



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113234138 A

(43) 申请公布日 2021.08.10

(21) 申请号 202110571465.2

A61K 38/20 (2006.01)

(22) 申请日 2015.08.10

A61P 3/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 37/02 (2006.01)

62/070,016 2014.08.11 US

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201580053284.3 2015.08.10

(71) 申请人 德里尼亚公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 杰弗里·格雷夫

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 陆扬 郑霞

(51) Int. Cl.

C07K 14/55 (2006.01)

C07K 1/107 (2006.01)

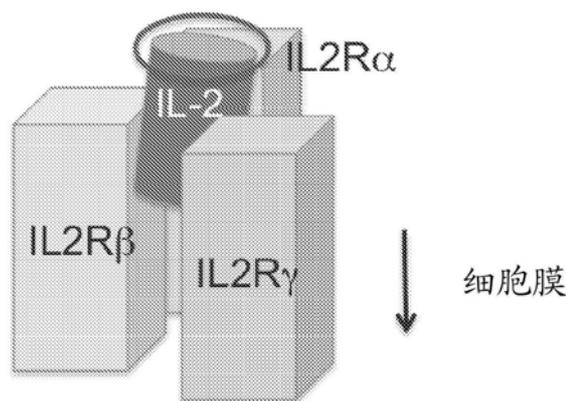
权利要求书2页 说明书16页  
序列表4页 附图5页

(54) 发明名称

选择性地活化调节性T细胞用于治疗自身免疫病的修饰的IL-2变体

(57) 摘要

本申请涉及选择性地活化调节性T细胞用于治疗自身免疫病的修饰的IL-2变体。本文描述的发明是一种新的IL-2蛋白,该IL-2蛋白具有对调节性T细胞的选择性激动剂活性并具有另外的氨基酸取代,所述另外的氨基酸取代使得能够与聚乙二醇(PEG)化学缀合,以与单独的IL-2选择性激动剂相比增加循环半衰期。优选的IL-2选择性激动剂变体是IL2/N88R/C125S/D109C。



1. 一种IL-2变体蛋白,所述IL-2变体蛋白与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少95%序列同一性并相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列包含取代D109C。

2. 权利要求1所述的IL-2变体蛋白,所述IL-2变体蛋白与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少98%序列同一性。

3. 权利要求1所述的IL-2变体蛋白,所述IL-2变体蛋白具有连接至在位置109的半胱氨酸的聚乙二醇部分,其中所述聚乙二醇部分具有5和40kDa之间的分子量。

4. 权利要求1所述的IL-2变体蛋白,其中所述IL-2变体蛋白相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列含有选自由以下组成的组的至少一个取代:N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L和Q126F。

5. 权利要求4所述的IL-2变体蛋白,所述IL-2变体蛋白相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列还包含取代C125S。

6. 权利要求3所述的IL-2变体蛋白,所述IL-2变体蛋白相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列含有取代N88R和取代C125S。

7. 权利要求6所述的IL-2变体蛋白,所述IL-2变体蛋白与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少98%序列同一性。

8. 权利要求3所述的IL-2变体蛋白,其中所述IL-2变体蛋白包含含有取代N88R、D109C和C125S的SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

9. 一种药物组合物,包含权利要求3所述的IL-2变体蛋白和药学上可接受的载体。

10. 一种增加人类IL-2变体蛋白的循环半衰期的方法,所述人类IL-2变体蛋白与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少95%序列同一性,相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有取代D109C并具有活化T细胞的能力,所述方法包括将聚乙二醇部分连接到位置109处的半胱氨酸残基。

11. 权利要求10所述的方法,其中所述IL-2变体蛋白与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少98%序列同一性。

12. 权利要求10所述的方法,其中所述聚乙二醇部分具有5kDa和40kDa之间的分子量。

13. 权利要求10所述的方法,其中所述IL-2变体蛋白相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列含有选自由以下组成的组的至少一个取代:N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L和Q126F。

14. 权利要求13所述的方法,其中所述IL-2变体蛋白相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列还包含取代C125S。

15. 权利要求13所述的方法,其中所述IL-2变体蛋白相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列包含取代N88R和取代C125S。

16. 权利要求13所述的方法,其中所述IL-2变体蛋白相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少98%序列同一性。

17. 权利要求12所述的方法,其中所述IL-2变体蛋白包含含有取代N88R、D109C和C125S的SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

18. 包含IL-2变体蛋白的组合物在制备用于治疗受试者中的自身免疫病的药物中的用途,其中所述IL-2变体蛋白与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少95%序列同一性,并相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列含有取代D109C。

19. 权利要求18所述的用途,其中所述自身免疫病选自由1型糖尿病、系统性红斑狼疮、移植物抗宿主病和自身免疫血管炎组成的组。

20. 权利要求18或19所述的用途,其中所述IL-2变体蛋白包含含有取代N88R、D109C和C125S的SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

## 选择性地活化调节性T细胞用于治疗自身免疫病的修饰的IL-2变体

[0001] 本申请是申请日为2015年08月10日,申请号为201580053284.3,发明名称为“选择性地活化调节性T细胞用于治疗自身免疫病的修饰的IL-2变体”的申请的分案申请。

[0002] 对相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求2014年8月11日提交的美国临时专利申请第62/070,016号的优先权,其内容通过引用特此并入。

### 技术领域

[0004] 本申请涉及但不限于选择性地活化调节性T细胞用于治疗自身免疫病的修饰的IL-2变体及其用途。

[0005] 发明背景

[0006] 免疫系统必须能够区分自身和非自身。当区分自身/非自身失败时,免疫系统破坏身体的细胞和组织并因此导致自身免疫病。调节性T细胞主动地阻遏免疫系统的活化和阻止病理性的自身反应性和作为结果的自身免疫病。开发选择性活化调节性T细胞的药物和方法用于治疗自身免疫病是密集研究的主题,且直到本发明的开发之前,主要是不成功的。

[0007] 调节性T细胞(Treg)是一类CD4+CD25+T细胞,其阻遏其他免疫细胞的活性。Treg是免疫系统内稳态的中心,并在维持对自身抗原的耐受性和调节对外来抗原的免疫应答中起主要作用。多种自身免疫病和炎性疾病,包括1型糖尿病(T1D)、系统性红斑狼疮(SLE)、和移植物抗宿主病(GVHD),已经显示具有Treg细胞数目或Treg功能的缺陷。因此,在开发加强Treg细胞的数目和/或功能的疗法方面存在极大兴趣。

[0008] 正在研究的用于自身免疫病的一种治疗方法是自体的、离体(ex vivo)扩增的Treg细胞的移植(Tang,Q.,等人,2013,Cold Spring Harb.Perspect.Med.,3:1-15)。尽管这一方法已经在治疗疾病的动物模型和在数个早期人类临床试验中显示出希望,其要求用患者自身的T细胞的个性化治疗,是有创的,并是技术上复杂的。另一种方法是用低剂量白介素-2(IL-2)治疗。Treg细胞特征性地表达高组成水平的高亲和力IL-2受体IL2R $\alpha\beta\gamma$ ,其包括亚基IL2RA(CD25)、IL2RB(CD122)和IL2RG(CD132),且Treg细胞生长已经显示依赖于IL-2(Malek,T.R.,等人,2010,Immunity,33:153-65)。低剂量IL-2治疗慢性GVHD(Koreth,J.,等人,2011,N Engl J Med.,365:2055-66)和HCV相关的自身免疫血管炎患者的临床试验(Saadoun,D.,等人,2011,N Engl J Med.,365:2067-77)已经表明增加的Treg水平和临床效力的迹象。已经开始了研究IL-2在多种其他自身免疫病和炎性疾病中的效力的新的临床试验。

[0009] 在这些试验中使用的IL-2的重组形式Proleukin(由Prometheus Laboratories, San Diego,CA销售),伴有高的毒性。Proleukin被批准用于治疗转移性黑素瘤和转移性肾癌,但其副作用如此严重,以致其使用仅在具有使用重症监护的医院环境中被推荐(网址[www.proleukin.com/assets/pd/proleukin.pdf](http://www.proleukin.com/assets/pd/proleukin.pdf))。直到Treg细胞的最近表征,IL-2被认为是免疫系统刺激物,活化T细胞和其他免疫细胞以消灭癌细胞。由于Treg细胞因其表达IL2R

