



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I821287 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：108115578

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 05 月 06 日

(51)Int. Cl. : C07K14/55 (2006.01)

C07K14/56 (2006.01)

C12N15/62 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/05/07 古巴

CU-2018-000039

(71)申請人：分子免疫學中心(古巴) CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (CU)
古巴(72)發明人：赫南茲格薩 泰斯 HERNANDEZ GARCIA, TAYS (CU)；拉巴柴迪亞 莫拉
RABADE CHEDIAK, MAURA LISETT (CU)；李昂孟孫 凱利特 LEON MONZON,
KALET (CU)；梅莎帕迪洛 西爾斯 MESA PARDILLO, CIRCE (CU)；弗南德茲
莫里納 路易斯 FERNANDEZ MOLINA, LUIS ENRIQUE (CU)；海薇亞赫南茲
吉塞爾 HEVIA HERNANDEZ, GISELLE (CU)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

期刊 He P., et al., "The targeted expression of the human interleukin-2/interferon α 2b fused gene in α -fetoprotein-expressing hepatocellular carcinoma cells", J Cancer Res Clin Oncol, Vol. 125, 1999, page 77-82.

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：8 共 44 頁

(54)名稱

介白素-2 突變形成之蛋白質與第 I 型干擾素所構成之融合蛋白質

(57)摘要

本發明描述基於細胞介素(cytokine)的融合蛋白質，稱為雙細胞介素(bi-cytokine, BC)，具體是藉由結合 IL2 促效劑突變形成之蛋白質與第 I 型干擾素(IFN)，藉由突變體人類 IgG1 的 Fc 區域與連接胜肽連接而形成。IL2 促效劑突變形成之蛋白質與第 I 型 IFN 在雙細胞介素之結構中的組合為這些分子提供令人驚訝的免疫調節特性，並且比親代的(parental)細胞介素或其組合具有更好的治療效果，這使得它們成為用於癌症治療之具吸引力且新穎的分子。本申請案亦描述包括本專利之融合蛋白質目標作為活性成分的醫藥組成物。

The present invention describes fusion proteins based on cytokines, called bi-cytokines (BC), specifically formed by the binding of an IL2 agonist mutein with a type I interferon (IFN), linked by an Fc region of a mutant human IgG1 and a connector peptide. The combination of an IL2 agonist mutein and a type I IFN in the structure of the bi-cytokines gives surprising immunoregulatory properties to these molecules and a superior therapeutic effect than that of parental cytokines, or their combination, which makes them attractive and novel molecules for the treatment of cancer. Pharmaceutical compositions comprising as an active ingredient the fusion proteins object of this patent are also described.



I821287

【發明摘要】**【中文發明名稱】**

介白素－2 突變形成之蛋白質與第 I 型干擾素所構成之融合蛋白質

【英文發明名稱】

FUSION PROTEINS COMPOSED BY AN INTERLEUKIN-2 MUTEIN AND TYPE I INTERFERON

【中文】

本發明描述基於細胞介素 (cytokine) 的融合蛋白質，稱為雙細胞介素 (bi-cytokine, BC)，具體是藉由結合 IL2 促效劑突變形成之蛋白質與第 I 型干擾素 (IFN)，藉由突變體人類 IgG1 的 Fc 區域與連接胜肽連接而形成。IL2 促效劑突變形成之蛋白質與第 I 型 IFN 在雙細胞介素之結構中的組合為這些分子提供令人驚訝的免疫調節特性質，並且比親代的 (parental) 細胞介素或其組合具有更好的治療效果，這使得它們成為用於癌症治療之具吸引力且新穎的分子。本申請案亦描述包括本專利之融合蛋白質目標作為活性成分的醫藥組成物。

【 英文 】

The present invention describes fusion proteins based on cytokines, called bi-cytokines (BC), specifically formed by the binding of an IL2 agonist mutein with a type I interferon (IFN), linked by an Fc region of a mutant human IgG1 and a connector peptide. The combination of an IL2 agonist mutein and a type I IFN in the structure of the bi-cytokines gives surprising immunoregulatory properties to these molecules and a superior therapeutic effect than that of parental cytokines, or their combination, which makes them attractive and novel molecules for the treatment of cancer. Pharmaceutical compositions comprising as an active ingredient the fusion proteins object of this patent are also described.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

介白素－2 突變形成之蛋白質與第 I 型干擾素所構成之融合蛋白質

【英文發明名稱】

FUSION PROTEINS COMPOSED BY AN INTERLEUKIN-2 MUTEIN AND TYPE I INTERFERON

【技術領域】

【0001】本發明是關於生物技術與免疫腫瘤學的領域，特別是關於基於細胞介素之融合蛋白質的發展。特別地，其描述藉由結合第I型干擾素(interferon，IFN)至介白素2(interleukin 2，IL2)促效劑突變形成之蛋白質所構成的融合蛋白質。

【先前技術】

【0002】儘管在與細胞介素之使用相關的癌症免疫治療領域數十年的努力，目前所獲得的結果已是適度的。這些分子的高毒性和降低的半衰期以及受益患者的低百分比使得有必要創建增強其抗腫瘤性質的創新策略，這將轉化為癌症患者之更好的品質與更長壽命。破壞細胞介素治療功效的機制之一是調節T細胞的誘導，其抑制細胞毒性CD8+ T細胞在腫瘤微環境中的反應(Ovens and Naugler

(2012) *Theoretical Biology and Medical Modeling*, 9: 44)。

【0003】傳統上，經由共同施用可溶性分子或產生通常稱為融合介素(fusokine)的融合蛋白之組合已成為旨在優化細胞介素在癌症治療中的治療用途的策略之一。與使用後者相關的優點不僅是其生產的可行性，亦有在不同藥理學性質的分子之間建立化學計量關係的可能性。此外，已經顯示一些融合介素(fusokine)相較於個別親代的(parental)細胞介素具有較優異的治療效果，甚至與其組合相比也是如此(Stagg J. et al (2004) *Cancer Research*, 64: 8795-8799; Acres B. (2005) *Cancer Research*, 65: 9536-9546)；US 2011/0150828。最近在融合介素研究中描述的治療策略之一是腫瘤內投予編碼基於第1型IFN和TGF β 受體胞外結構域(ectodomain)的融合蛋白之mRNA，其顯示抗腫瘤效果。mRNA的腫瘤內轉移技術是一種高度通用、可再現的、簡易且適應性強的治療工具，非常適合臨床狀況(Van der Jeught et al (2015), *OncoImmunology*, 4: 5)。

【0004】與抗腫瘤治療相關的兩種細胞介素為第1型干擾素：IFN α 以及IL2，它們是治療癌症所需的T輔助細胞1反應模式(T helper 1 response pattern)之有效誘導物。先前已經描述了IFN α 對惡性細胞的直接抗腫瘤作用。它與細胞生長抑制(cytostatic)、抗增生作用和細胞外基質蛋白酶量(level)降低有關，它們涉及侵襲和轉移的過程，並與疾病的預後較差有關。另一方面，此細胞介素促進抗原呈現細胞的成熟與遷移、誘導 α CD8樹突細胞中的交叉呈現

(cross-presentation) 以及淋巴細胞活化 (Chikkala et al (1990) *Cancer Research*, 50: 1176-1182)。它已描述 IFN α 保護 T 細胞免於抗原媒介之活化所造成的線粒體依賴性細胞凋亡，因而以經調節的方式有利於克隆擴增 (clonal expansion) 的過程 (Dondi et al (2004) *The Journal of Immunology*, 173 (6): 3740-3747)。

