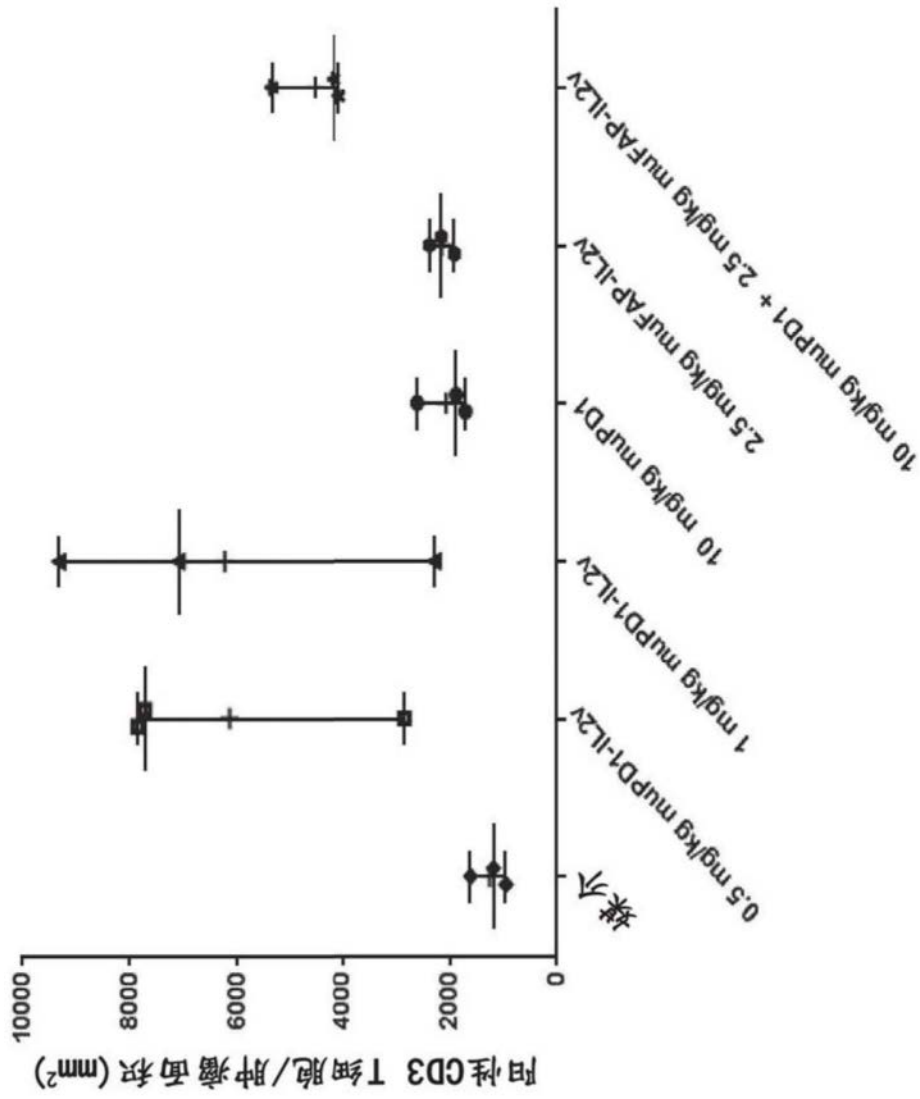


图18B

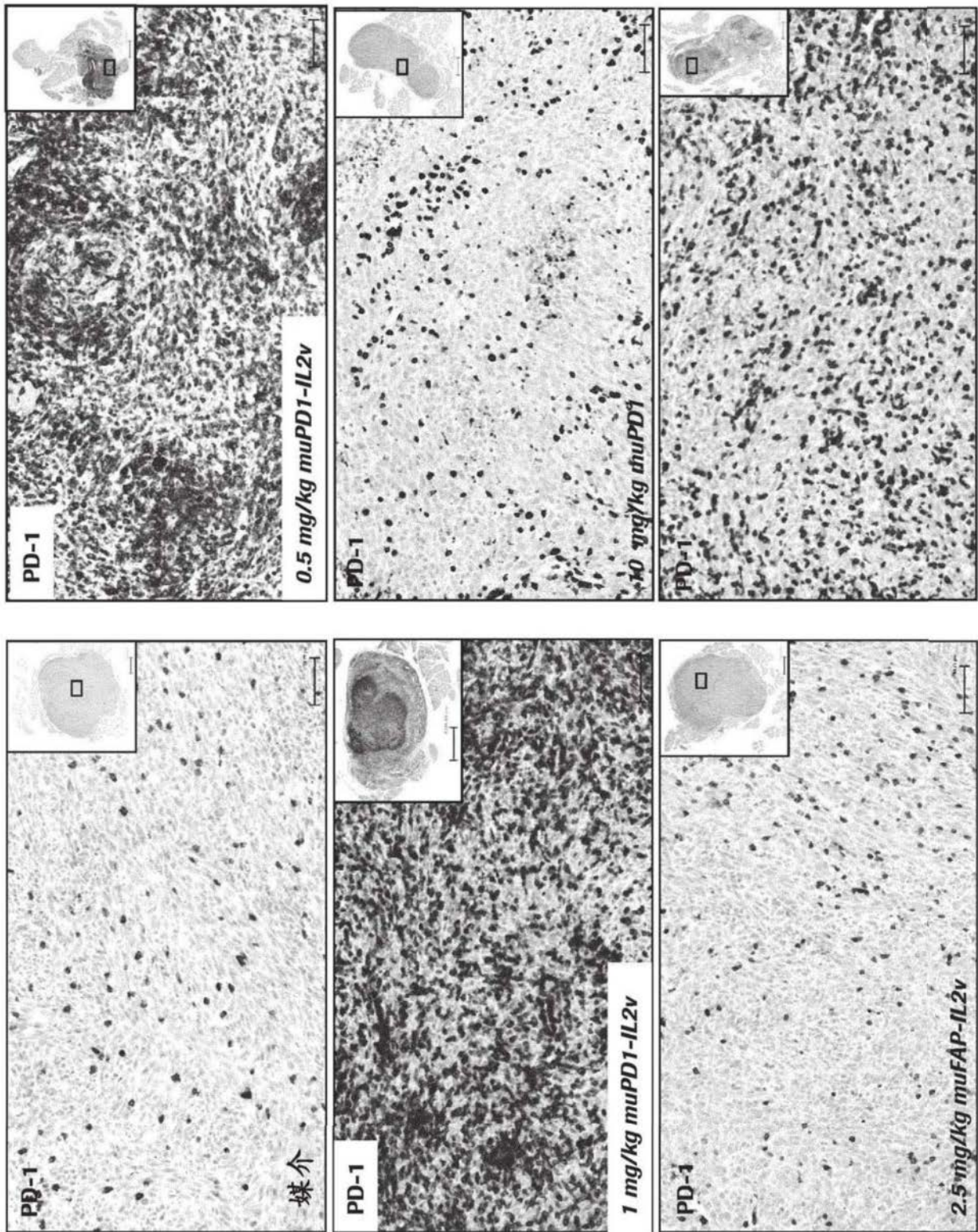


图19