$\alpha\beta\gamma$  而比许多其他免疫细胞类型响应于更低浓度的IL-2, IL-2在自身免疫病中的临床试验已经采用了较低剂量的IL-2以靶向Treg细胞(Klatzmann D, 2015 Nat Rev Immunol. 15: 283-94)。然而, 即使这些低剂量导致安全性和耐受性问题, 且使用的治疗已经采取了每日皮下注射(长期或以间歇5天的治疗过程)。因此, 对以下的自身免疫病疗法存在需求: 其加强Treg细胞数目和功能, 比IL-2更特异性地靶向Treg细胞, 更安全和更可耐受, 且较不频繁地施用。

[0010] 改进基于IL-2的疗法的治疗指数的一种方法是使用IL-2的变体, 其相对于其他免疫细胞对Treg细胞是选择性的。IL-2受体在包括T细胞、NK细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞的多种不同免疫细胞类型上表达, 且这一宽的表达谱可能促进其对免疫系统的多效作用和高的系统毒性。IL-2受体以三种形式存在: (1) 低亲和力受体IL2RA, 其不发信号; (2) 中等亲和力受体(IL2R $\beta\gamma$ ), 包括IL2RB和IL2RG, 在常规T细胞(Tcons)、NK细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞中广泛表达; 和(3) 高亲和力受体(IL2R $\alpha\beta\gamma$ ), 包括IL2RA、IL2RB和IL2RG, 在活化的T细胞上瞬时表达和在Treg细胞上组成型表达。已经开发了相对于IL2R $\beta\gamma$ 对IL2R $\alpha\beta\gamma$ 选择性的IL-2变体(Shanafelt, A.B., 等人, 2000, Nat Biotechnol. 18:1197-202; Cassell, D.J., 等人, 2002, Curr Pharm Des., 8:2171-83)。这些变体具有减少其对IL2RB的亲合力的氨基酸取代。由于IL-2具有对IL2RG不可检测的亲合力, 这些变体因此具有对IL2R $\beta\gamma$ 受体复合物减少的亲合力和减少的活化表达IL2R $\beta\gamma$ 的细胞的能力, 但保留结合IL2RA的能力和结合并活化IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体复合物的能力。基于表达IL2R $\beta\gamma$ 的NK细胞是对毒性的主要贡献者的假设, 这些变体之一IL2/N88R (Bay 50-4798), 以作为免疫系统刺激物的低毒性形式的IL-2被临床测试。Bay 50-4798显示相对于NK细胞选择性地刺激活化的T细胞的增殖, 并在癌症患者(Margolin, K., 等人, 2007, Clin Cancer Res., 13:3312-9)和HIV患者(Davey, R.T., 等人, 2008, J Interferon Cytokine Res., 28:89-100)的I/II期临床试验中被评价。这些临床试验显示, Bay 50-4798比Proleukin显著地更安全和更可耐受, 并且还显示, 其增加了富集Treg细胞的细胞群体CD4+CD25+T细胞的水平。在这些试验之后, 本领域中的研究更充分地确立了Treg细胞的身份并表明, Treg细胞选择性地表达IL2R $\alpha\beta\gamma$  (在Malek, T.R., 等人, 2010, Immunity, 33:153-65中综述)。基于这一新的研究成果, 现在可理解, IL2R $\alpha\beta\gamma$ 选择性激动剂应对Treg细胞是选择性的。

[0011] 改进基于IL-2的疗法的治疗指数的第二种方法是优化该分子的药代动力学以最大地刺激Treg细胞。IL-2作用的早期研究表明, 体外的人类T细胞增殖的IL-2刺激要求暴露于有效浓度的IL-2至少5-6小时(Cantrell, D.A., 等人, 1984, Science, 224:1312-1316)。当施用于人类患者时, IL-2具有非常短的血浆半衰期: 对于静脉施用85分钟和对于皮下施用3.3小时(Kirchner, G.I., 等人, 1998, Br J Clin Pharmacol. 46:5-10)。由于其短的半衰期, 维持循环中的IL-2处在或高于刺激T细胞增殖持续必要的持续时间必需的水平使高剂量成为必需, 这导致峰值IL-2水平显著高于Treg细胞的EC50或将要求频繁施用(图1)。这些高IL-2峰值水平可活化IL2R $\beta\gamma$ 受体并具有其他非预定的或不利的的作用。具有比IL-2更长的循环半衰期的IL-2类似物可在比IL-2低的浓度和较低峰值水平实现靶药物浓度持续指定的时间段。因此, 此类IL-2类似物将要求比IL-2低的剂量或较不频繁施用来有效刺激Treg细胞。IL-2药物的较不频繁皮下施用也将对于患者更可耐受。具有这些特征的治疗将在临床上转化为改进的药理学效力、减少的毒性、和改进的患者对疗法的顺应性。

[0012] 延长治疗蛋白的半衰期的一种方法是将治疗蛋白与非免疫原性水溶性聚合物如聚乙二醇 (PEG) 缀合。蛋白与PEG分子的化学缀合 (聚乙二醇化) 通过增加蛋白质的有效流体动力学半径来增加循环半衰期, 从而降低蛋白缀合物被肾脏滤出血液的速率。IL-2和IL-2选择性激动剂是大约15,000道尔顿 (15kDa) 的相对小的蛋白, 具有快的肾清除速率。PEG分子的循环半衰期与PEG的分子量成比例地增加 (Yamaoka, T., 等人, 1994 J Pharm Sci. 83: 601-6)。

[0013] 有许多影响聚乙二醇化治疗蛋白的成功生产和制造的因素。首先, 因为通过PEG分子和蛋白的化学缀合制备聚乙二醇化蛋白, 所以重要的是, 由于与聚乙二醇化相关的另外的制造步骤, 可以有效地制造蛋白。第二, PEG部分应当通过特定的氨基酸残基有效地与蛋白缀合, 导致具有高产量的均匀产物。第三, 应选择蛋白上的聚乙二醇化位点, 以便最小地干扰蛋白的治疗活性。干扰蛋白治疗活性可能是由于PEG与蛋白的活性位点的缀合, 或可能是由于PEG对活性位点的空间阻碍。作为一个例子, 先前报道了一种形式的聚乙二醇化IL-2, 其中PEG分子与IL-2上的伯胺缀合, 导致含有每个IL-2分子1和4个之间的PEG聚合物的蛋白物质的异质混合物 (Katre, N.V. 等人, 1987 Proc Natl Acad Sci U S A. 84:1487-91; Knauf, M.J., 等人, 1988 J Biol Chem. 15;263:15064-701988), 其相对于IL-2显示4-6倍的生物活性降低 (Chen, S.A., 2000 J Pharmacol Exp Ther. 293:248-59)。因为IL-2选择性激动剂必须结合并活化Treg细胞上三个受体亚基的复合物, 所以为了最佳的生物活性必须小心选择IL-2上适当的缀合位点。

[0014] 已经开发了化学活化的PEG, 其具有用于与蛋白缀合的许多不同的化学反应性基团, 使得能够与含有伯胺或硫醇基团的氨基酸残基缀合。其中, 独特存在于半胱氨酸残基上的硫醇基团使得PEG能够最有选择性地与蛋白缀合, 并且具有马来酰亚胺或碘乙酰胺反应性基团的PEG与游离半胱氨酸硫醇非常选择性地反应。细胞外蛋白质中的大多数半胱氨酸残基参与使蛋白质构象稳定的二硫键, 且少数游离 (未配对) 半胱氨酸残基通常被埋在蛋白质内部 (Petersen, M.T., 等人, 1999 Protein Eng. 1999 12:535-48)。PEG与蛋白中的游离半胱氨酸残基的缀合需要天然暴露的游离半胱氨酸残基或引入新的游离半胱氨酸残基。将新的游离半胱氨酸工程化到蛋白中具有以下风险: 所引入的新半胱氨酸可与其它半胱氨酸形成不适当的链内二硫键, 从而导致蛋白错误折叠, 或可与其它分子形成链间二硫键, 从而导致蛋白聚集。具有突变的半胱氨酸残基的IL-2变体可以由于二硫键错配而显示出显著降低的活性 (Wang, A., 等人, 1984 Science. 224:1431-3)。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明涉及IL-2的变体, 其在IL-2序列中的特定位置具有单个氨基酸取代, 该单个氨基酸取代使得PEG分子能够稳定和特异性化学缀合, 同时保持IL-2-PEG缀合物活化Treg细胞的能力。选择定义为PEG缀合位点的这些指定的氨基酸位置, 使得由PEG分子与IL-2变体缀合产生的IL-2-PEG缀合物在其结合和活化IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体的能力方面受到最小程度的损害。本发明还涉及IL-2变体上具有上述PEG缀合位点的IL-2变体, 其对IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体是选择性的, 并因此对Treg细胞具有高选择性。