【0005】在另一方面，細胞介素 IL2 為自體分泌因子 (autocrine factor)，其促進抗原活化之 T 淋巴細胞的增生。然而，它以高於效應細胞 (effector cell) 的親和性而結合至調節 T 淋巴細胞，因而誘導其增生，從而對於抗腫瘤效果有負面影響 (Chaput et al (2007). *J Immunol*, 179: 4969-4978)。改良此分子之治療效果的這些策略之一是開發基於合理設計的突變形成之蛋白質 (mutein)。這是在分子免疫學中心產生的 IL2 促效劑突變蛋白質的情況，其無法與調節 T 細胞中表現的高親和力受體結合。在下文中，IL2 促效劑突變蛋白質將稱為無 α IL2 (no alpha IL2) (US 9,206,243 的 SEQ ID NO 6)。由於其對野生型 IL2 的修飾，與調節 T 淋巴細胞相比，無 α IL2 優先擴增 NK 和記憶 CD8T 細胞的效應細胞群。亦描述了相較於野生型 IL2，此分子對健康組織的毒性較低 (Carmenate et al (2013). *of Immunology*, 190: 6230-6238)。

【0006】從體外演化 (遺傳工程) 產生 IL2 的另一種促效劑變體。此種變體稱為 IL2 的超級介素 (superkine) (H9) 展現對 IL2 受體 β 鏈的結合親和力增加，並且刺激 T 淋巴細胞的

強大增生，而與IL2受體的CD25 α 鏈的表現無關。事實上，已經顯示相對於IL2，它能誘導細胞毒性T淋巴細胞的擴增增加、體內增強的抗腫瘤反應、調節T細胞的有限擴增、以及對IL2的毒性降低(Levin et al. (2012) *Nature*, 48: 529-535)。此變異在下文中將稱為H9。

【0007】一些研究建議在癌症治療中IL2和IFN α 組合投予的協同作用。與單獨使用的細胞介素相比，使用IFN α 和IL2的組合顯著增加BR55-2 MAb誘導的抗HT29結腸癌細胞株的抗體依賴性細胞毒性之能力(Flieger et al. (2000) *Cytokine*, 12: 756-761)。在2010年，Konjevic等人說明IL2和IFN α 增加來自臨床IV期轉移性黑素瘤患者的周邊血液樣品的NK細胞之體外活性。兩種細胞介素(IL2與IFN α)皆能刺激NK細胞中NKG2D活化受體的表現，即使在具有CD16高表現的NK細胞亞群(subpopulation)中也是如此；藉由兩種細胞介素的NKG2D誘導與NK細胞活性的誘導相關(Konjevic et al (2010) *Melanoma Research*, 20: 459-67)。

【0008】在文獻中，有描述產生融合蛋白質(其組合兩種細胞介素：野生型IL2與人類IFN α 2b)的報導。在此分子中，IL2直接連接至IFN α 2b，且其抗腫瘤作用未與親代的細胞介素及其組合的抗腫瘤作用比較(He et al (1999) *J Leukoc Biol*, 125: 77-82)，因此沒有證據表示其優於它們。

【0009】考量上述前因，本申請案的發明人產生幾種稱為雙細胞介素(bi-cytokines, BC)的雙功能融合蛋白質，

用於癌症治療。得到兩種雙功能分子(其結合第I型IFN與IL2促效劑)用於癌症治療。為了得到它們，起始點是融合兩種突變形成之蛋白質(mutein)：無 α IL-2或H9以及IFN α 。所提出的這些BC的設計，在下文中分別稱為BC2和BC3，由兩種細胞介素經由免疫球蛋白的Fc區域連接而與Fc γ 受體的有限結合而組成。此Fc區域的存在可結合至新生的(neonatal)Fc受體，允許增加半衰期。這些組合與設計構成這類蛋白質開發的新元素。所得到的分子具有免疫調節作用，以及令人驚訝之體內抗腫瘤性質，它們優於投予各種親代的細胞介素(融合至相同的Fc區域)融合後觀察到的那些，甚至優於以等莫耳量的這些組合。

【發明內容】

【0010】在一具體實施例中，本發明的主題是包括IL2突變形成之蛋白質經由連接子連接至第I型IFN的融合蛋白質。特別地，IL2突變形成之蛋白質(其為本發明之融合蛋白質的部分)的序列被描述於SEQ ID NO 1和2中。IFN(其為該融合蛋白質的結構的部分)是IFN α (SEQ ID NO 3)。

【0011】在特別具體實施例中，本發明之融合蛋白質的特徵在於連接子由突變的人類IgG1的Fc區域以及連接胜肽(connector peptide)組成，並且其序列如SEQ ID NO 5所示。

【0012】此外，本發明所描述之融合蛋白質的序列如SEQ ID NO 6和7所示，以及編碼它們的核酸序列分別如

SEQ ID NO 10和11所示。

【0013】在另一具體實施例中，本發明是關於醫藥組成物，其包括SEQ ID NO 6和7所描述之融合蛋白質作為活性成分以及醫藥上可接受的載體。

【0014】在另一具體實施例中，本發明的主題是本文所述之融合蛋白質在癌症治療之用途；包含編碼該融合蛋白質之核酸分子的腫瘤內注射方法。

【圖式簡單說明】

【0015】圖1為(A)人類IFN α 2b、(B)連接子片段的序列。

【0016】圖2為H9的序列。

【0017】圖3為藉由ELISA評估HEK293T細胞中BC2m和單對照組的短暫表現(transient expression)。

【0018】圖4為藉由西方墨點法(Western blot)對BC2m和單對照組進行免疫鑑定，其中以：(A)IFN α 特異性抗體、(B)IL2特異性抗體。

【0019】圖5(A)為藉由用轉染的HEK293T細胞的上清液處理的MB16F10腫瘤細胞中MHC I表現的誘導測試所測量之BC2m和IFN α -Fc對照組的類IFN α 活性(IFN α -like activity)，(B)為藉由從用轉染的HEK293T細胞的上清液處理的幼稚小鼠的脾細胞培養測試T CD8+淋巴細胞的擴增所測量的BC2m和單對照組Fc-無 α IL2的類IL2活性(IL2-like activity)。

【0020】圖6為藉由ELISA偵測轉導的4T1腫瘤細胞的上清液中的BC2m和單對照組，(A)Fc區域特異性，(B)Fc與IL2區域特異性，(C)Fc與IFN α 區域特異性。

【0021】圖7為在實驗的第25天和第27天，藉由使用轉導的4T1腫瘤細胞評估BC2m的抗腫瘤作用。

【0022】圖8為在實驗的第17天評估腫瘤內注射BC2m的4T1模式中的治療效果。

【實施方式】

【0023】BC的設計

【0024】本發明的融合蛋白質考量預期它們會造成的病理情況而設計。藉由無 α IL-2突變形成之蛋白質(其序列如SEQ ID NO. 1(先前揭露於US 9,206,243 B2的SEQ ID No. 6)所示)與人類IFN α (其序列如本發明之圖1A與SEQ ID. NO 3所示)的融合而形成BC2。具有L234A L235A突變之突變的人類IgG1的Fc區域與參與免疫反應的受體之有限的活化能力相關(Hezareh et al (2001) J Virol., 75 (24): 12161-12168)，並且和連接胜肽(Gly₄Ser)₃形成連接子元件(linker element)。IFN α 分子結合在連接子片段的N-端尾部(Nt)以及在C-端尾部(Ct)的無 α IL2分子。該連接子的序列描述在圖1B與SEQ ID. NO 5中。

【0025】藉由人類IFN α (其序列如圖1A與SEQ ID. NO 3所示)融合至上述H9突變形成之蛋白質(其序列如SEQ ID NO. 2與圖2所示)而形成BC3。連接子元件由具有突變