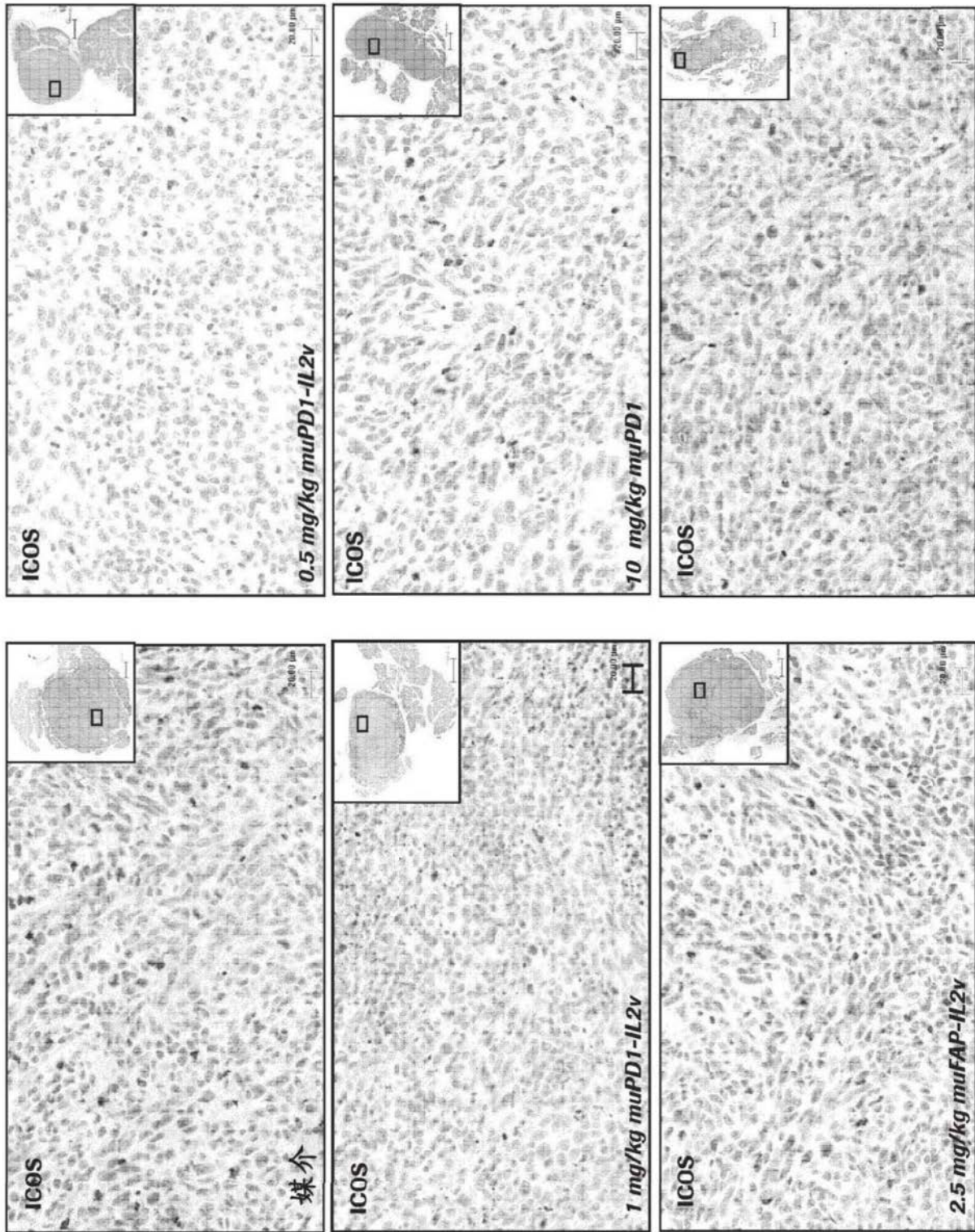


图20



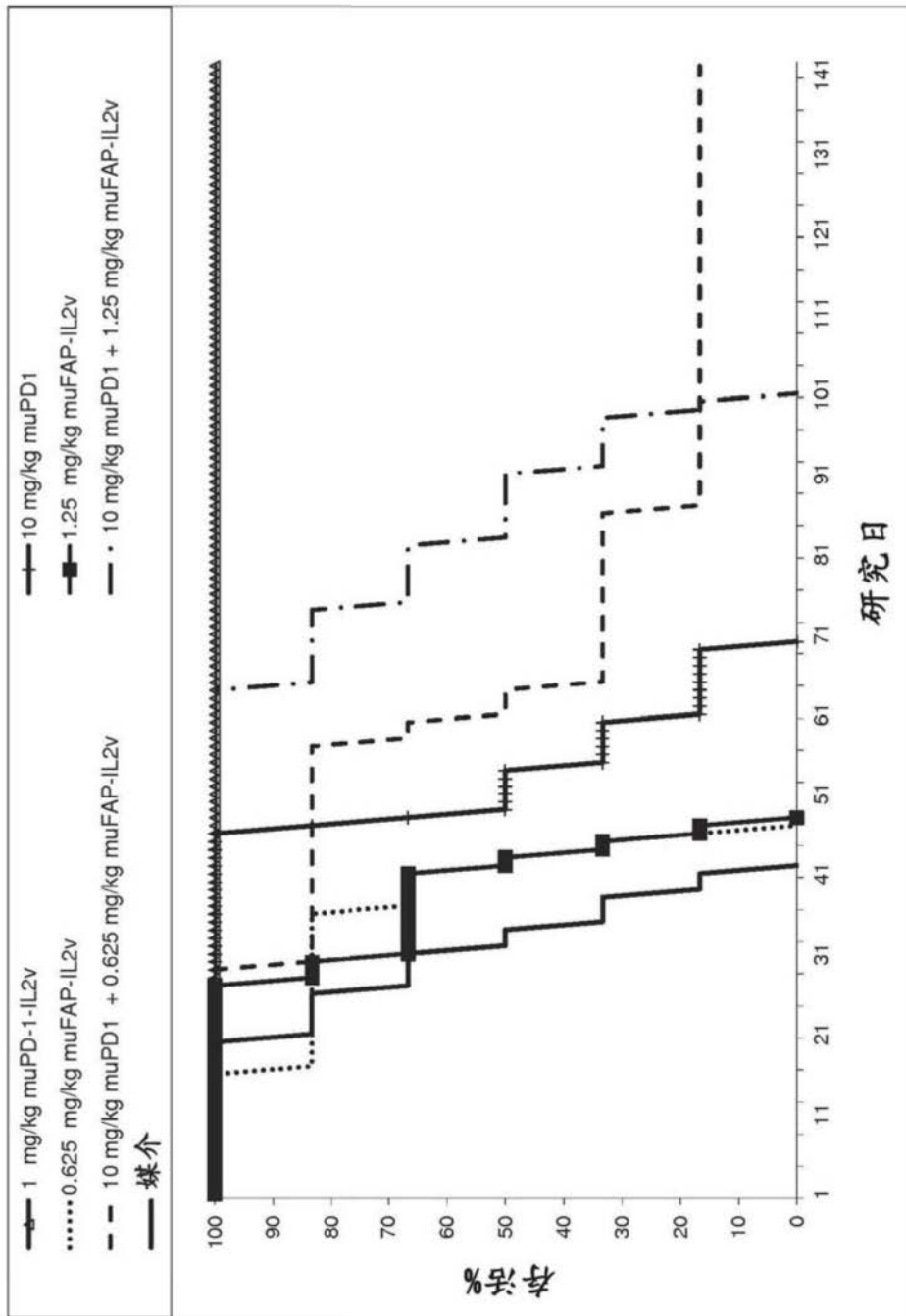


图21

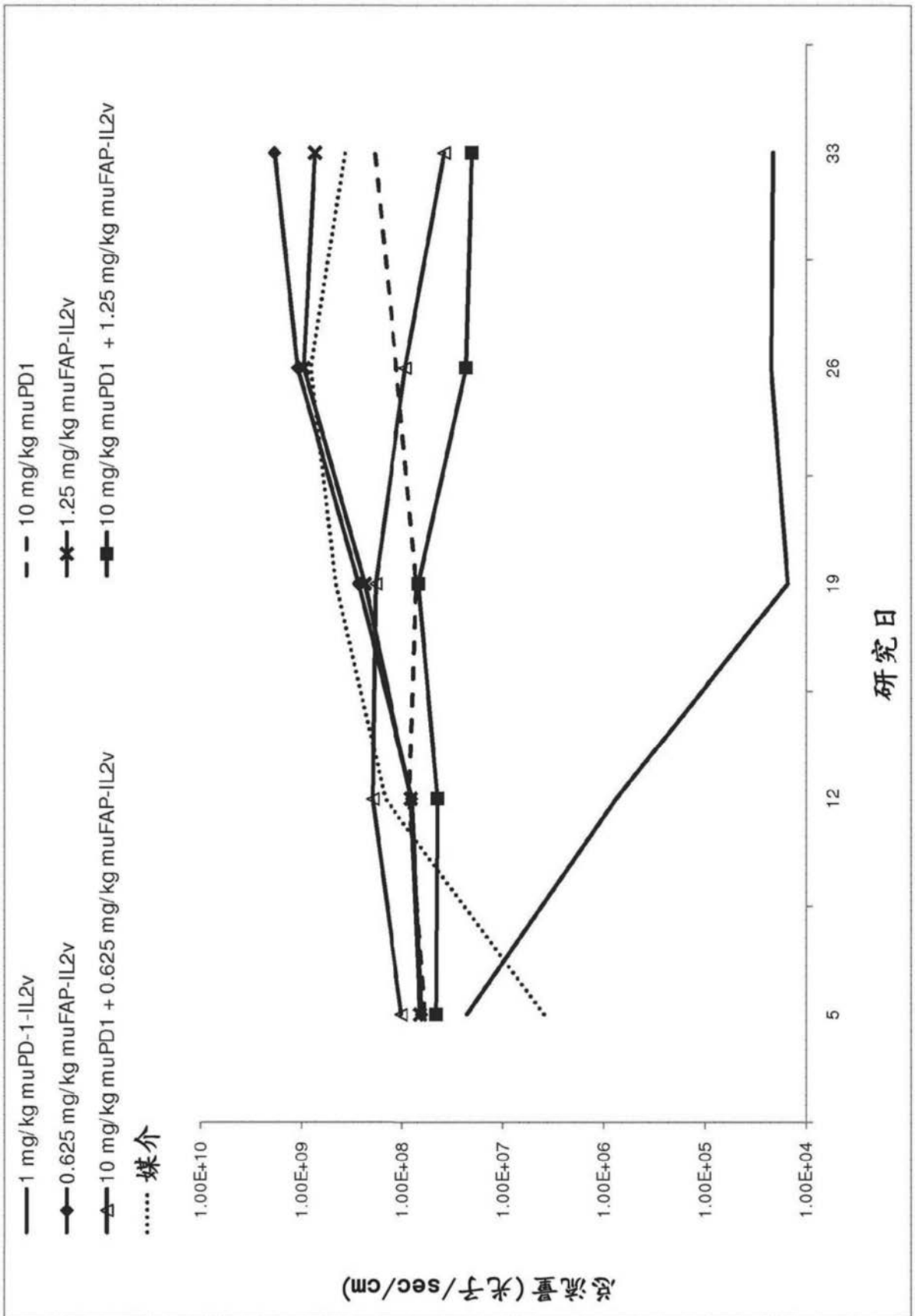