[0017] 本发明的发明聚焦于将新的、游离的半胱氨酸残基工程化到IL-2变体蛋白中, 其将与正确的蛋白折叠相容, 使得能够位点特异性缀合硫醇反应性PEG, 并导致IL-2-PEG缀合物保留结合并活化Treg上的IL2R $\alpha\beta\gamma$ 的能力。

[0018] 本文描述的发明是一种新的IL-2蛋白,具有对调节性T细胞的选择性激动剂活性并具有另外的氨基酸取代,所述另外的氨基酸取代使得能够与聚乙二醇(PEG)化学缀合,以与单独的IL-2选择性激动剂相比增加循环半衰期。基于取代的氨基酸位置在IL-2-IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体复合物对溶剂的暴露,以及聚合物缀合的变体保留结合并活化IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体复合物的能力的预测能力,选择取代的氨基酸位置。构建了一系列重组IL-2变体,其中将半胱氨酸氨基酸残基引入选择的氨基酸位置,并筛选其变体蛋白的活性。将成功表达和纯化的IL-2变体重新折叠,缀合到马来酰亚胺-PEG聚合物,然后测试对调节性T细胞的选择性激动剂活性。如此,鉴定了优选的IL-2选择性激动剂变体IL2/N88R/C125S/D109C。这种新的蛋白及其PEG缀合物将选择性和有效地提高患者调节性T细胞的水平和活性,抑制自身免疫病理,并因此将是治疗自身免疫病的安全有效的治疗剂。

[0019] 本发明还提供与Seq. ID No.1具有至少95%至98%和至100%序列同一性的IL-2变体蛋白,其含有取代D109C并具有活化T细胞的能力。本发明的蛋白可以连接到在位置109与半胱氨酸连接的聚乙二醇部分。聚乙二醇部分将任选地具有5和40kDa之间的分子量。本发明的IL-2变体蛋白可含有选自由以下组成的组的至少一个取代:N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L和Q126F。此外,本发明的IL-2变体蛋白可任选地包含取代C125S。更优选的是其中IL-2蛋白序列含有取代N88R和取代C125S的IL-2变体蛋白。本发明的蛋白任选地以包含本发明的蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物提供。

[0020] 本发明还提供了增加本发明的人类IL-2变体蛋白的循环半衰期的方法,其中所述方法包括将聚乙二醇部分连接到位置109处的半胱氨酸残基,其中聚乙二醇部分的长度足以与没有聚乙二醇部分的相同蛋白相比增加蛋白的循环半衰期。本发明的方法还提供以足以刺激人类调节性T细胞水平的治疗有效剂量的蛋白变体的施用。

[0021] 本发明提供以下各项:

[0022] 项目1.一种IL-2变体蛋白,与SEQ ID NO:1具有至少95%序列同一性,包含取代D109C并具有活化T细胞的能力。

[0023] 项目2.如项目1所述的IL-2变体蛋白,所述IL-2变体蛋白与SEQ ID NO:1具有多于98%的序列同一性。

[0024] 项目3.如项目1所述的IL-2变体蛋白,所述IL-2变体蛋白具有连接至在位置109的半胱氨酸的聚乙二醇部分,其中所述聚乙二醇部分具有5和40kDa之间的分子量。

[0025] 项目4.如项目1所述的IL-2变体蛋白,其中所述IL-2变体蛋白含有选自由以下组成的组的至少一个取代:N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L和Q126F。

[0026] 项目5.如项目4所述的IL-2变体蛋白,所述IL-2变体蛋白还包含取代C125S。

[0027] 项目6.如项目3所述的IL-2变体蛋白,其中所述IL-2变体蛋白序列含有取代N88R和取代C125S。

[0028] 项目7.如项目6所述的IL-2变体蛋白,所述IL-2变体蛋白与SEQ ID NO:1具有98%的序列同一性。

[0029] 项目8.一种药物组合物,包含如项目3所述的IL-2变体蛋白和药学上可接受的载体。

[0030] 项目9.一种增加人类IL-2变体蛋白的循环半衰期的方法,所述人类IL-2变体蛋白与SEQ ID NO:1具有至少95%序列同一性,具有取代D109C并具有活化T细胞的能力,所述方

法包括将聚乙二醇部分连接到位置109处的半胱氨酸残基,其中所述聚乙二醇部分的长度足以与没有所述聚乙二醇部分的相同蛋白相比增加蛋白的循环半衰期。

[0031] 项目10.如项目9所述的方法,其中所述IL-2变体蛋白与SEQ ID NO:1具有多于98%的序列同一性。

[0032] 项目11.如项目9所述的方法,其中所述IL-2变体蛋白具有连接至在位置109的半胱氨酸的聚乙二醇部分,所述聚乙二醇部分具有5kDa和40kDa之间的分子量。

[0033] 项目12.如项目9所述的方法,其中所述IL-2变体蛋白已经含有选自自由以下组成的组的至少一个取代:N88R、N88I、N88G、D20H、Q126L和Q126F。

[0034] 项目13.如项目12所述的方法,其中所述IL-2变体蛋白还包含取代C125S。

[0035] 项目14.如项目12所述的方法,其中所述IL-2变体蛋白已经包含取代N88R和取代C125S。

[0036] 项目15.如项目12所述的方法,其中所述IL-2变体蛋白与SEQ ID NO:1具有98%的序列同一性。

[0037] 项目16.如项目9所述的方法,其中所述药物组合物以足以刺激人类调节性T细胞浓度的治疗有效剂量施用。

[0038] 附图简述

[0039] 图1是单剂量的IL-2或具有增加的半衰期的IL2-PEG蛋白后,循环半衰期、峰值药物水平、生物有效浓度、和刺激Treg细胞增殖必需的持续时间之间的关系关系的示意图。虚线代表皮下注射后IL-2随时间的血液水平,且实线代表IL2-PEG缀合物随时间的血液水平。水平点线指示活化表达IL2R $\alpha\beta\gamma$ 和IL2R $\beta\gamma$ 的细胞分别必需的浓度(EC50值)。双箭头指示暴露于在刺激细胞增殖必需的EC50的IL-2的持续时间(5-6hr)。

[0040] 图2表示用于确定PEG或其它非免疫原性聚合物缀合的连接位点的策略。IL-2被描绘为与高亲和力IL-2受体的三个亚基复合。暴露于溶剂不与IL-2受体亚基相互作用的IL-2表面氨基酸残基是用于连接PEG聚合物的候选氨基酸残基,被圈出。

[0041] 图3显示IL-2/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 复合物的3-D晶体结构,指出满足连接PEG或其它非免疫原性聚合物的标准的残基的氨基酸侧链。所示的残基是T3C、S6C、K8C、K48C、K49C、T51C、K97C、G98C、F103C、M104C、E106C和D109C。IL-2表示中心前景,左侧为IL-2RB,右侧为IL-2R $\gamma$ ,上后侧为IL-2RA。受体复合物相对于细胞膜的取向由箭头指示。

[0042] 图4显示在富集Treg细胞的T细胞亚群中IL2/N88R/C125S/D109C和聚乙二醇化IL2/N88R/C125S/D109C对pSTAT5的选择性活化。将人类PBMC与各小图上方所示的样品在37°C孵育10分钟,固定,透化,用抗体染色,然后进行流式细胞术。FACS图以假彩色模式展示。显示了被门控为CD4<sup>+</sup>的细胞,且细胞被进一步门控,如在4个象限的每个中所示的。每个象限中的数字指示每个门控中CD4<sup>+</sup>细胞的百分比。在上方象限中的细胞代表CD25表达细胞的最高1-2%,即富集Treg细胞的群体。将未处理的细胞在仅培养基中孵育,以 $4 \times 10^{-9}$ M的浓度加入IL-2,并以 $4 \times 10^{-8}$ M的浓度加入IL2/N88R/C125S/D109C和IL2/N88R/C125S/D109C-PEG样品,并将PEG-处理的样品在含有与IL2/N88R/C125S/D109C-PEG相同量的PEG的模拟-聚乙二醇化反应中孵育。IL-2在CD25<sup>低</sup>细胞和CD25<sup>高</sup>细胞二者中刺激大量的STAT5磷酸化。IL2/N88R/C125S/D109C和IL2/N88R/C125S/D109C-PEG均具有定性和定量不同的效应,主要在小于1%的细胞和主要在CD25<sup>高</sup>细胞中刺激STAT5磷酸化。