L234A L235A和參與免疫反應的受體之有限的活化能力之人類IgG1的Fc區域以及連接子胜肽(Gly₄Ser)₃構成。IFN α 分子結合在連接子片段的Nt以及在Ct發現H9分子。該連接子的序列描述在圖1B與SEQ ID. NO 5中。

【0026】

醫藥組成物

【0027】可發現本發明之BC物體(object)作為活性成分，形成適合的不同醫藥組成物的部分，以及醫藥上可接受的載體。該醫藥組成物中的活性成分之濃度是在從1 $\mu\text{g/ml}$ 至20 $\mu\text{g/ml}$ 的範圍內，較佳為從5 $\mu\text{g/ml}$ 至10 $\mu\text{g/ml}$ 。

【0028】醫藥上可接受的載體包含但不限於：鹽水溶液、磷酸鹽緩衝鹽水pH中性、以及類似配方。其他的緩衝劑、分散劑、以及適合投予至患者的非毒性鈍性物質可包含在本發明之組成物中。組成物可為適合投予的溶液，並且通常為無菌且沒有非所欲的粒子。

【0029】

治療用途與處理

【0030】BC的新穎形式部分地歸因於組成它們的細胞介素之連接子元件中存在Fc區域。此Fc區域使得可能藉由蛋白質A親和性色層分析而將其純化，其允許藉由不同途徑(皮下、靜脈內、皮內、肌肉內、腹膜內)作為可溶性蛋白質投予，並且亦增加這些劑在循環中的半衰期，從而改良它們的治療效果。這允許使用較低劑量，因而降低毒性。另一種投予途徑是腫瘤內，與其他途徑相比為毒性較

低。同樣地，與目前在臨床情況中使用的野生型IL2分子相比，無 α IL2或H9的存在與降低的毒性有關。

【0031】此外，在本發明中用於這些BC的投予策略可包含藉由基於基因的治療方法而腫瘤內注射產物，例如腫瘤內注射mRNA並且轉導編碼它們的粒子。腫瘤或浸潤性腫瘤細胞的遺傳修飾，用於表現BC2或BC3，保證這些在腫瘤微環境中的存在，這使得其免疫調節作用以及對腫瘤本身的直接作用成為可能。腫瘤內注射編碼治療劑的核酸之多功能性和高再現性是適合用於治療不同類型腫瘤的平台。

【0032】鑑於這些分子的免疫調節性質，除了以非特異性方式原位增強抗腫瘤反應外，在未來的治療中，可考量藉由與具有各種類型癌症的患者中的標靶治療的可能組合來支持特異性抗原免疫反應的刺激。

【0033】在此方式中，前述BC旨在構成一種新的治療先鋒，其增強目前用於治療癌症的第I型IFN和IL2個體細胞介素的藥理作用。此作用與細胞毒性T細胞優先於調節T細胞的擴增有關，這導致更有效的抗腫瘤免疫反應，並因此導致腫瘤生長的延遲以及受治療個體的更大存活。除此之外，與野生型細胞介素治療相比，所使用的IL2突變形成之蛋白質的毒性程度較低，增加成功的可能性。所有這些反應皆可以轉化為所治療患者之更高的預期壽命和生活品質。

【0034】藉由以下實施例和圖式進一步詳細說明本發

明。然而，這些實施例不應解釋為限制本發明的範圍。

【0035】

實施例

【0036】

實施例 1. 設計與獲得細胞介素的 BC 與單對照組

【0037】為了在小鼠中建立基於第 I 型 IFN 和 IL2 促效劑的 BC 之免疫調節和抗腫瘤作用的模式，產生 SEQ ID NO 8 中描述的 BC2m。這是由以下所組成：第 I 型 IFN (鼠類 IFN α 4 (SEQ. ID NO 4)) 經由 SEQ ID NO 12 所示之連接子片段而融合至 SEQ ID NO 1 描述之無 α IL2 突變形成之蛋白質 (例如 IL2 促效劑)，連接子片段由突變的鼠類 IgG1 之 Fc 區域結合至胜肽連接 (Gly₄Ser)₃ 而組成。Fc 區域中的 D265A 突變降低參與免疫反應的受體之活化能力 (Becker J.C. et al (1996) PNAS, 93: 2702-2707)。無 α IL2 突變形成之蛋白質位在連接子片段的 Ct 端，而 IFN α 4 位在此相同片段的 Nt 端。因此，BC2m 是二聚體與四價分子。

【0038】單對照組被設計為含有各親代的細胞介素融合至突變的鼠類 IgG1 (D265A) 的 Fc 區域並且保持各細胞介素在 BC2m 結構中之相對位置的分子。因此，在單 IFN α 對照組中，此細胞介素結合至上述 Fc 區域的 Nt，而在無 α IL2 的單對照組中，此細胞介素位在上述 Fc 區域的 Ct。因此，IFN α 與無 α IL2 的單對照組為二聚體與二價分子。

【0039】將 BC2m 與單對照組 IFN α -Fc 和 Fc-無 α IL2 基因選殖到 pLV-CMV-IRES-Neo 載體中，用於在較高細胞

(higher cells)中進行短暫表現測定(transient expression assay)。得到的遺傳建構也用作轉移載體，用於獲得用在腫瘤細胞株之遺傳修飾的轉導粒子。藉由使用脂染胺(lipofectamine)的短暫轉染檢查該等基因在HEK293T細胞中的表現。藉由對鼠類Fc區域特異的ELISA進行上清液中不同重組分子的定量。

【0040】

BC2與BC3的產生

【0041】關於BC2與BC3人類BC的建構，使用人類IFN α (SEQ ID NO 3與圖1A)以及SEQ ID NO. 1和2分別所述之促效劑突變形成之蛋白質無 α IL2和H9。使用具有L234A L235A突變和參與免疫反應的受體之有限的活化能力之突變的人類IgG1的Fc區域以及連接子胜肽(Gly₄Ser)₃作為連接子；該連接子如SEQ ID NO. 5與圖1B所示。IFN α 分子結合在連接子片段的Nt，且無 α IL2或H9在連接子的Ct。

【0042】雙功能(bifunctional)蛋白質BC2與BC3的最終設計分別如SEQ ID NO. 6與7所示。將BC2與BC3的基因選殖在轉移載體pLV-CMV-IRES-Neo中，用於在較高細胞中穩定表現。藉由在HEK293T細胞中用脂染胺(lipofectamine)進行短暫表現測定來檢查這些基因的功能，其中藉由對人類Fc區特異性的ELISA定量重組分子。

【0043】

實施例2. BC2m表現為完整且有功能的蛋白質

【0044】一旦得到BC2m構築體與單對照組IFN α -Fc和

Fc-無 α IL2，對於HEK293T細胞進行短暫轉染測定，以評估這些分子設計的可行性。在培養72小時之後，移除上清液，並且進行對鼠類Fc區域有特異性的ELISA。為此，用對鼠類IgG分子特異性的抗體塗覆聚苯乙烯盤，並與用含有BC2m基因和單對照組的各種構築體轉染之細胞的上清液一起培養。最後，使用接合在酵素過氧化酶之對於鼠類IgG的Fc區域有特異性的抗體，進行偵測。從用鼠類IgG在標準曲線中的492nm處之吸光值的內插，計算重組蛋白質的濃度。藉由此測試，可偵測有興趣的三種蛋白質之表現，並檢查設計形式的功能性(圖3)。

【0045】同樣地，藉由進行對於細胞介素IFN α 和IL2有特異性的西方墨點法測定，可檢查其在BC2m之結構中的存在(圖4A與B)。同樣地，經驗證，BC2m表現為蛋白質，在非還原和還原條件下，其電泳遷移分別對應於二聚體的理論大小為120k Da且單體為60kDa。在相應的單對照組IFN α -Fc和Fc-無 α IL2中亦檢查這些細胞介素的鑑定，並且根據設計偵測到的電泳遷移對應於預期的大小(圖4A與4B)。