图22

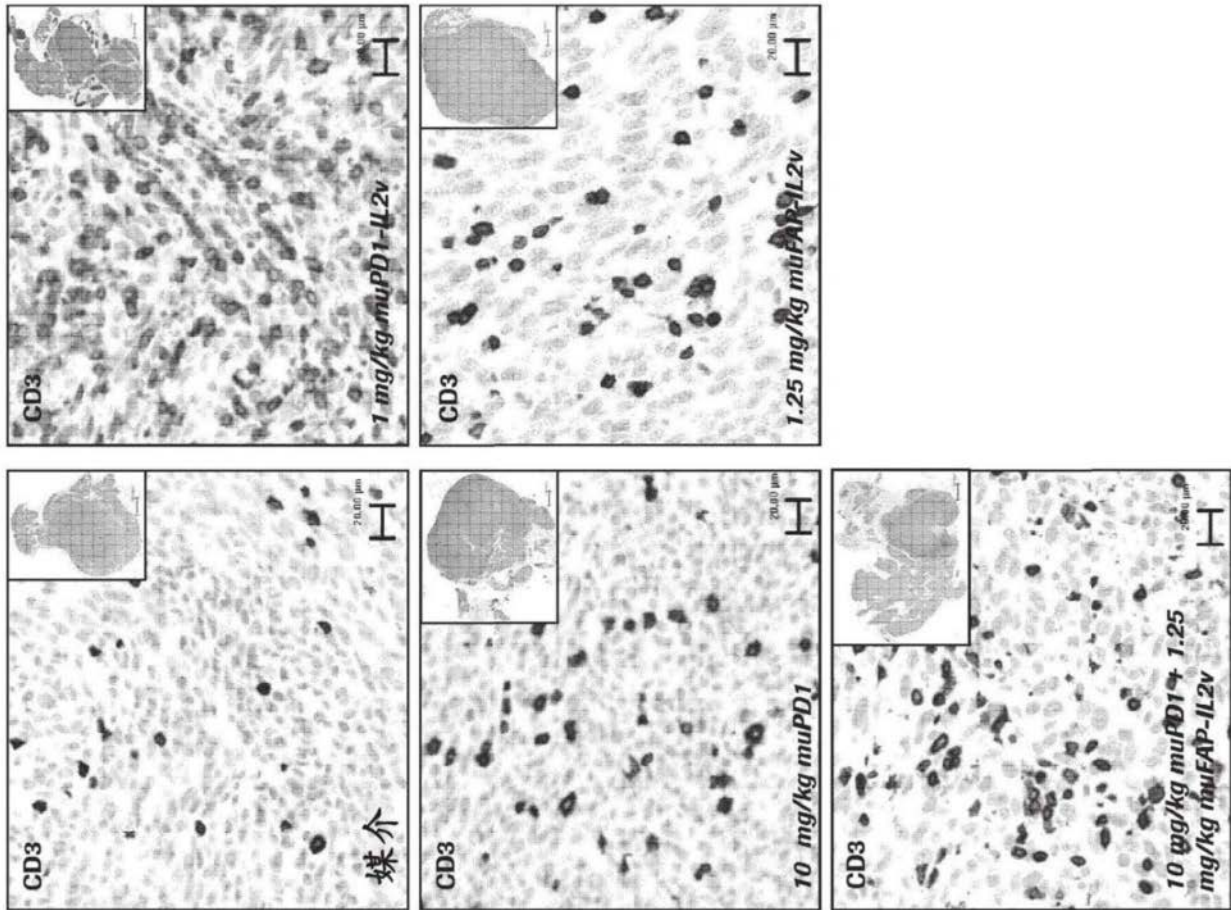


图23

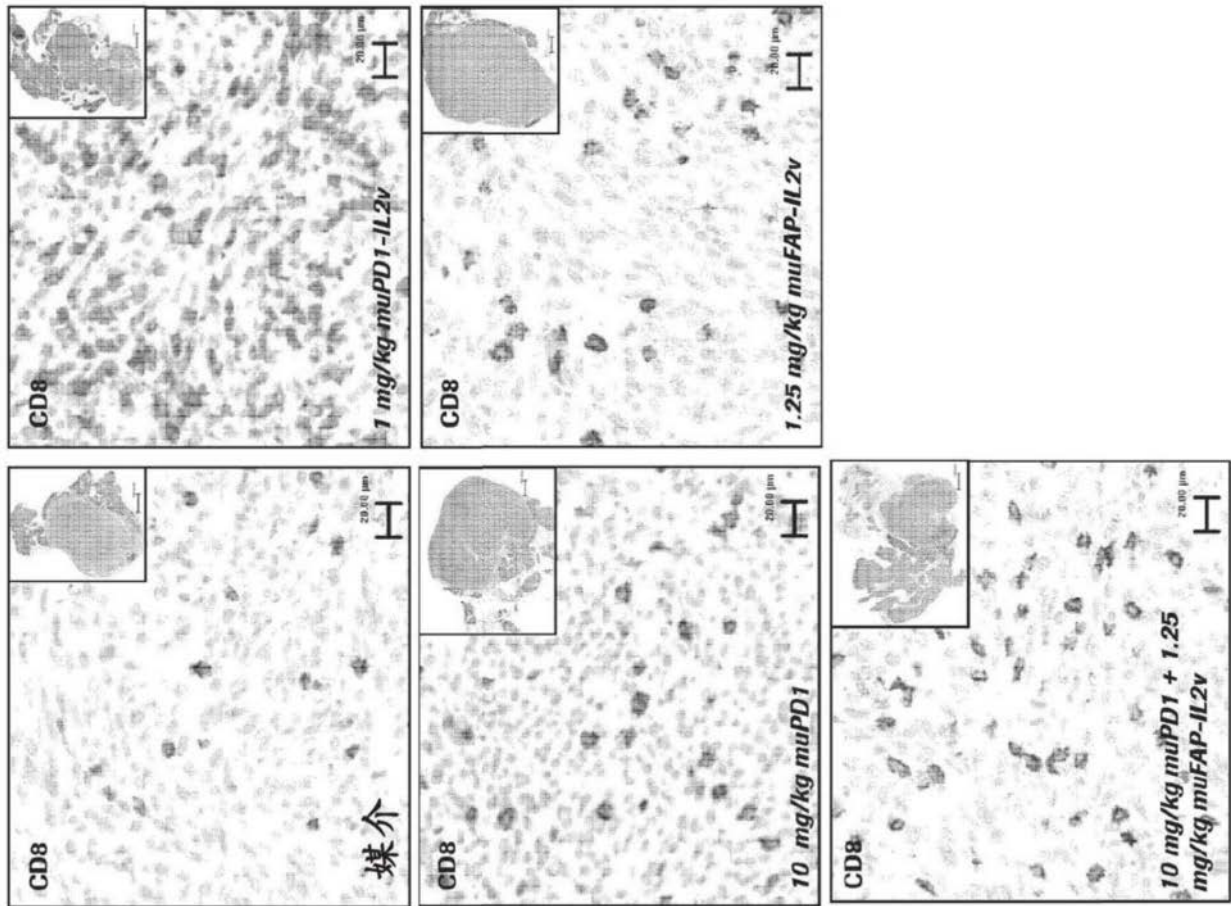