[0043] 图5和图5续表明IL-2和IL-2选择性激动剂蛋白对人类PBMC中7种不同免疫细胞类型的选择性。与wt IL-2相比,IL2/N88R/C125S/D109C和IL2/N88R/C125S/D109C-PEG二者对于Treg是高度选择性的,且在多种细胞类型中显示比IL2更大的选择性。

[0044] 发明详述

[0045] 引言

[0046] 本发明是新的IL-2变体蛋白,该IL-2变体蛋白包含这样的氨基酸取代,其使PEG聚合物能够与IL-2变体蛋白特异性地和有效地化学缀合,同时保持对IL-2受体的高亲和力、高生物活性、和与IL-2本身相比延长的循环半衰期。通过以下过程发现该变体蛋白:其中鉴定已发表的IL-2-IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体复合物晶体结构中暴露于溶剂的IL-2序列中的候选氨基酸位置,和构建其中半胱氨酸残基在所选位置被取代的变体蛋白。表达和纯化这些IL-2变体,将产生的足够高水平的变体蛋白与PEG-马来酰亚胺缀合,且然后测试IL2/N88R/D109C-PEG在Treg细胞上的生物活性,并显示为有活性。由本发明定义的分子将使得能够通过刺激阻遏自身免疫和炎症病理学的T细胞的小亚群产生的新机制,安全和有效地治疗自身免疫病。这种打破范例的治疗剂可潜在地治疗许多不同的自身免疫病。

[0047] 定义

[0048] 当提及来自野生型蛋白的变体时,提及氨基酸取代诸如“D109C”是指原始残基天冬氨酸(D)的位置数目(109),随后是取代的残基半胱氨酸(C)。

[0049] 如本文使用的“与序列ID No.1至少百分比(例如97%)序列同一性”是指两个或更多个核酸或多肽的序列相同的程度。目标序列与第二序列之间跨评价窗(例如跨目标序列的长度)的同一性百分比可通过以下计算:比对序列,确定评价窗内与相同残基相对的残基(核苷酸或氨基酸)的数目,允许引入缺口以使同一性最大化,除以感兴趣的序列或第二序列(无论哪个更大)落入评价窗的残基的总数目,并乘以100。当计算实现特定同一性百分比所需的相同残基的数目时,分数将舍入到最接近的整数。同一性百分比可使用多种计算机程序计算。例如,计算机程序诸如BLAST2、BLASTN、BLASTP、Gapped BLAST等生成比对并提供感兴趣的序列之间的同一性百分比。Karlin和Altschul的算法(Karlin和Altschul, Proc.Natl.Acad.ScL USA 87:22264-2268,1990),在Karlin和Altschul, Proc.Natl.Acad.ScL USA 90:5873-5877,1993中修改,被并入到Altschul等人的NBLAST和XBLAST程序中(Altschul,等人,J.Mol.Biol.215:403-410,1990)。为了比较目的,为了获得带缺口的比对,利用Gapped BLAST,如在Altschul等人(Altschul,等人.Nucleic Acids Res.25 3389-3402,1997)中描述的。当利用BLAST和Gapped BLAST程序时,可使用各自程序的缺省参数。可使用PAM250或BLOSUM62矩阵。用于进行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)公开获得。对于这些程序,参见具有URL全球网址的Web站点:“ncbi.nlm.nih.gov”。在请求保护的特定实施方案中,使用BLAST2利用由NCBI提供的缺省参数计算同一性百分比。

[0050] 本发明的“IL-2选择性激动剂”是IL-2 $\alpha\beta\gamma$ 选择性激动剂。在功能上它相对于IL2R $\beta\gamma$ 受体复合物选择性地活化IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体复合物。其衍生自野生型IL-2蛋白,所述野生型IL-2蛋白在结构上定义为与序列ID No.1的野生型IL-2具有至少95%序列同一性,并且在功能上由优先活化Treg细胞的能力定义。该蛋白还可在功能上由其选择性活化Treg中IL-2受体信号转导的能力定义,如由Treg细胞中与CD4+CD25<sup>-</sup>/低T细胞或NK细胞相比磷酸化

STAT5蛋白的水平测量的,或由植物凝集素刺激的T细胞相对于NK细胞的选择性活化测量的。

[0051] “Treg”或“Treg细胞”是指调节性T细胞。调节性T细胞是一类T细胞,其阻遏其他免疫细胞的活性,并使用流式细胞术由细胞标志物表型CD4+CD25+FOXP3+定义。由于FOXP3是细胞内蛋白并要求细胞固定和透化来染色,可使用细胞表面表型CD4+CD25+CD127-用于定义活的Treg。Treg还包括多种Treg亚类,诸如tTreg(胸腺衍生的)和pTreg(外周衍生的,从外周中的幼稚T细胞分化)。所有Treg表达IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体,不产生其自身的IL-2并且生长依赖于IL-2,且本领域技术人员将认识到,两种类型将被IL2R $\alpha\beta\gamma$ 选择性激动剂选择性地活化。

[0052] “PEG”是聚(乙二醇)分子,其是乙二醇的水溶性聚合物。PEG分子可与蛋白化学缀合以增加其循环半衰期。PEG可以以不同的大小获得,并且还可以以化学活性形式商业化获得,化学活性形式被用化学反应性基团衍生化以使蛋白能够共价缀合。活化的PEG可从商业来源获得,例如NOF America(White Plains,NY)和Celares GmbH(Berlin,Germany)。线性PEG以各种分子量产生,例如重均分子量为5,000道尔顿、10,000道尔顿、20,000道尔顿、30,000道尔顿和40,000道尔顿的PEG聚合物。支链PEG聚合物也已被开发。通常使用的活化的PEG聚合物是用N-羟基琥珀酰亚胺基团(用于与伯胺诸如赖氨酸残基和蛋白N-末端缀合)、用醛基(用于与N-末端缀合)和用马来酰亚胺或碘乙酰胺基团(用于偶合到硫醇诸如半胱氨酸残基)衍生的那些。

[0053] “IL-2-PEG缀合物”是PEG共价缀合的IL-2蛋白。IL-2部分可以是野生型IL-2、具有C125S取代的IL-2、在N88、D20或Q126具有导致对IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体的选择性的取代的前述蛋白之一、或具有使得能够位点特异性缀合PEG分子的另外的取代的前述蛋白之一。

[0054] “生物活性”是指在定量的基于细胞的体外测定中生物活性的测量结果。

[0055] “Treg细胞的功能活化”定义为Treg中IL-2介导的响应。对于Treg细胞的功能活化的测定读出值包括pSTAT5的刺激、Treg细胞增殖、和Treg效应物蛋白的水平的刺激。

[0056] 用于PEG缀合的IL-2部分的设计和构建

[0057] 以下考虑因素指导最好地满足期望的要求的IL-2部分的设计。

[0058] (1) 由于硫醇与马来酰亚胺活化的和碘乙酰胺活化的PEG试剂的非常特异的反应性,将游离(未配对)的半胱氨酸残基工程化到IL-2中。

[0059] (2) 所有构建体在具有取代C125S(以除去IL-2中唯一未配对的半胱氨酸残基)和取代N88R(其降低对IL2RB的亲合力并因此对IL2R $\alpha\beta\gamma$ 有选择性)的野生型人类IL-2的背景下制备。C125与Q126直接相邻,Q126是与IL2RG的主要接触。

[0060] (3) 在IL-2上的表面暴露部位产生单独的另外的半胱氨酸取代,以使得能够有效缀合水溶性PEG。

[0061] (4) 还选择PEG缀合位点使其暴露于IL2-IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体复合物内的溶剂(Wang,X.等人,2005Science.310:1159-63),且因此不太可能损害IL2R $\alpha\beta\gamma$ 的结合和活化。