【0046】

實施例3. BC2m保留對應於細胞介素IFN α 和IL2的生物活性

【0047】為了確定IFN α 4和無 α IL2突變形成之蛋白質的部分是否在BC2m和單對照組的結構中有活性，用對應的遺傳構築體轉染的HEK293T細胞的上清液並且使用等莫

耳量的分子，進行體外實驗。將未轉染的HEK293T細胞的上清液作為負對照組。在類IFN α 活性的情況下，藉由流式細胞儀評估在24小時期間用該上清液處理的MB16F10黑色素瘤細胞之表面上MHCI表現的增加。相對於使用負對照組所獲得的結果，含有BC2m或IFN α -Fc對照組的上清液可刺激經處理之腫瘤細胞中的MHCI之表現，其表示在BC2的結構中保留IFN α 的活性功能性(圖5A)。

【0048】為了確定BC2m中存在的無 α IL2和Fc-無 α IL2對照組是否展現生物活性，用來自幼稚小鼠的脾細胞培養物進行CD8+淋巴細胞增生刺激測定。來自C57BL/6小鼠的脾細胞用CFSE試劑標記，並在含有BC2m或Fc-無 α IL2對照組之轉染的HEK293T細胞的上清液存在下培養72小時。在實驗結束時，分析增生中CD8+ T淋巴細胞的百分比。使用以未轉染的HEK293T細胞的上清液培養的脾細胞作為負對照組，並且藉由分別除以對於以BC2m或Fc-無 α IL2所處理之脾細胞的增生的CD8+ T細胞之百分比與對應於負對照組的值來計算CD8+ T淋巴細胞的增生比率(Proliferation Ratio, Pr)。

【0049】在圖5B中，含有BC2和Fc-無 α IL2的上清液能誘導脾細胞增生，分別比負對照組多4倍和5倍。這些結果說明該融合蛋白質的結構中含有的無 α IL2部分保留其生物性質。

【0050】

實施例4. 藉由慢病毒轉導(lentiviral transduction)遺傳修

飾的4T1腫瘤細胞分泌BC2m

【0051】為了評估BC2m在體內的抗腫瘤活性，選擇轉導的腫瘤細胞的方法，使用4T1乳癌作為模式。用編碼BC2m和單對照組的慢病毒粒子轉導細胞。使用以空的pLV-CMV-IRES-Neo載體(模擬對照組)轉導的腫瘤細胞作為負對照組。將轉導的細胞維持在選擇性培養基(含有G-418抗生素)中10天，並且藉由ELISA測量上清液中重組分子的濃度，以偵測鼠類免疫球蛋白的Fc部分。藉由此技術在轉導的腫瘤細胞的上清液中偵測BC2m和單對照組(圖6A)。

【0052】此外，藉由夾心ELISA確認BC2m和單對照組中無 α IL2部分和IFN α 的存在。在它們中之一，將轉導的細胞之上清液在塗覆有抗-Fc抗體的盤上培養，並且以順序添加對IL2有特異性的兔抗體和接合至酵素過氧化酶的抗兔免疫球蛋白抗體檢測IL2部分。因此，在BC2m和單Fc-無 α IL2對照組的結構中偵測到Fc-IL2部分(圖6B)。在另一測定中，將轉導細胞的上清液在塗覆抗-IFN α 抗體的盤上培養，並用對於與酵素過氧化酶接合之鼠類IgG的Fc區域有特異性的抗體偵測Fc部分。在BC2m和單IFN α -Fc對照組中偵測到IFN α -Fc部分(圖6C)。

【0053】

實施例5. BC2m顯示出優於個別細胞介素IFN α -Fc與Fc-無 α IL2或其組合的對照組之抗腫瘤效果

【0054】為了比較BC2m相對於對照組的抗腫瘤效

果，評估了來自分泌不同分子的4T1細胞的植入腫瘤之生長。構思了五組待治療的動物：其中三組接受4T1-模擬(4T1-Mock)、4T1-IFN α -Fc或4T1-Fc-無 α IL2細胞，而其餘兩組接種無 α 4T1-IFN α -Fc+4T1-FcIL2或4T1-BC2m細胞的組合。皮下投予100000個總細胞。考量轉導株表現不同量(level)的重組蛋白質，在一些情況下將它們與模擬細胞混合以確保分泌的蛋白質/總細胞比率在所有組中是相等的。

【0055】關於結果的分析，在實驗的第25天和第27天，藉由Fisher精確測試(Fisher's exact test)，在不同組中進行具有與4T1-模擬組中發現的最小體積更小或相等體積的腫瘤之動物頻率的配對比較。

【0056】如圖7中所觀察到的，在第25天和第27天，相較於單獨個別對照組及其組合，在接受4T1-BC2m細胞的組中，具有尺寸小於或等於模擬(Mock)對照組中觀察到之最低值的腫瘤的動物的頻率顯著較高(Fisher精確測試， $p < 0.05$)。在接受4T1-IFN α -Fc+4T1-Fc無 α IL2細胞之組合的組中，未觀察到這種現象，其中評估的頻率與用每種單一療法治療的組相比沒有差異(結果未顯示，Fisher精確測試， $p > 0.05$)。

【0057】這些結果表示BC2m的治療優勢，由於它們指出IFN α 與無 α IL2的結合導致定性或定量不同的分子和細胞機制的活化，其發揮增強的抗腫瘤反應，高於共同投予細胞介素IFN α -Fc與無 α IL2的單對照組或個別投予這些

細胞介素所獲得的抗腫瘤反應。

【0058】

實施例 6. 在 4T1 模型中，腫瘤內注射 BC2m 比單對照組 IFN α -Fc 和 Fc-無 α IL2 具有更大的抗腫瘤效果

【0059】將 4T1 細胞接種於 BALB/c 免疫活性鼠中。10 天之後，腫瘤內注射等莫耳量的 IFN α -Fc、Fc-無 α IL2 和 BC2m，其包含在先前轉染的 HEK293T 細胞的上清液中。另一組接受注射含有 IFN α -Fc 和 Fc-無 α IL2 的上清液混合物，從而確保每種細胞介素相對於單對照組和 BC2m 的等莫耳量 (equimolarity)。使用未轉染的 HEK293T 細胞的上清液作為負對照組。以每天頻率注射上清液達 4 天。如圖 8 所示，在實驗的第 17 天，用 BC2m 處理的小鼠中 100% 具有腫瘤體積小於負對照組的平均值，這是在任何其他治療組中未觀察到的結果。在用 BC2m 治療的組中，具有腫瘤尺寸小於負對照組之平均值的動物之頻率高於接受個別療法 IFN α -Fc 或 Fc-無 α IL2 的任何組 (Fisher 精確測試， $p < 0.05$)。然而，在用 IFN α -Fc 和 Fc-無 α IL2 之組合治療的組中，具有腫瘤尺寸小於負對照組之平均腫瘤尺寸的動物之頻率高於單控制組 IFN α -Fc。相對地，此頻率相對於 Fc-無 α IL2 對照組非較高，這表示需要在同一分子中結合 IFN α 和無 α IL2 細胞介素以達成更有效的保護效果。這可能是由於可能活化與兩種分子之受體同時刺激相關的分子和細胞機制。總而言之，關於親代的細胞介素 (parental cytokine)，這些證據支持在腫瘤中局部投予 BC2m 的優越治療價值。