图24A

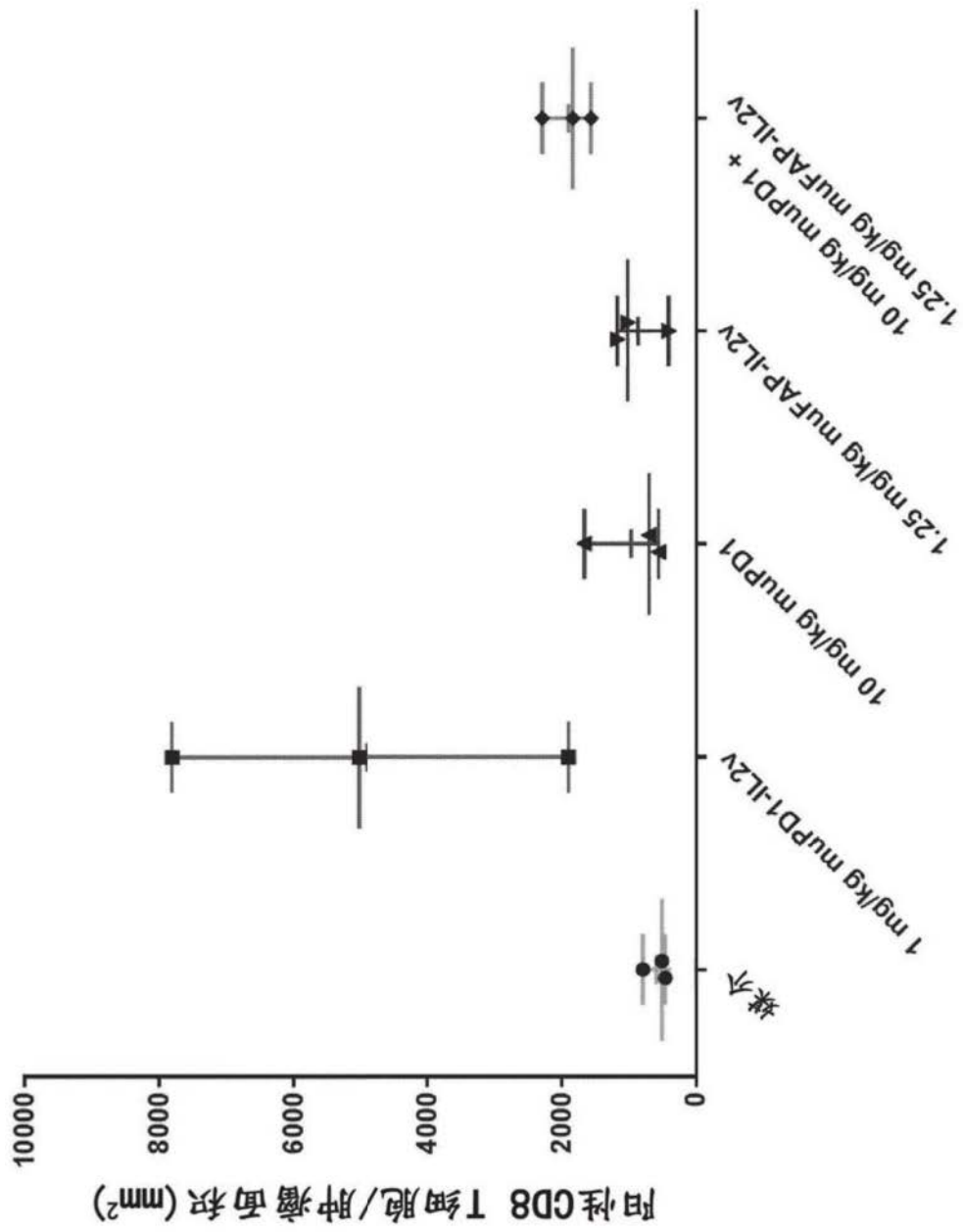


图24B

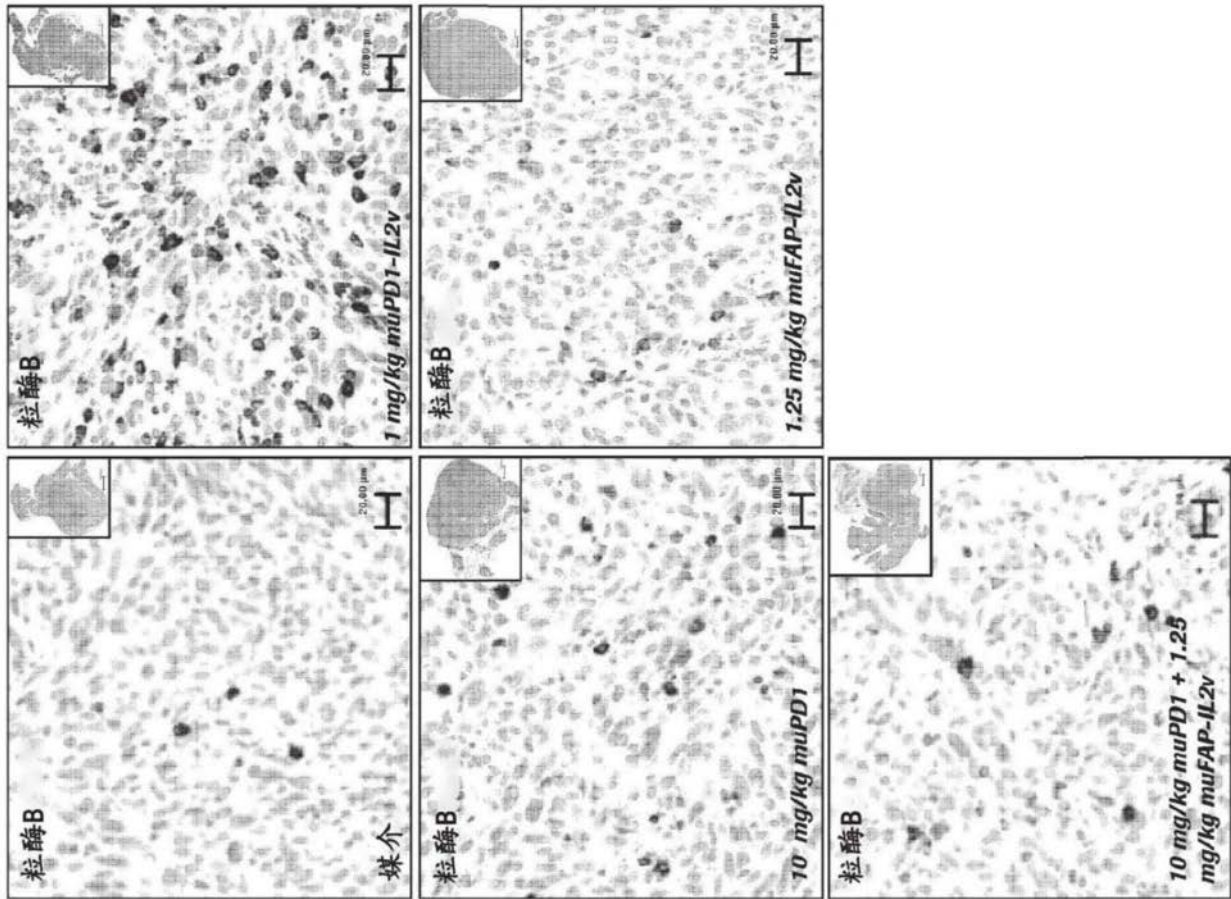


图25A