[0062] (5) 变体蛋白必须表达良好并正确折叠。新的游离半胱氨酸的存在可产生不适当的分子内二硫键形成和错误折叠,或可产生与其他分子的分子间二硫键,导致聚集。

[0063] 一般方法

[0064] 通常,本发明的变体IL-2蛋白的制备可由本文公开的程序和由公认的重组DNA技

术实现,所述公认的重组DNA技术包括例如,聚合酶链式反应(PCR)、质粒DNA的制备、用限制性酶裂解DNA、寡核苷酸的制备、DNA的连接、mRNA的分离、将DNA引入适当的细胞、转化或转染宿主、宿主的培养。另外,可以使用离液剂和熟知的电泳、离心和色谱方法分离和纯化融合分子。关于这些方法的公开内容一般参见,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第二版(1989));和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York(1989)。

[0065] 编码本发明变体蛋白的基因包括限制性酶消化和连接作为用于产生编码所需融合物的DNA的基本步骤。DNA片段的末端可需要在连接之前修饰,且这可通过用填充突出端、核酸酶(例如,ExoIII)缺失片段的末端部分、定点诱变或通过PCR添加新的碱基对来实现。可使用多连接子和衔接子来促进所选片段的连接。表达构建体通常以使用数轮限制性酶切、连接和大肠杆菌转化的阶段组装。适合于构建表达构建体的许多克隆载体是本领域已知的( $\lambda$ .ZAP,Agilent;pET,EMD Millipore)并且特定的选择对于本发明不是关键的。克隆载体的选择将受被选择用于将表达构建体引入宿主细胞中的基因转移系统的影响。在每个阶段结束时,可通过限制性酶切、DNA测序、杂交和PCR分析来分析所得的构建体。

[0066] 定点诱变通常用于通过本领域已知的方法将特定突变引入编码本发明的IL-2变体蛋白的基因中。参见例如,美国专利申请公布2004/0171154;Storici等人,2001,Nature Biotechnology 19:773-776;Kren等人,1998,Nat. Med. 4:285-290;和Calissano和Macino,1996,Fungal Genet. Newslett. 43:15-16。可在本发明中使用任何定点诱变程序。存在许多可用于制备本发明的变体的商业试剂盒。

[0067] 可以根据本发明使用各种启动子(转录起始调节区)。合适的启动子的选择取决于所提议的表达宿主。可以使用来自异源来源的启动子,只要它们在所选宿主中有功能。

[0068] IL-2蛋白可在无信号序列的大肠杆菌(*E. coli*)中表达,且蛋白从包涵体中回收并重新折叠成活性形式。这种表达系统在美国专利7,105,653B2中描述。

[0069] 可以使用各种信号序列来促进本文所述的蛋白的表达。选择或设计信号序列用于有效分泌并且也可以使用表达宿主中的加工。天然人类IL-2信号序列、与TCR编码序列同源的信号序列、或与小鼠IL-2编码序列同源的信号序列可用于哺乳动物细胞。其它合适的信号序列/宿主细胞对包括用于在枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)中分泌的枯草芽孢杆菌*sacB*信号序列和用于巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)分泌的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) $\alpha$ -交配因子或巴斯德毕赤酵母酸性磷酸酶*phoI*信号序列。信号序列可以通过编码信号肽酶裂解位点的序列直接连接到蛋白编码序列,或通过短核苷酸桥连接。

[0070] 已经鉴定了用于真核蛋白表达系统的用于增强转录和翻译的元件。例如,将花椰菜花叶病毒(CaMV)启动子1000bp放置在异源启动子的任一侧可在植物细胞中将转录水平提高10至400倍。表达构建体还应包括合适的翻译起始序列。修饰表达构建体以包括用于正确翻译起始的Kozak共有序列可将翻译水平增加10倍。

[0071] 将表达盒连接到与正在使用的宿主相容的合适载体。载体必须能够适应编码待表达的融合蛋白的DNA序列。合适的宿主细胞包括真核和原核细胞,优选地可容易地被转化并在培养基中表现出快速生长的那些细胞。特别优选的宿主细胞包括原核细胞如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等,以及真核细胞如动物细胞和酵母菌株,例如酿酒酵母。通常优选哺乳动物细胞,特别是HEK、J558、NS0、SP2-0或CHO。其它合适的宿主包括例如昆虫细胞例如Sf9。使用

常规培养条件。参见Sambrook, 上文。然后可以选择稳定的转化或转染的细胞系。体外转录-翻译系统也可以用作表达系统。

[0072] 可以通过用于转染细胞的标准技术将编码期望的IL-2变体蛋白的核酸引入宿主细胞。术语“转染(transfecting)”或“转染(transfection)”旨在包括将核酸引入宿主细胞的所有常规技术,包括磷酸钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质转染、电穿孔、显微注射、病毒转导和/或整合。用于转染宿主细胞的合适方法可见于Sambrook等人,上文和其他实验室教科书。

[0073] 可选地,人们可使用合成基因构建用于本文所述的蛋白的全部或部分构建。这要求体外合成设计的编码感兴趣的多肽分子的多核苷酸分子。基因合成可以使用多种技术进行,诸如Tian等人描述的基于多重微芯片的技术(Tian, 等人, Nature 432:1050-1054)和其中合成寡核苷酸并在光可编程微流体芯片(photo-programmable microfluidic chip)上组装的类似技术。

[0074] 本发明的IL-2变体蛋白从收获的宿主细胞或从培养基分离。使用标准蛋白纯化技术从培养基或从收获的细胞分离感兴趣的蛋白。特别地,纯化技术可用于从多种方法大规模(即至少毫克量)表达和纯化期望的IL-2变体蛋白,所述方法包括滚瓶、旋转瓶、组织培养板、生物反应器或发酵罐。

[0075] 已经开发出使得能够将非天然氨基酸掺入重组蛋白中的蛋白表达系统(Kim, C.H., 等人, Curr Opin Chem Biol. 2013S1367-5931 (13) 00071-9)。这些表达系统可掺入非天然氨基酸,所述非天然氨基酸具有化学反应性,使得在那些位置能够位点特异性聚乙二醇化蛋白。作为使用游离半胱氨酸残基的替代方案,本领域技术人员将认识到,本文鉴定的IL-2氨基酸位置也可被非天然氨基酸而不是半胱氨酸取代,以实现连接PEG或其它非免疫原性聚合物到IL-2的相似目标,目的是增加循环半衰期。

[0076] 技术人员还将认识到,本发明的IL2选择性激动剂部分也可与其他非免疫原性聚合物缀合。两种此类聚合物是重组非免疫原性氨基酸聚合物,诸如XTEN聚合物,A、E、G、P、S和T氨基酸的链(Schellenberger, V., 等人, 2009, Nat Biotechnol. 27:1186-90),以及PAS聚合物,P、A和S氨基酸残基的链(Schlapschy, M., 等人, 2007, Protein Eng Des Sel. 20: 273-84)。

[0077] IL2选择性激动剂部分

[0078] 具有取代N88R的IL-2是IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体的IL2选择性激动剂的示例性情况(Shanafelt, A.B., 等人, 2000, Nat Biotechnol. 18:1197-202)。IL2/N88R缺乏与IL2R $\beta\gamma$ 受体亚基和IL2R $\beta\gamma$ 受体复合物的结合,但能够与wt IL-2一样有效地与IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体复合物结合并刺激表达IL2R $\alpha\beta\gamma$ 的PHA活化的T细胞的增殖,尽管表现出刺激表达IL2R $\beta\gamma$ 的NK细胞增殖的能力降低3,000倍。具有相似活性谱的其他IL2R $\alpha\beta\gamma$ 选择性激动剂包括具有取代N88I、N88G和D20H的IL-2,且具有取代Q126L和Q126F(与IL2RG亚基的接触残基)的其它IL2变体也具有IL2R $\alpha\beta\gamma$ 选择性激动剂活性(Cassell, D.J., 等人, 2002, Curr Pharm Des., 8: 2171-83)。本领域技术人员将认识到,这些IL2选择性激动剂分子的任一种可以取代IL2/N88R部分,期望Fc融合蛋白将具有相似的活性。所有上述突变可以在wt IL-2或具有取代C125S的wt IL-2的背景下进行,取代C125S是通过消除未配对的半胱氨酸残基而促进IL-2稳定性的取代。本发明还可以与改善生产或稳定性而不显着影响IL-2受体活化活性的其它