【序列表】

<110> 分子免疫學中心(Centro de Inmunologia Molecular)
 <120> 介白素-2 突變形成之蛋白質與第 I 型干擾素所構成之融合蛋白質
 <130> 592018CU00
 <140> TW 108115578
 <141> 2019-05-06
 <150> CU 2018-000039
 <151> 2018-05-07
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 藉由 DNA 重組技術
 <400> 1
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Ala Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

第 108115578 號

民國 112 年 5 月 10 日修正

<210> 2
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 藉由 DNA 重組技術

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 3
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 藉由 DNA 重組技術

<400> 3

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln

35

40

45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130 135 140Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145 150 155 160Leu Arg Ser Lys Glu
165

<210> 4
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 藉由 DNA 重組技術

<400> 4

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

第 108115578 號

民國 112 年 5 月 10 日修正

Leu Leu Asp Ser Phe Cys Asn Asp Leu His Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85 90 95

Lys Ala Cys Val Met Gln Glu Pro Pro Leu Thr Gln Glu Asp Ser Leu
100 105 110

Leu Ala Val Arg Thr Tyr Phe His Arg Ile Thr Val Tyr Leu Arg Lys
115 120 125

Lys Lys His Ser Leu Cys Ala Trp Glu Val Ile Arg Ala Glu Val Trp
130 135 140

Arg Ala Leu Ser Ser Ser Thr Asn Leu Leu Ala Arg Leu Ser Glu Glu
145 150 155 160

Lys Glu

<210> 5
<211> 246
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 藉由 DNA 重組技術

<400> 5

Ala Ala Ala Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
1 5 10 15

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

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

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

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

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

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 165 170 175

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 195 200 205

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 245

<210> 6
 <211> 544
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 藉由 DNA 重組技術

<400> 6

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110
 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140
 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Ser Lys Glu Ala Ala Ala Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 165 170 175
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 180 185 190
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 195 200 205
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 210 215 220
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 225 230 235 240
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 245 250 255
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 260 265 270
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 275 280 285
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 290 295 300
 Glu Glu Val Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 305 310 315 320
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 325 330 335
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 340 345 350

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 355 360 365

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 370 375 380

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser
 405 410 415

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
 420 425 430

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
 435 440 445

Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
 450 455 460

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Ala Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
 465 470 475 480

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
 485 490 495

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
 500 505 510

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
 515 520 525

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 530 535 540

<210> 7
 <211> 544
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 藉由 DNA 重組技術

<400> 7

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Lys Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35 40 45
 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50 55 60
 Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80
 Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85 90 95
 Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 100 105 110
 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 130 135 140
 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Ser Lys Glu Ala Ala Ala Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 165 170 175
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 180 185 190
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 195 200 205
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 210 215 220
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 225 230 235 240
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 245 250 255
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 260 265 270
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 275 280 285

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 290 295 300
 Glu Glu Val Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 305 310 315 320
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 325 330 335
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 340 345 350
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 355 360 365
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 370 375 380
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser
 405 410 415
 Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
 420 425 430
 Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
 435 440 445
 Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
 450 455 460
 Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
 465 470 475 480
 Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Phe Asp Pro Arg Asp Val
 485 490 495
 Val Ser Asn Ile Asn Val Phe Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
 500 505 510
 Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
 515 520 525
 Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 530 535 540

<210> 8
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 藉由 DNA 重組技術

<400> 8

Cys Asp Leu Pro His Thr Tyr Asn Leu Gly Asn Lys Arg Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Val Leu Glu Glu Met Arg Arg Leu Pro Pro Leu Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

Arg Lys Asp Phe Gly Phe Pro Leu Glu Lys Val Asp Asn Gln Gln Ile
 35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Ile Leu Val Leu Arg Asp Leu Thr Gln Gln Ile
 50 55 60

Leu Asn Leu Phe Thr Ser Lys Asp Leu Ser Ala Thr Trp Asn Ala Thr
 65 70 75 80

Leu Leu Asp Ser Phe Cys Asn Asp Leu His Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95

Lys Ala Cys Val Met Gln Glu Pro Pro Leu Thr Gln Glu Asp Ser Leu
 100 105 110

Leu Ala Val Arg Thr Tyr Phe His Arg Ile Thr Val Tyr Leu Arg Lys
 115 120 125

Lys Lys His Ser Leu Cys Ala Trp Glu Val Ile Arg Ala Glu Val Trp
 130 135 140

Arg Ala Leu Ser Ser Ser Thr Asn Leu Leu Ala Arg Leu Ser Glu Glu
 145 150 155 160

Lys Glu Ala Ala Ala Ser Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro
 165 170 175

Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
 180 185 190

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser
 195 200 205

Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
 210 215 220

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 225 230 235 240
 Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
 245 250 255
 Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
 260 265 270
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
 275 280 285
 Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
 290 295 300
 Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val
 305 310 315 320
 Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
 325 330 335
 Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
 340 345 350
 Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
 355 360 365
 Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
 370 375 380
 Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 405 410 415
 Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn
 420 425 430
 Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala
 435 440 445
 Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu
 450 455 460
 Ala Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn
 465 470 475 480

第 108115578 號

民國 112 年 5 月 10 日修正

Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val
 485 490 495

Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp
 500 505 510

Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser
 515 520 525

Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 530 535

<210> 9
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 藉由 DNA 重組技術

<400> 9

Cys Asp Leu Pro His Thr Tyr Asn Leu Gly Asn Lys Arg Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Val Leu Glu Glu Met Arg Arg Leu Pro Pro Leu Ser Cys Leu Lys Asp
 20 25 30

Arg Lys Asp Phe Gly Phe Pro Leu Glu Lys Val Asp Asn Gln Gln Ile
 35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Ile Leu Val Leu Arg Asp Leu Thr Gln Gln Ile
 50 55 60

Leu Asn Leu Phe Thr Ser Lys Asp Leu Ser Ala Thr Trp Asn Ala Thr
 65 70 75 80

Leu Leu Asp Ser Phe Cys Asn Asp Leu His Gln Gln Leu Asn Asp Leu
 85 90 95

Lys Ala Cys Val Met Gln Glu Pro Pro Leu Thr Gln Glu Asp Ser Leu
 100 105 110

Leu Ala Val Arg Thr Tyr Phe His Arg Ile Thr Val Tyr Leu Arg Lys
 115 120 125

Lys Lys His Ser Leu Cys Ala Trp Glu Val Ile Arg Ala Glu Val Trp
 130 135 140

Arg Ala Leu Ser Ser Ser Thr Asn Leu Leu Ala Arg Leu Ser Glu Glu
 145 150 155 160

Lys Glu Ala Ala Ala Ser Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro
 165 170 175
 Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
 180 185 190
 Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser
 195 200 205
 Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
 210 215 220
 Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 225 230 235 240
 Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
 245 250 255
 Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
 260 265 270
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
 275 280 285
 Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
 290 295 300
 Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val
 305 310 315 320
 Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
 325 330 335
 Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
 340 345 350
 Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
 355 360 365
 Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
 370 375 380
 Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
 405 410 415

Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn
420 425 430

Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr
435 440 445

Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu
450 455 460

Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn
465 470 475 480

Phe His Phe Asp Pro Arg Asp Val Val Ser Asn Ile Asn Val Phe Val
485 490 495

Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp
500 505 510

Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys
515 520 525

Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
530 535

<210> 10
<211> 1563
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 藉由 DNA 重組技術