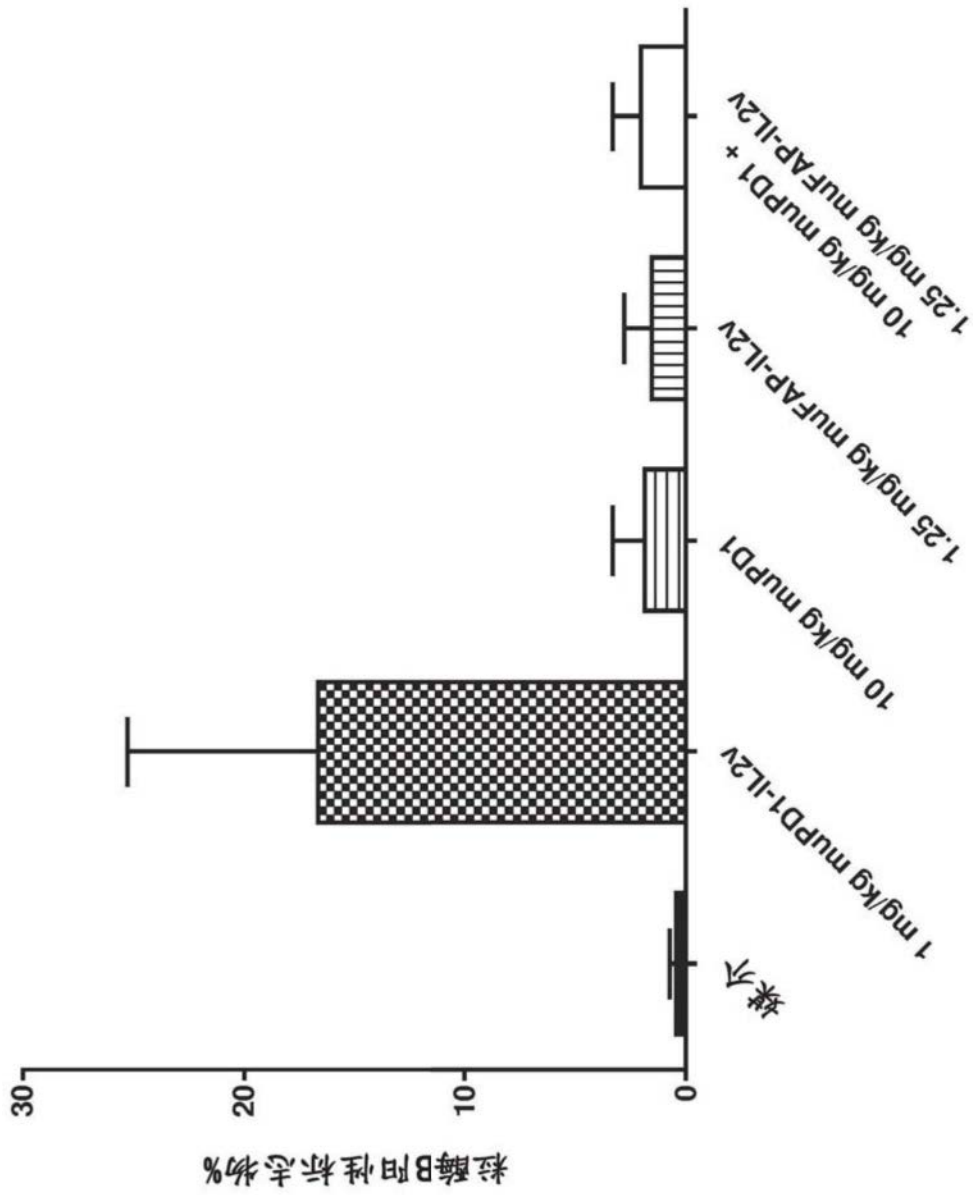


图25B

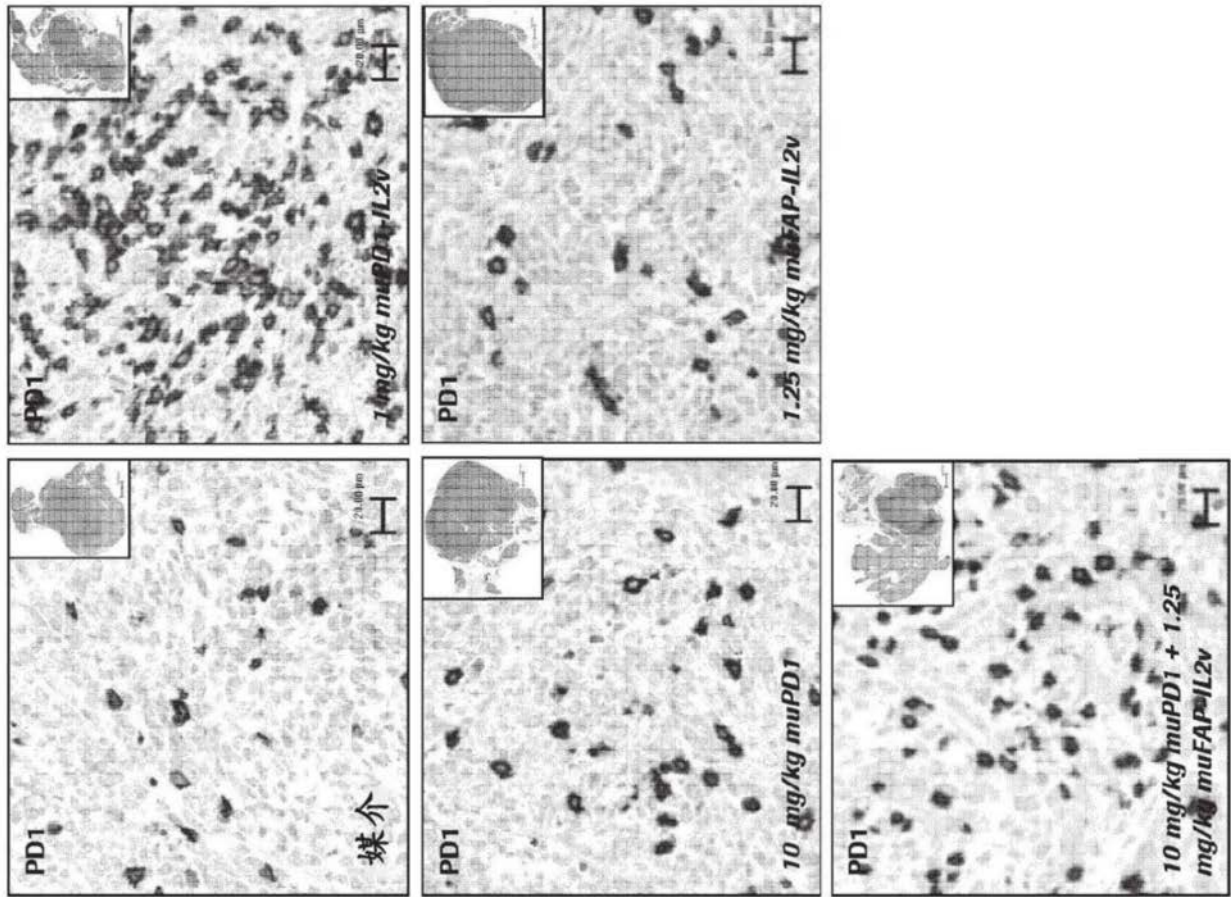


图26A