突变或截短一起使用。

[0079] 本发明的变体任选地包括应用于氨基酸和核酸序列的保守取代的变体。关于特定核酸序列,保守修饰的变体是指编码相同或基本相同的氨基酸序列的那些核酸,或当所述核酸不编码氨基酸序列时,指基本相同的序列。具体地,简并密码子取代可以通过产生其中一个或更多个选择的(或所有)密码子的第三位置被混合的碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等人.,*Nucleic Acid Res.*19:5081(1991);Ohtsuka等人,*J.Biol.Chem.*260:2605-2608(1985);Rossolini等人,*Mol.Cell.Probes* 8:91-98(1994))。由于遗传密码的简并性,大量功能相同的核酸编码任何给定的蛋白。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在其中丙氨酸被密码子指定的每个位置处,该密码子可被更改为所描述的不改变编码的多肽的相应密码子中的任一个。此类核酸变异是沉默变异,其是一种类型的保守修饰的变异。本文的编码多肽的每个核酸序列也描述核酸的每个可能的沉默变异。技术人员将认识到,核酸中的每个密码子(除了AUG和TGG之外,AUG通常是甲硫氨酸的唯一密码子,TGG通常是色氨酸的唯一密码子)可被修饰以产生功能上相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异隐含在每个所述序列中。

[0080] 对于氨基酸序列的保守取代,技术人员将认识到,改变、添加或缺失编码的序列中的单个氨基酸或小百分比的氨基酸的对核酸、肽、多肽或蛋白序列的单独取代、缺失或添加是保守修饰的变体,其中改变导致氨基酸取代为化学上相似的氨基酸。提供功能相似的氨基酸的保守取代表是本领域公知的。此类保守修饰的变体是本发明的多态变体、种间同源物和等位基因以外的但不排除本发明的多态变体、种间同源物和等位基因。

[0081] 以下组各自含有彼此保守取代的氨基酸:

[0082] 1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);

[0083] 2) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);

[0084] 3) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0085] 4) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0086] 5) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M);

[0087] 6) 精氨酸(R)、赖氨酸(K)、组氨酸(H);

[0088] 7) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、缬氨酸(V);和

[0089] 8) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0090] 将在IL-2中耐受的保守取代的实例包括Y31F、T51S、Q57N、E100D和T111S。

[0091] 生物测定

[0092] 稳健的和定量的生物测定对于候选蛋白的生物活性的表征是必需的。这些测定应测量IL2受体的活化,测量Treg中活化的下游功能性后果,并测量活化的Treg的治疗相关结果和功能。这些测定可用于测量IL2 PEG缀合物分子的治疗活性和效力,并且还用于测量动物或人类中IL2 PEG缀合物的药效学。一种测定测量信号转导蛋白STAT5的磷酸化,用对磷酸化蛋白(pSTAT5)特异的抗体的流式细胞术测量。STAT5磷酸化是IL-2信号转导途径中的必要步骤。STAT5对于Treg发育是必需的,并且在CD4+CD25+细胞中表达的组成型活化形式的STAT5足以在IL-2的不存在下产生Treg细胞(Mahmud,S.A.,等人,2013,*JAKSTAT* 2:e23154)。因此,Treg细胞中磷酸化的STAT5(pSTAT5)的测量将被本领域技术人员认为是这些细胞中IL-2活化的反映,并且将预测在适当暴露时间和条件给予的IL-2治疗的其他生物

学结果。另一种用于功能活化的测定测量IL-2刺激的Treg细胞增殖。本领域技术人员将认识到,Treg增殖可以通过以下测量:将氘化胸苷掺入纯化的Treg细胞中,通过流式细胞术测量的混合细胞群中Treg细胞数量的增加,以及CD4+CD25+FOXP3+或CD4+CD25+CD127-标志物表型的频率,通过Treg细胞中增殖相关细胞周期蛋白(诸如Ki-67)的增加的表达,或通过由流式细胞术测量Treg细胞中活体荧光染料诸如羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)的细胞分裂相关稀释度。IL-2功能性活化Treg的另一种测定是Treg的增加的稳定性。pTreg细胞被一些人认为是不稳定的,并且具有分化成Th1和Th17效应物T细胞的潜力。IL-2活化Treg可以稳定Treg并防止这种分化(Chen,Q.,等人,2011,J Immunol.186:6329-37)。IL-2刺激Treg的另一个结果是刺激Treg功能性效应物分子诸如CTLA4、GITR、LAG3、TIGIT、IL-10、CD39和CD73的水平,其有助于Treg的免疫抑制活性。

#### [0093] 配制

[0094] 本发明的融合蛋白的药物组合物被定义为根据常规方法配制用于胃肠外(特别是静脉内或皮下)递送。通常,药物制剂将包括本发明的融合蛋白与药学上可接受的载体诸如盐水、缓冲盐水、5%葡萄糖水溶液等组合。制剂可以还包括一种或更多种赋形剂、防腐剂、增溶剂、缓冲剂、防止小瓶表面上的蛋白损失的白蛋白等。配制方法是本领域公知的并且公开于例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Gennaro,ed.,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,19.sup.th ed.,1995。

[0095] 作为说明,药物制剂可以作为试剂盒提供,所述试剂盒包括含有本发明的融合蛋白的容器。治疗性蛋白可以以用于单次或多次剂量的可注射溶液的形式、作为在注射前重构的无菌粉末、或作为预填充注射器提供。这样的试剂盒还可包括关于药物组合物的适应症和用法的书面信息。此外,这样的信息可以包括本发明的融合蛋白在已知对本发明的融合蛋白过敏的患者中禁忌的陈述。

[0096] 本发明的IL-2PEG缀合物可以掺入组合物,包括药物组合物中。这样的组合物通常包括蛋白和药学上可接受的载体。如本文所用的,术语“药学上可接受的载体”包括但不限于与药物施用相容的盐水、溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等溶剂和吸收延迟剂等。补充的活性化合物(例如,抗生素)也可掺入组合物中。

[0097] 将药物组合物配制成与其预期的施用途径相容。本发明的IL-2PEG缀合物可能通过胃肠外途径施用。肠胃外施用途径的实例包括例如静脉内、皮内和皮下。用于肠胃外施用的溶液或悬浮液可包括以下组分:无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂如苯醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或硫酸氢钠;螯合剂诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和用于调节张力的试剂如氯化钠或葡萄糖。可以用酸或碱诸如磷酸二氢钠和/或磷酸氢二钠、盐酸或氢氧化钠调节pH(例如,至约7.2-7.8的pH,例如7.5)。胃肠外制剂可以包封在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0098] 适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌的可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物应当是无菌的,并且应当是流动的到存在易于注射性的程度。它在制造和储存条件下应该是稳定的,并且必须防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)

及其合适的混合物的溶剂或分散介质。在分散体的情况下,可以通过使用表面活性剂,例如聚山梨醇酯或吐温来促进所需粒径的保持。通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等,可以实现防止微生物的作用。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇、氯化钠。

[0099] 无菌可注射溶液可通过以下来制备:将所需量的活性化合物根据需要与上述成分中的一种或组合一起掺入合适的溶剂中,然后过滤灭菌。通常,通过将活性化合物掺入无菌载体中制备分散体,所述无菌载体包含碱性分散介质和来自上面列举的那些的所需其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分加上来自其先前无菌过滤的溶液的任何另外的所需成分的粉末。

[0100] 在一个实施方案中,用保护IL-2-PEG缀合物免于从体内快速消除的载体制备IL-2-PEG缀合物,例如控释制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可以使用生物可降解的生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。这样的制剂可使用标准技术制备。

[0101] 药物组合物可以与施用说明书一起包括在容器、包装或分配器中。

[0102] 施用

[0103] 本发明的IL-2-PEG缀合物将优选地通过胃肠外途径施用。皮下途径是优选的途径,但是也可使用静脉内、肌内和皮下施用。对于皮下或肌内途径,可以使用贮库(depot)和贮库制剂。对于某些疾病,可使用专门的给药途径。例如,对于炎性眼病,可使用眼内注射。融合蛋白可以以约0.1至10mcg/ml总体积的浓度使用,尽管可使用0.01mcg/ml至100mcg/ml范围内的浓度。