<400> 10
 tgcgatctgc cccacaccta caacctgggc aacaagagag ccctgaccgt gctggaggag 60
 atgaggagac tgcctcctct gtctgcctg aaggacagga aggacttcgg ctteccccctg 120
 gagaaggtgg acaaccagca gatccagaag gcccaggcta tcttggtgct gagagacctg 180
 acacagcaga tctgaacct gttcacctcc aaggacctgt ctgccacctg gaatgccacc 240
 ctgctggact ccttctgcaa cgacctgcac cagcagctga acgacctgaa ggcttgcgtg 300
 atgcaggagc ctctctgac ccaggaggat tctctgctgg ctgtgctggac ctacttccac 360
 cggatcaccg tgtacctgcg gaagaagaag cactctctgt ggcctggga ggtgatcaga 420
 gccgaagtgt ggagaccct gtctcctct accaacctgc tggccaggct gtctgaggag 480
 aaggaggcgg ccgcttctgg ttgtaagcct tgcatatgta cagtcccaga agtatcatct 540
 gtcttcatct tcccccaaa gccaaggat gtgctcacca ttactctgac tectaaggtc 600
 acgtgtgttg tggtagccat cagcaaggat gatcccagg tccagttcag ctggtttgta 660
 gatgatgtgg aggtgcacac agctcagacg caaccccgagg agtagcagtt caacagcact 720

ttccgctcag tcagtgaact tcccatcatg caccaggact ggctcaatgg caaggagttc 780
 aaatgcaggg tcaacagtgc agctttccct gccccatcg agaaaacat ctccaaaacc 840
 aaaggcagac cgaaggctcc acaggtgtac accattccac ctcccaagga gcagatggcc 900
 aaggataaag tcagtctgac ctgcatgata acagacttct tcctgaaga cattactgtg 960
 gagtggcagt ggaatgggca gccagcggag aactacaaga aactcagcc catcatggac 1020
 acagatggct cttacttctg ctacagcaag ctcaatgtgc agaagagcaa ctgggaggea 1080
 ggaaatactt tcacctgctc tgtgttacat gagggcctgc acaaccacca tactgagaag 1140
 agcctctccc actctcctgg taaagcccc acctccagca gcaccaagaa aactcagctc 1200
 cagctcgaac atctgctgct ggatctgcag atgatcctga acggcatcaa caactacaag 1260
 aacccaagc tgaccgcat gctgacagcc aagttcgcca tgccaagaa ggccaccgag 1320
 ctgaagcadc tgcaagtgcct ggaagaggcc ctgaagcctc tggaagaggt gctgaacctg 1380
 gccagtcaca agaacttcca cctgaggccc agggacctga tcagcaacat caacgtgatc 1440
 gtgctggaac tgaagggcag cgagacaacc ttcattgtcg agtacgccga cgagacagca 1500
 acaatcgtgg agtttctgaa ccggtggatc accttcagcc agagcatcat cagcacctg 1560
 acc 1563

<210> 11
 <211> 1632
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 藉由 DNA 重組技術

<400> 11
 tgcgatctgc cgcagacca tagcctgggc agccgccga ccctgatgct gctggcgcag 60
 atgcgcaaaa ttagcctggt tagctgcctg aaagatcgcc atgattttgg ctttccgcag 120
 gaagaatttg gcaaccagtt tcagaaagcg gaaaccattc cgggtgctgca tgaatgatt 180
 cagcagattt ttaacctggt tagcaccaaa gatagcagcg cggcgtggga tgaaccctg 240
 ctggataaat ttataaccga actgtatcag cagctgaacg atctggaagc gtgcgtgatt 300
 cagggcgtgg gcgtgaccga aaccccgctg atgaaagaag atagcattct ggcggtgccc 360
 aaatattttc agcgcattac cctgtatctg aaagaaaaaa aatatagccc gtgcgctgg 420
 gaagtgggtg gcgcggaaat tatgcccagc tttagcctga gcaccaacct gcaggaaagc 480
 ctgcgcagca aagaagcggc cgctagcgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 540
 cctgaagccg cggggggacc gtcagcttct ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 600
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 660
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg 720
 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctaccgt cctgcaccag 780

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 840
 atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg cagcccccag aaccacaggt gtacaccctg 900
 ccccatccc gggaggaggt gaccaagaac caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc 960
 ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1020
 aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tctctatag caagctcacc 1080
 gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1140
 ctgcacaacc actacacgca gaagtcgctc agcctgtccc cgggtaaagg tggaggcgggt 1200
 tcaggcggag gtggttctgg cgtggcggga tcggcgccga ccagcagcag caccaaaaaa 1260
 acccagctgc agctggaaca tctgtctgtg gatctgcaga tgattctgaa cggcattaac 1320
 aactataaaa acccgaaact gaccgcgatg ctgaccttta aattttatat gccgaaaaaa 1380
 gcgaccgaac tgaacatctt gcagtgcctg gaagaagaac tgaaccgct ggaagaagtg 1440
 ctgaacctgg cgcagagcaa aaactttcat tttgatccgc gcgatgtggt gagcaacatt 1500
 aacgtgtttg tgctggaact gaaaggcagc gaaaccacct ttatgtgca atatgcggat 1560
 gaaaccgca ccattgtgga atttctgaac cgctggatta ccttttgcca gagcattatt 1620
 agcaccctga cc 1632

<210> 12
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 藉由 DNA 重組技術

<400> 12

Ala Ala Ala Ser Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val
1 5 10 15

Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile
20 25 30

Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp
35 40 45

Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His
50 55 60

Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
65 70 75 80

Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
85 90 95

Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu
 100 105 110

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

Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu
 130 135 140

Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp
 145 150 155 160

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

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

Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His
 195 200 205

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
 210 215 220

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Ser

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種融合蛋白質，其包括連接至第I型干擾素(IFN)的IL2促效劑突變形成之蛋白質，其中該IL2促效劑突變形成之蛋白質具有選自由SEQ ID NO 1及SEQ ID NO 2所組成之群組的序列，其藉由突變的人類IgG1的Fc區域鍵結，連接連接胜肽(connector peptide)至序列如SEQ ID NO 3所示之該第I型IFN。

【第2項】

如申請專利範圍第1項之融合蛋白質，其中該第I型IFN是人類IFN α 。

【第3項】

如申請專利範圍第1項之融合蛋白質，其具有如SEQ ID NO 5所示之序列的连接子。

【第4項】

如申請專利範圍第1項之融合蛋白質，其具有如SEQ ID NO 6所示之序列。

【第5項】

如申請專利範圍第1項之融合蛋白質，其具有如SEQ ID NO 7所示之序列。

【第6項】

一種包括編碼申請專利範圍第4項之融合蛋白質的核苷酸序列之核酸分子，其具有如SEQ. ID NO 10所示之序列。

【第7項】

一種包括編碼申請專利範圍第5項之融合蛋白質的核苷酸序列之核酸分子，其具有如SEQ. ID NO 11所示之序列。

【第8項】

一種 mRNA 分子，其編碼申請專利範圍第4項與第5項中任一項之融合蛋白質。

【第9項】

一種醫藥組成物，其包括濃度範圍從 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的申請專利範圍第4項與第5項中任一項之融合蛋白質作為活性成分，以及醫藥上可接受的載體。

【第10項】

一種申請專利範圍第4項與第5項中任一項之融合蛋白質在製造用於癌症治療的藥劑之用途。

【第11項】

一種申請專利範圍第6項與第7項中任一項之核酸分子在製造用於腫瘤內注射的藥劑之用途。

【發明圖式】

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVL
 HEMIQQIFNLFSTKSSAAWDETLLDKFYTELYQQQLNDLEACVIQGVGTETPLMK
 EDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