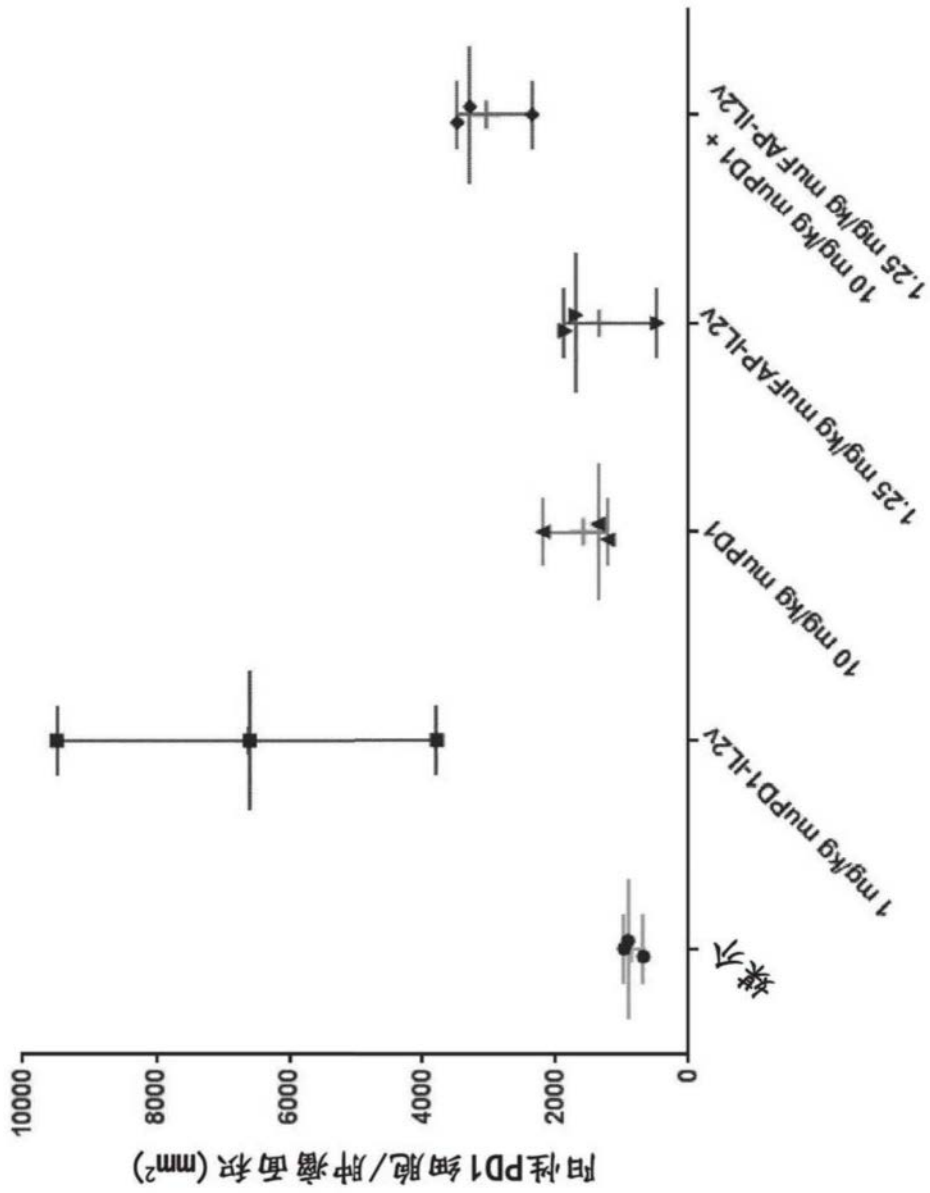


图26B

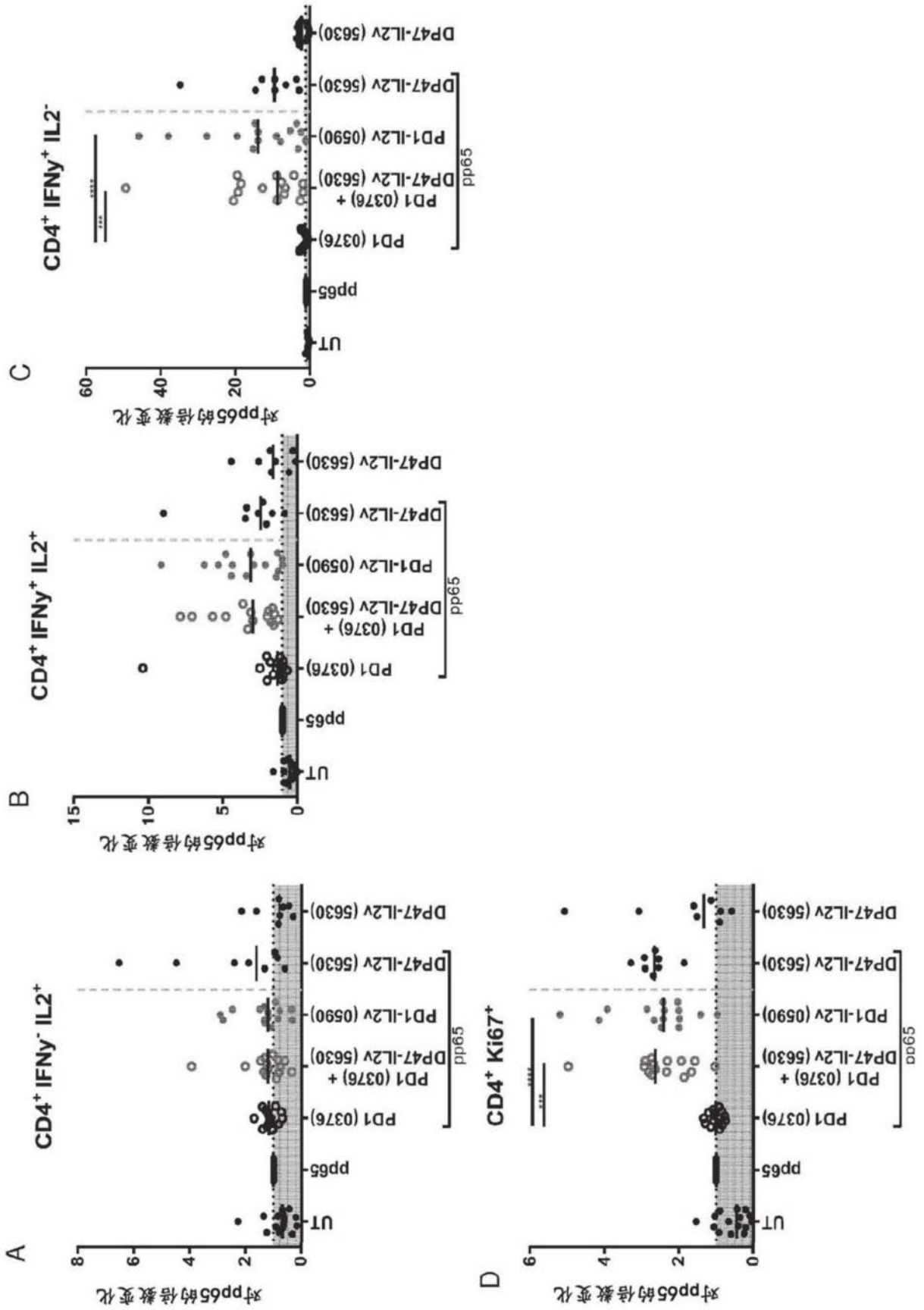


图27