[0104] 剂量的确定在本领域普通技术人员的水平内。在治疗期间每天或每周给药,或者可以另一间歇性频率。静脉内施用将通过快速浓注或经一至数小时的典型时间段输注。也可使用缓释制剂。通常,本发明的IL-2-PEG缀合物的治疗有效量是足以在治疗状况中产生临床显著改变的量,所述临床显著改变诸如循环Treg细胞的临床显著改变、存在于患病组织内的Treg细胞的临床显著改变、或疾病症状的临床显著改变。

[0105] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制用于人类的剂量范围。这种化合物的剂量优选在具有很少或没有毒性的循环浓度范围内,包括半最大有效浓度(EC50;即实现Treg细胞半数最大刺激的测试化合物的浓度)。剂量可根据所使用的剂型和利用的施用路径而在该范围内变动。对于本发明方法中使用的任何化合物,治疗有效剂量可最初从细胞培养测定估计。可在动物模型中配制剂量以实现包括如在细胞培养中确定的EC50的循环血浆浓度范围。此类信息可用来更精确地确定在人类中的有用的剂量。可例如通过酶联免疫吸附测定法测量血浆中的水平。

[0106] 如本文定义的,IL-2-PEG缀合物的治疗有效量(即有效剂量)取决于所选择的多肽和给药频率。例如,可施用在大约0.001至0.1mg/kg患者体重范围内的单剂量的量;在一些实施方案中,可施用约0.005、0.01、0.05mg/kg。组合物可每天一次至每周一次或更多次、或每月一次或更多次施用;包括每隔一天一次。本领域技术人员将理解,某些因素可影响有效治疗受试者所需的剂量和时机,包括但不限于疾病或紊乱的严重性、先前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄、存在于患者中的Treg细胞的水平、和存在的其它疾病。此外,用治疗有效量的本发明的IL-2选择性激动剂PEG缀合物治疗受试者很可能是一系列治疗。

[0107] 自身免疫病

[0108] 已经注意到可从本发明的治疗受益的一些疾病。然而，Treg细胞在自身免疫病中的作用是非常活跃的研究领域，并且另外的疾病将可能被鉴定为可通过本发明治疗。自身免疫病定义为其中免疫系统攻击其自身蛋白、细胞和组织的人类疾病。自身免疫病的综合列表和综述可以在The Autoimmune Diseases (Rose和Mackay, 2014, Academic Press) 中找到。

[0109] 本说明书中引用的所有出版物和专利申请通过引用并入本文，如同每个单独出版物或专利申请被具体和单独地指明通过引用并入。

[0110] 虽然为了清楚理解的目的通过说明和实例相当详细地描述了前述发明，但是本领域普通技术人员将容易明白，根据本发明的教导，可以对其进行某些改变和修改，而不偏离所附权利要求的精神或范围。

## 实施例

[0111] 以下实施例仅通过说明的方式而绝非通过限制的方式来提供。本领域技术人员将容易地认识到，多种非关键参数可被改变或修改以产生基本相似的结果。

[0112] 1. IL-2中候选PEG连接位点的预测

[0113] 为了选择将PEG与IL-2缀合的候选位点，鉴定了暴露于溶剂并且不表现为直接或空间上干扰IL-2与IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 结合的氨基酸残基。策略在图2中图解显示。检查与IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 受体的细胞外结构域复合的IL-2的发表的晶体结构 (Wang, X., 等人, 2005, Science 310: 1159-63, Stauber, D.J., 等人, 2006, Proc Natl Acad Sci 103:2788-93) 鉴定了以下残基：S6、K8、K48、K49、T51、E52、K54、K97、G98、F103、M104、E106、D109和T133 (图3)。在晶体结构中不可见，但是基于关于相邻残基的信息可能符合标准的另外的氨基酸残基是A1、P2、T3、S4、S5、S99、E100、T101和T102。基于该候选者列表，构建并制备了在所位置具有半胱氨酸取代的12种变体 (T3C、S6C、K8C、K48C、K49C、T51C、K97C、G98C、F103C、M104C、E106C和D109C) (表I)。

[0114] 2. IL2选择性激动剂变体蛋白在大肠杆菌中的克隆、表达和纯化

[0115] 在含有取代N88R和C126S的人类IL-2 (SEQ ID NO:1) 的背景上，通过DNA合成 (Genescript, Piscataway, NJ)，制备编码具有表1中列出的每种取代的蛋白的cDNA (其分别在5'和3'末端掺入限制性位点NcoI和BAM HI)，并克隆到pUC57中。然后使用NcoI和BAM HI位点将cDNA插入片段克隆到pET3d载体 (EMD Millipore, Billerica, Massachusetts) 中。将构建体转化到BL21 (DE3) 细胞中，并选择氨苄青霉素抗性。转化的细胞在0.5L培养物中在含有50ug/ml氨苄青霉素和1%葡萄糖的LB培养基中生长至0.6-2.0之间的ABS280。然后加入IPTG至0.5mM以诱导蛋白表达，并且在诱导后3小时收获培养物。

[0116] 通过10,000xg离心10分钟使细胞沉淀。根据制造商的说明，使用Bugbuster (EMD Millipore, Billerica, Massachusetts) 从细胞沉淀中提取并纯化包涵体 (IB)，并取样用于通过SDS-PAGE分析。将IB在室温在含有0.1% (vol/vol) 2-巯基乙醇的0.1M Tris/HCL (pH 8.0) 的8M盐酸胍中溶解和变性2小时。然后通过室温对20体积的10mM Tris/HCL (pH8.0) / 1mM EDTA进行透析12小时将蛋白重折叠。然后将三氟乙酸 (TFA) 加入样品至0.1%，通过离心澄清样品以除去沉淀物，过滤通过0.2 $\mu$ m过滤器，并通过反相色谱法纯化。将IL-2变体以

1ml/分钟的流速加载到0.1%TFA中的Vydac 208TP54 C-8柱上,并用0.1%TFA中0%-75%乙腈的45分钟梯度洗脱。通过SDS-PAGE筛选级分,IL-2变体蛋白通常以大约60%乙腈洗脱。

[0117] 这些生产研究的结果总结在表I中。在选择用于生产的12种变体中,反相色谱之后只有7种产生可检测的IL-2蛋白峰。在这7种蛋白中,5种表现出非常低的产率,并且在所进行的规模下产生不足以进一步研究的材料。在剩余的2种蛋白中,一种是在最高水平产生的D109C变体,其被聚乙二醇化和测试。这些结果表明,产生具有单个不成对半胱氨酸残基的这些变体蛋白的能力差异很大,并且许多不容易产生。这可以是由于各种因素所致,诸如重组蛋白对大肠杆菌宿主的毒性,不能形成包涵体,或低的重折叠效率。生产过程的修改或在其它表达系统中表达蛋白,诸如在哺乳动物细胞中表达为分泌蛋白,可提高一些其他变体的生产力。然而,在该表达系统中,D109C变体表现出明显优于生产水平。

[0118] 表1. 大肠杆菌中产生IL-2变体蛋白的概述

IL-2选择性激动剂变体	峰高,mAU (280 nM)
-	1
T3C	nd
[0119] S6C	nd
K8C	nd
K48C	1
K49C	11

IL-2选择性激动剂变体	峰高,mAU (280 nM)
T51C	nd
K97C	1
[0120] G98C	1
F103C	nd
M104C	2
E106C	nd
D109C	26

[0121] 峰高代表变体蛋白在反相色谱法上的相对最终产率。

[0122] nd: 未检测到峰

[0123] 3. IL2/N88R/C125S/D109C的聚乙二醇化

[0124] 将纯化的IL2/N88R/C125S/D109C与20kDa PEG缀合以测试缀合物的生物活性。将IL2/N88R/C125S/D109C透析到0.1M MES (pH 6.0) 中,通过OD280使用消光系数0.655(在0.1%的Ab 280nm) 确定蛋白浓度,并与50倍摩尔过量的马来酰亚胺-PEG (20,000g/M;NOF America,White Plains,NY) 在室温反应30分钟。通过加入L-半胱氨酸至比马来酰亚胺-PEG2倍摩尔过量而停止反应。通过SDS-PAGE分析10ug反应混合物,表明无可检测的残留的