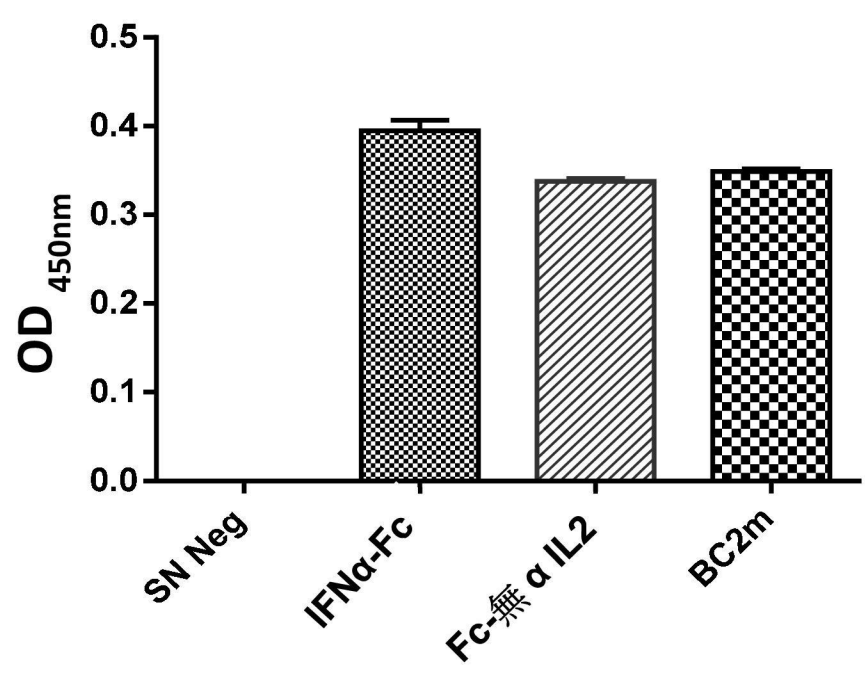
【圖 1A】

AAASDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRREEVTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGKGGGGSGGGGGGGGGGS

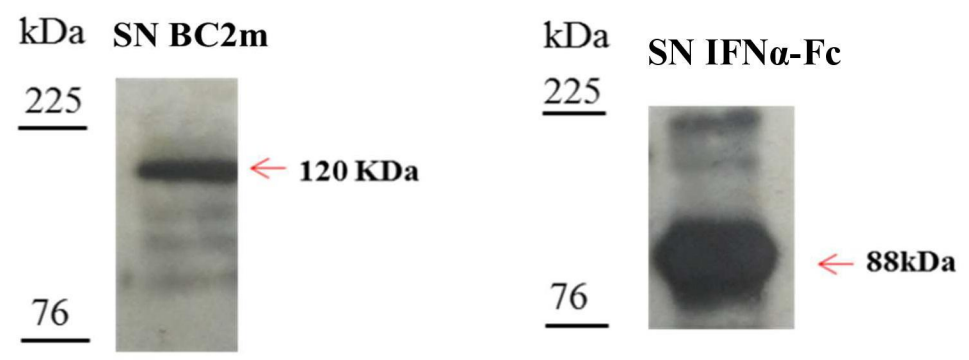
【圖 1B】

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLIRMLTFKFYMP
 KKATELKHLLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHFDPRDVVSNINVEVL
 ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