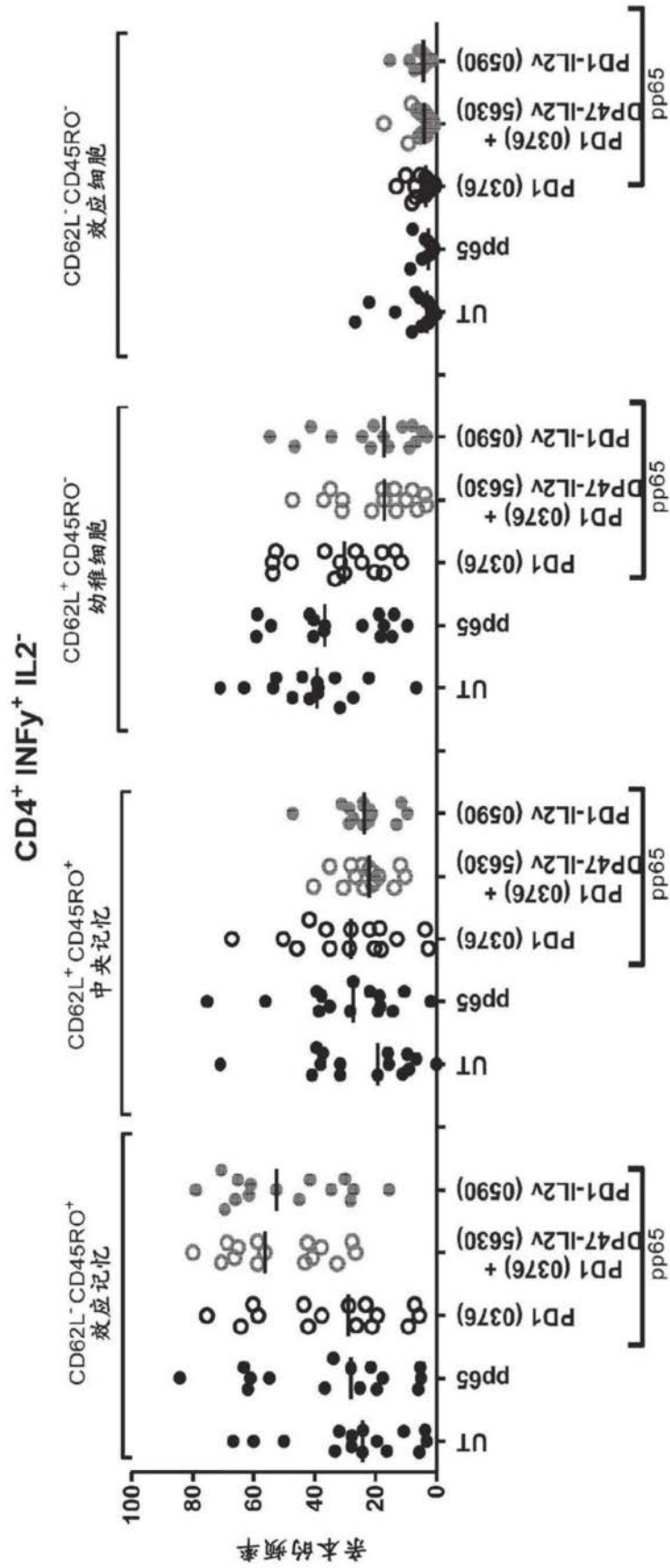


图28

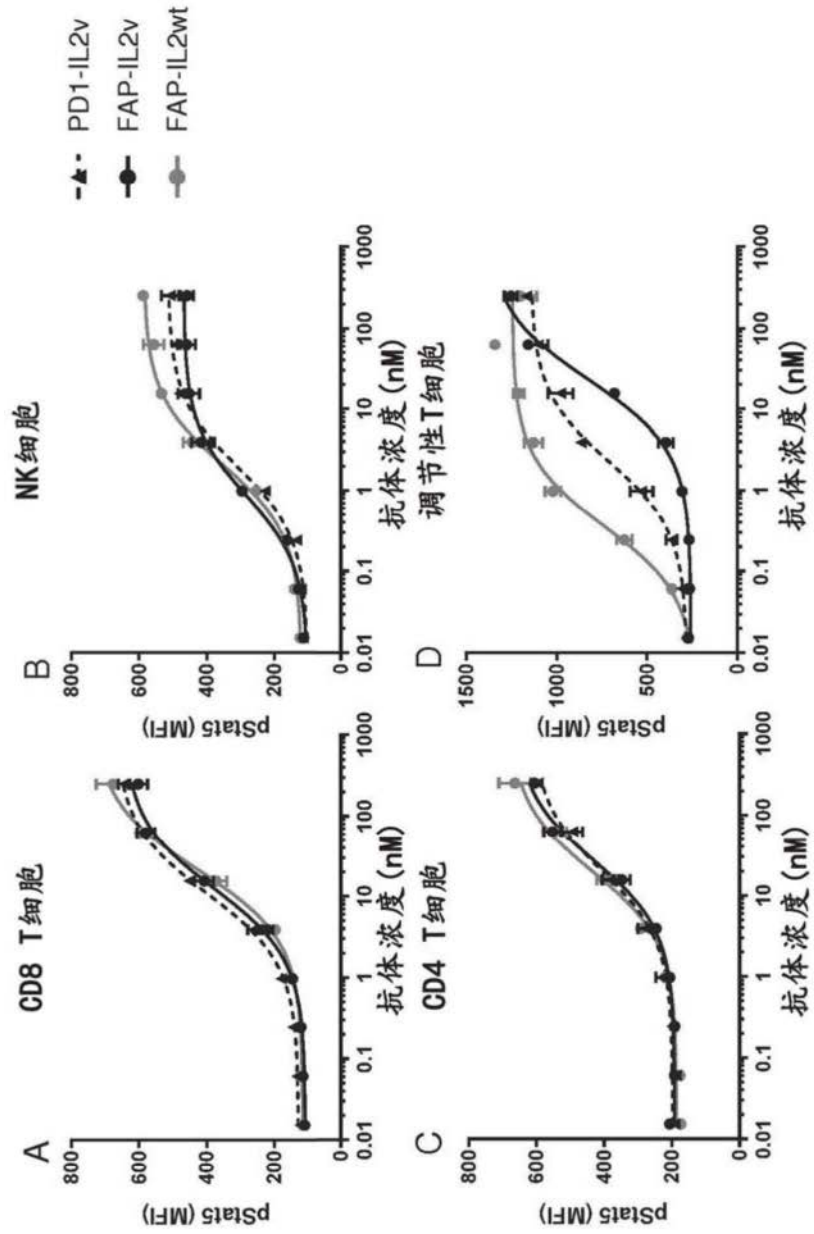


图29

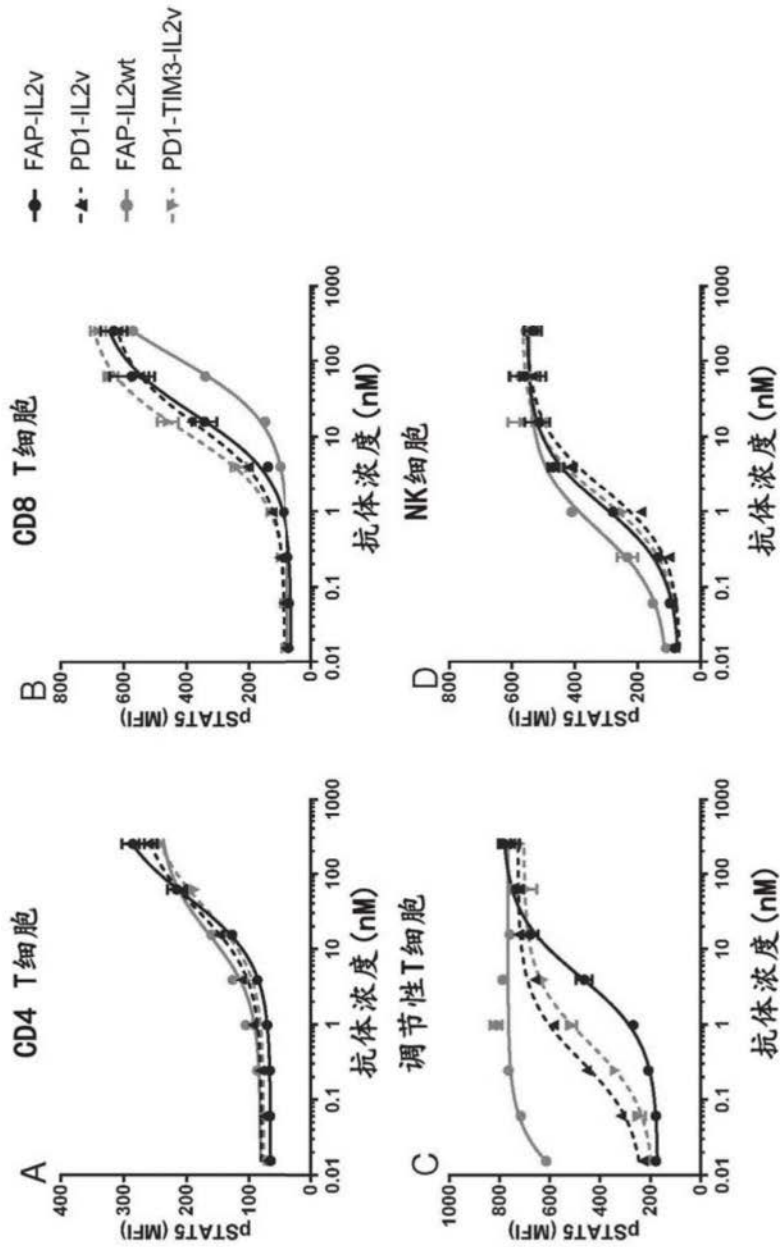