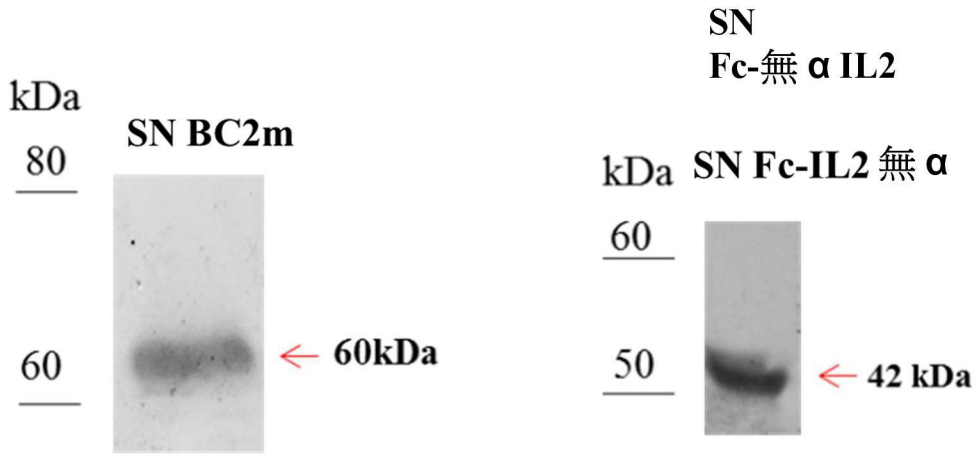
【圖 2】



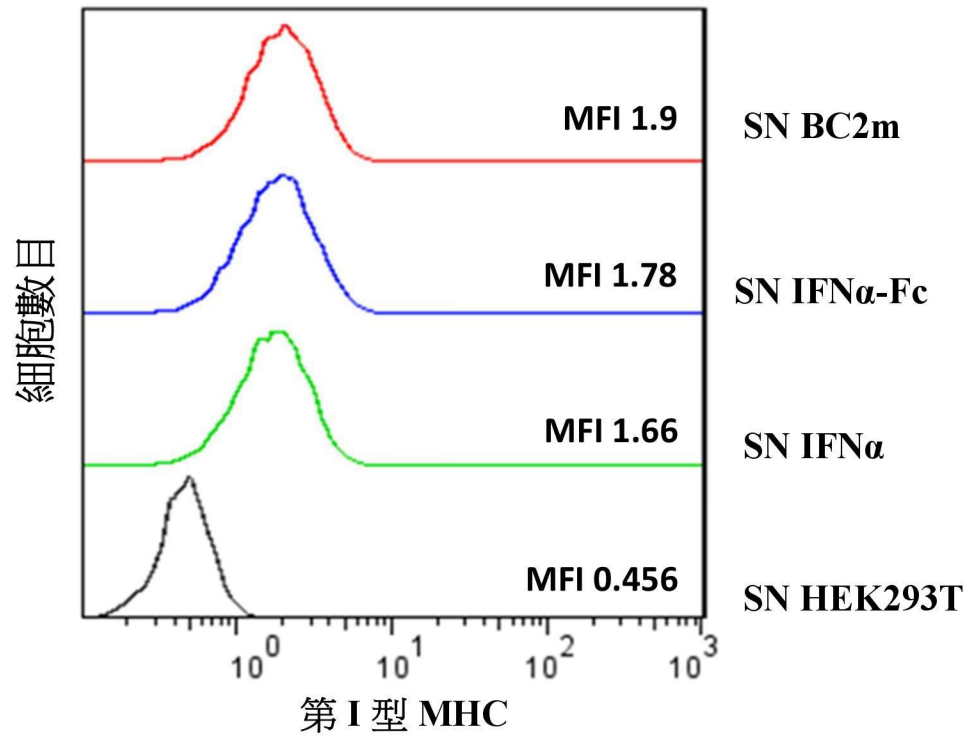
【圖 3】



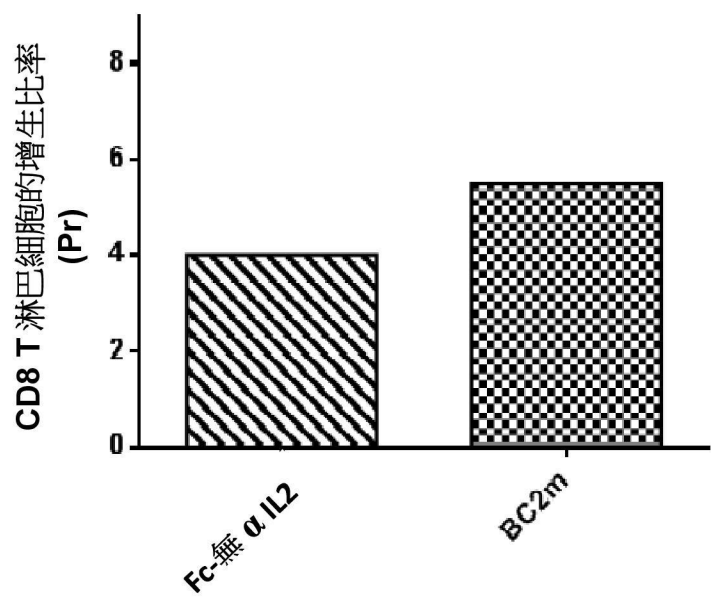
【圖 4A】



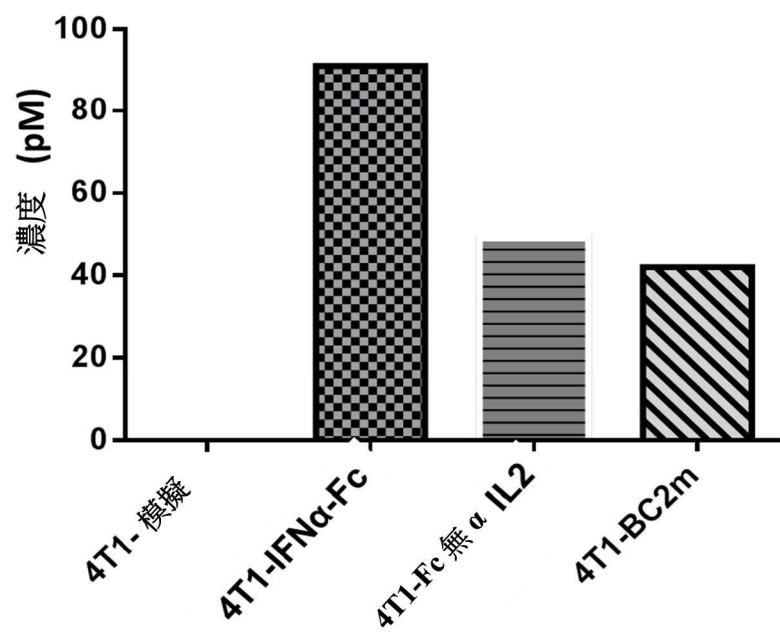
【圖 4B】



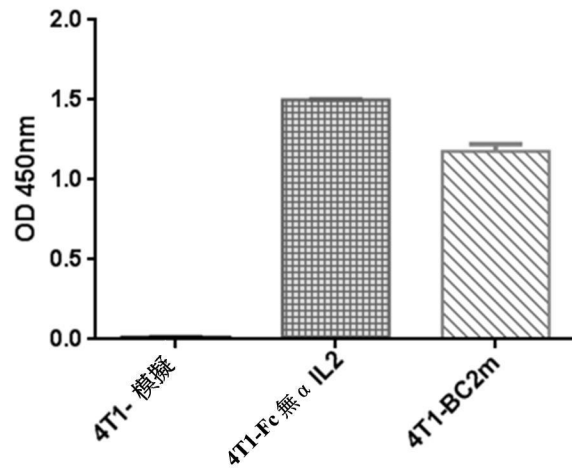
【圖 5A】



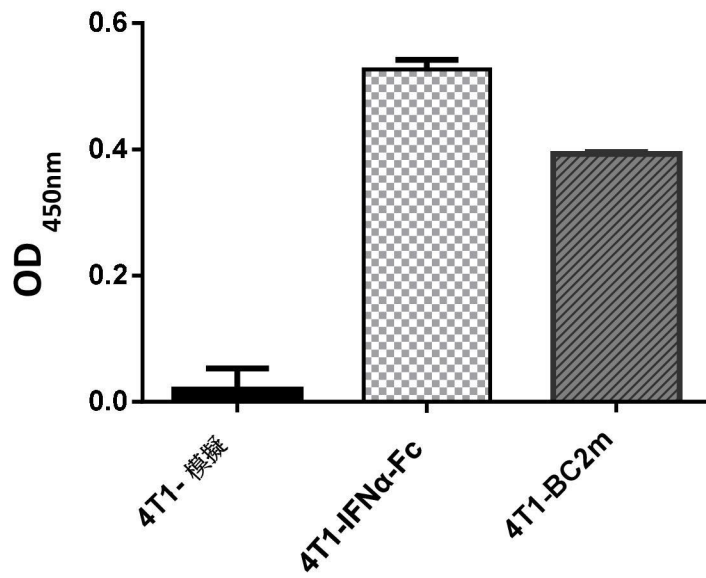
【圖 5B】



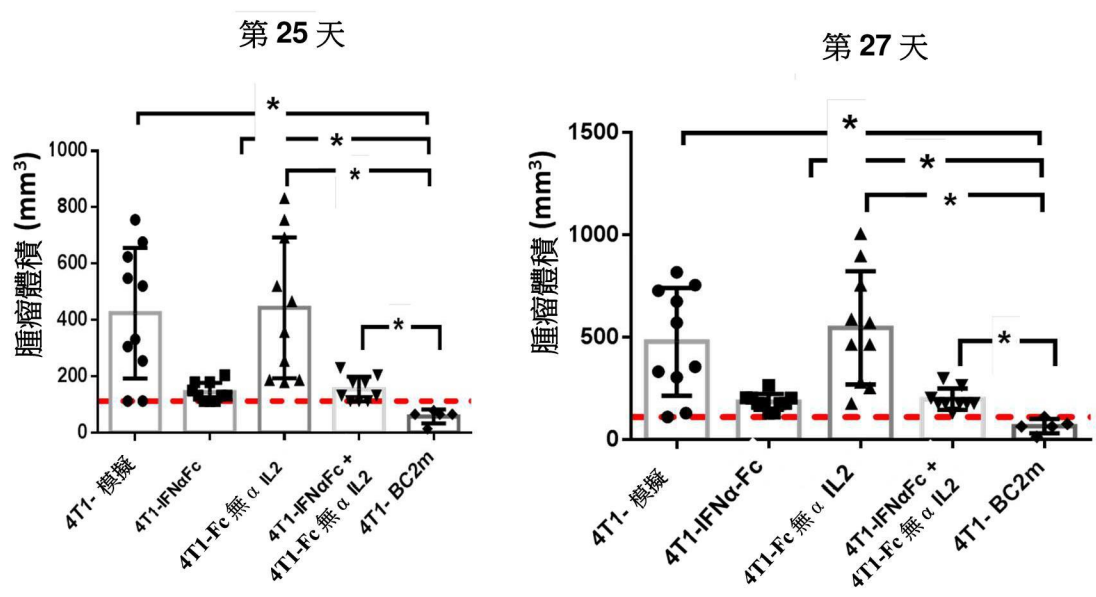
【圖 6A】



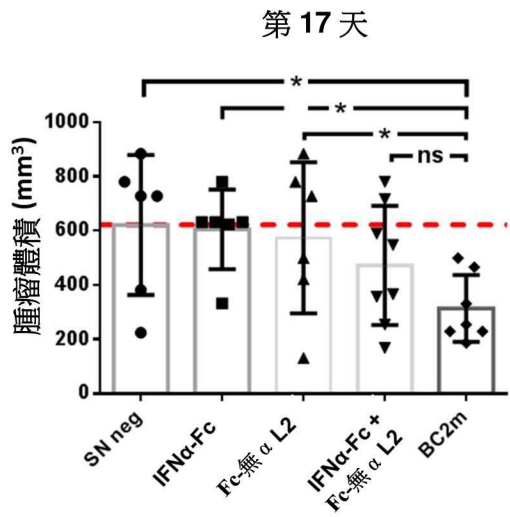
【圖 6B】



【圖 6C】



【圖 7】



【圖 8】