图30

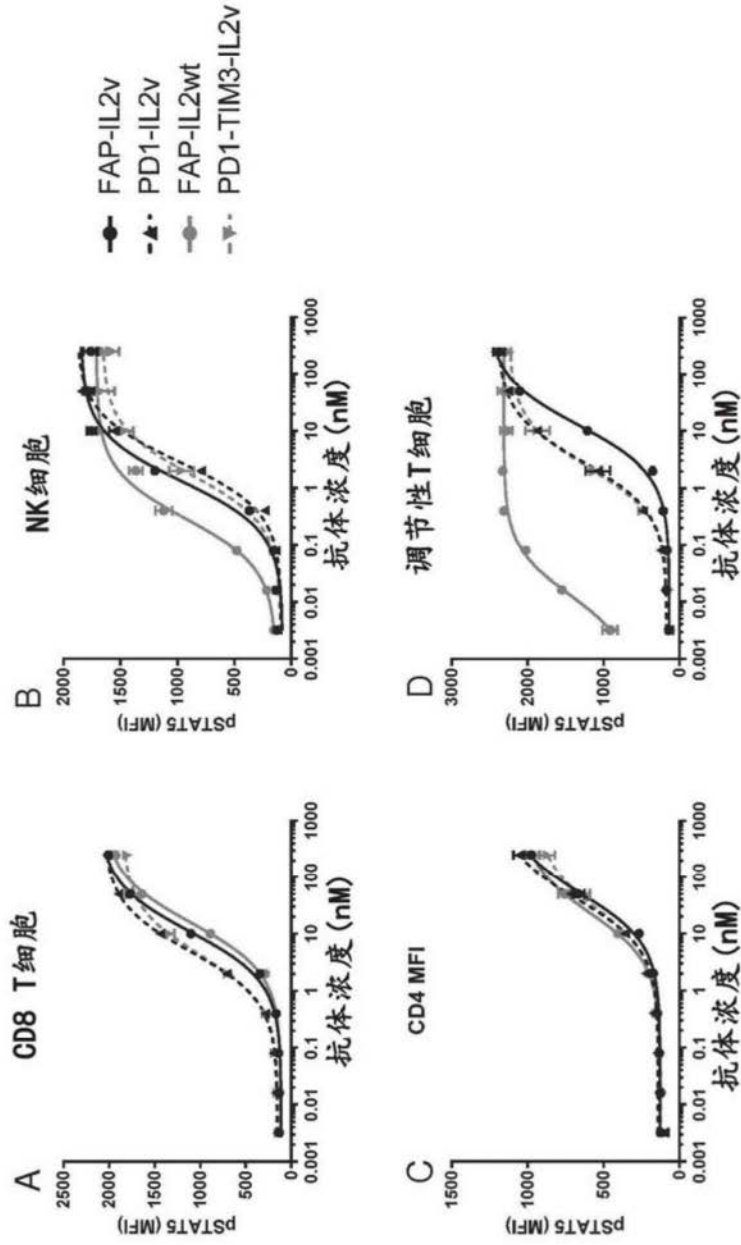


图31

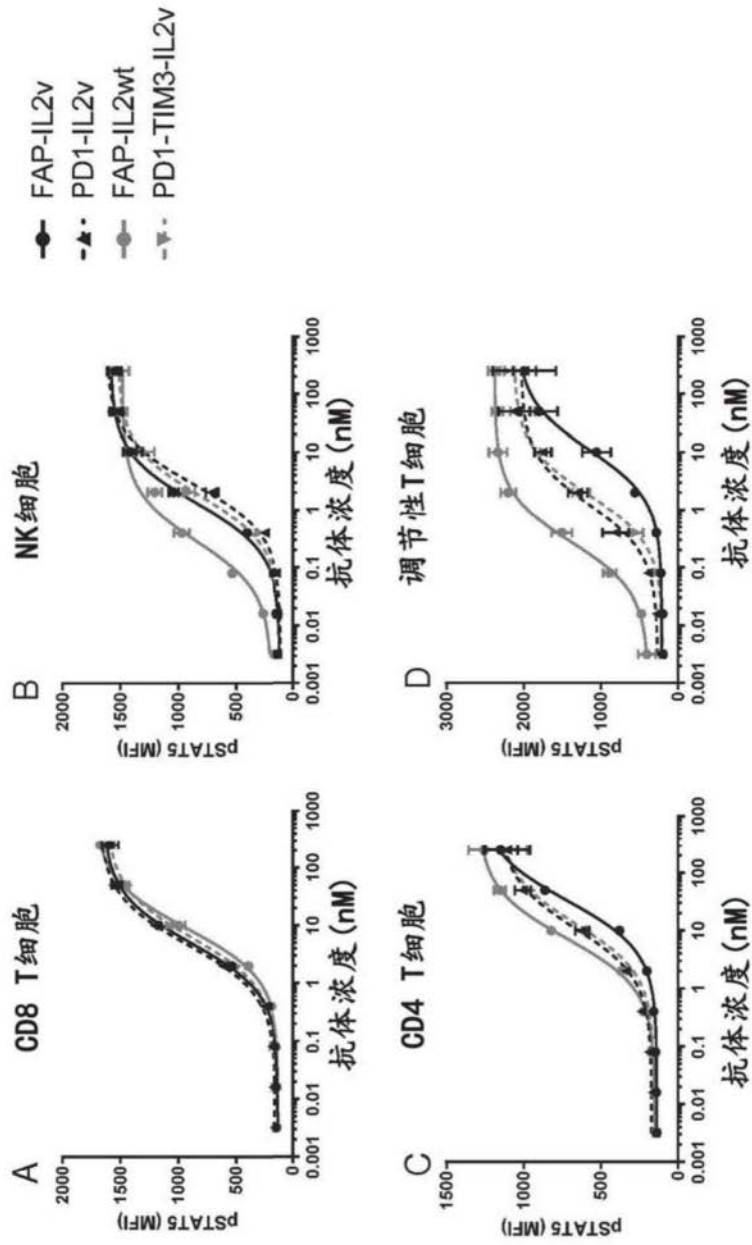


图32