未反应的IL-2蛋白。

[0125] 4. 聚乙二醇化IL2/N88R/C125S/D109C在T细胞上的活性

[0126] 通过测量CD4+T细胞子集中的磷酸-STAT5 (pSTAT5) 水平的刺激来确定聚乙二醇化IL2/N88R/C125S/D109C对T细胞的活性。通过将IL-2与IL2RB和IL2RG的异二聚体结合来活化IL-2受体,促进JAK1和JAK3蛋白分别与IL2RB和IL2RG细胞质结构域的相互作用,刺激STAT5蛋白的磷酸化 (pSTAT5),其然后将IL-2信号转导到细胞核。STAT5对于Treg细胞发育是必需的,并且STAT5在CD4+T细胞中的人工活化足以在IL-2的不存在下产生Treg细胞 (Mahmud, S.A., 等人, 2013, *JAKSTAT* 2:e23154)。通过荧光激活细胞分选 (FACS) 在透化细胞中用针对磷酸化STAT5肽的抗体测量pSTAT5的水平。Treg细胞组成性表达CD25,并且在CD25表达水平的前1%中的细胞对于Treg细胞是高度富集的 (Jailwala, P., 等人, 2009, *PLoS One*. 2009;4:e6527; Long, S.A., 等人, 2010, *Diabetes* 59:407-15)。因此,将FACS数据门控为CD25<sup>高</sup>组 (表达CD25的细胞的前1-2%) 和CD25<sup>低/-</sup>组。

[0127] 将冷冻保存的人类PBMC (Astarte Biologics, Seattle, WA) 解冻,在含有1%人类AB血清 (Mediatech, Manassas, VA) 的X-VIVO 15 (Lonza, Allendale, NJ) 培养基中洗涤并允许在37°C恢复2小时。然后将细胞以0.1ml以 $5 \times 10^6$ 个细胞/ml的浓度分配到15×75mm试管中。将细胞在37°C用4nM IL-2、40nM PEG-IL2/N88R/D109C或IL2/N88R/D109C或等量的与L-半胱氨酸反应的马来酰亚氨基-PEG处理10分钟,然后在37°C用Cytotfix固定缓冲液固定10分钟。将固定的细胞用Perm缓冲液III (BD Biosciences, Santa Clara, CA) 在冰上透化30分钟,洗涤,然后用抗CD4-Pacific Blue (BD Biosciences, Santa Clara, CA)、抗-CD25-AF488 (eBioscience, San Diego, CA) 和抗pSTAT5-AF547 (BD Biosciences) 抗体的混合物在20°C染色30分钟,洗涤,并在LSRII流式细胞仪 (BD Biosciences) 上通过FACS进行。

[0128] 该实验结果表明,与IL-2相比,IL2/N88R/C125S/D109C和IL2/N88R/C125S/D109C-PEG二者选择性活化富集Treg细胞的CD4+CD25<sup>高</sup>细胞的小亚群 (图2)。IL-2以4nM IL-2活化超过80%的CD4+T细胞,高比例的活化的细胞表达低水平CD25或不表达CD25。这些结果表明,聚乙二醇化IL2/N88R/C125S/D109C保留活化Treg的选择性能力。

[0129] 5. 人类PBMC中IL2选择性激动剂-PEG缀合物蛋白的选择性

[0130] 为了确定IL2/N88R/C125S/D109C-PEG在更广泛的生物环境中的选择性,开发了测量粗制未分级的人类PBMC中所有关键免疫细胞类型的STAT5活化的测定。通过Ficoll-Hypaque离心从正常志愿者分离人类PBMC。将 $10^6$ 个PBMC悬浮在具有葡萄糖 (Lonza) 和10% FBS (Omega) 的X-VIVO15培养基中,并在37°C用 $10^{-8}$ M测试蛋白处理20分钟。然后根据制造商的说明用Foxp3/转录因子染色缓冲液组 (EBIO) 处理细胞。然后如实施例3所述用Cytotfix缓冲液固定细胞并用Perm缓冲液III透化。然后将固定的和透化的细胞用1%FBS/PBS洗涤,并在室温在黑暗中用抗体混合物染色60分钟。然后将染色的细胞在1%FBS/PBS中洗涤,重悬于PBS中,并在Fortessa流式细胞仪 (BD Biosciences) 上分析。抗体混合物由以下组成:抗CD4-PerCP-Cy5.5 (BD, #560650)、抗pSTAT5-AF-488 (BD, #612598)、抗CD25-PE (BD, #560989)、抗CD56-PE-CF594 (BD, #562328)、抗FOXP3-AF647 (BD, #560889)、抗CD3-V450 (BD, #560366) 和抗CD8-BV650 (Biolegend, #301041)。这种染色程序使得能够监测7种关键免疫细胞类型中的pSTAT5水平。

[0131] 细胞表型定义如下:Treg细胞:CD3+、CD4+、Foxp3+、CD25<sup>高</sup>、CD8-、CD56-;活化的CD4

Teff细胞:CD3+、CD4+、Foxp3<sup>-</sup>、CD25<sup>高</sup>、CD8<sup>-</sup>、CD56<sup>-</sup>; CD4<sup>+</sup> Teff细胞:CD3+、CD4+、Foxp3<sup>-</sup>、CD25<sup>低</sup>、CD8<sup>-</sup>、CD56<sup>-</sup>; NKT细胞:CD3+、CD4<sup>-</sup>、Foxp3<sup>-</sup>、CD25<sup>低</sup>、CD8<sup>-</sup>、CD56<sup>+</sup>; NK细胞:CD3<sup>-</sup>、CD4<sup>-</sup>、Foxp3<sup>-</sup>、CD25<sup>低</sup>、CD8<sup>-</sup>、CD56<sup>+</sup>; B细胞:CD3<sup>-</sup>、CD4<sup>-</sup>、Foxp3<sup>-</sup>、CD25<sup>低</sup>、CD8<sup>-</sup>、CD56<sup>-</sup>。

[0132] 在该测定中以 $10^{-8}$ M的浓度测试蛋白。如图5和图5续所示的结果显示,与wt IL2相比,IL2/N88R/C125S/D109C和IL2/N88R/C125S/D109C-PEG二者显示出显著的选择性,wt IL2在大部分的所有细胞群体中活化pSTAT5。IL2/N88R/C125S/D109C-PEG以与wt IL-2基本相同的水平刺激Treg群体中的pSTAT5信号。另外的分析(未显示)显示,pSTAT5+NK细胞是CD25<sup>高</sup>,其是NK-CD56<sup>亮</sup>(NK-CD56<sup>亮</sup>)细胞特有的,NK-CD56<sup>亮</sup>细胞是也具有免疫调节活性的NK细胞亚群(Poli,A,等人,2009Immunology.126(4):458-65)。这些结果证明IL2/N88R/C125S/D109C-PEG在复杂生物环境中对Treg的活性和高选择性。

### 序列表

```

<160> 4
<170> PatentIn version 3.5
<210> SEQ ID NO 1
<211> 长度: 133
<212> 类型: PRT
<213> 生物体: 智人 (Homo sapiens)
<400> 序列: 1
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10
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 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 Cys Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130

```

[0133]



<220>  
<223> 合成的变体IL-2多核苷酸  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3) .. (3)  
<223> Xaa是Thr或Cys  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6) .. (6)  
<223> Xaa是Ser或Cys  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8) .. (8)  
<223> Xaa是Lys或Cys  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (20) .. (20)  
<223> Xaa是Asp或His  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (31) .. (31)  
<223> Xaa是Tyr或Phe  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (48) .. (48)  
<223> Xaa是Lys或Cys  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (49) .. (49)  
<223> Xaa是Lys或Cys  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (51) .. (51)  
<223> Xaa是Thr、Cys或Ser  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (57) .. (57)  
<223> Xaa是Gln或Asn  
<220>

- <221> MISC\_FEATURE  
<222> (88) .. (88)  
<223> Xaa是Asn、Arg、Ile或Gly  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (97) .. (97)  
<223> Xaa是Lys或Cys  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (98) .. (98)  
<223> Xaa是Gly或Cys  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (100) .. (100)  
<223> Xaa是Glu或Asp  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (103) .. (103)  
<223> Xaa是Phe或Cys  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (104) .. (104)  
<223> Xaa是Met或Cys  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (106) .. (106)  
<223> Xaa是Glu和Cys  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (109) .. (109)  
<223> Xaa是Asp或Cys  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (111) .. (111)  
<223> Xaa是Thr或Ser  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (125) .. (125)  
<223> Xaa是Cys或Ser



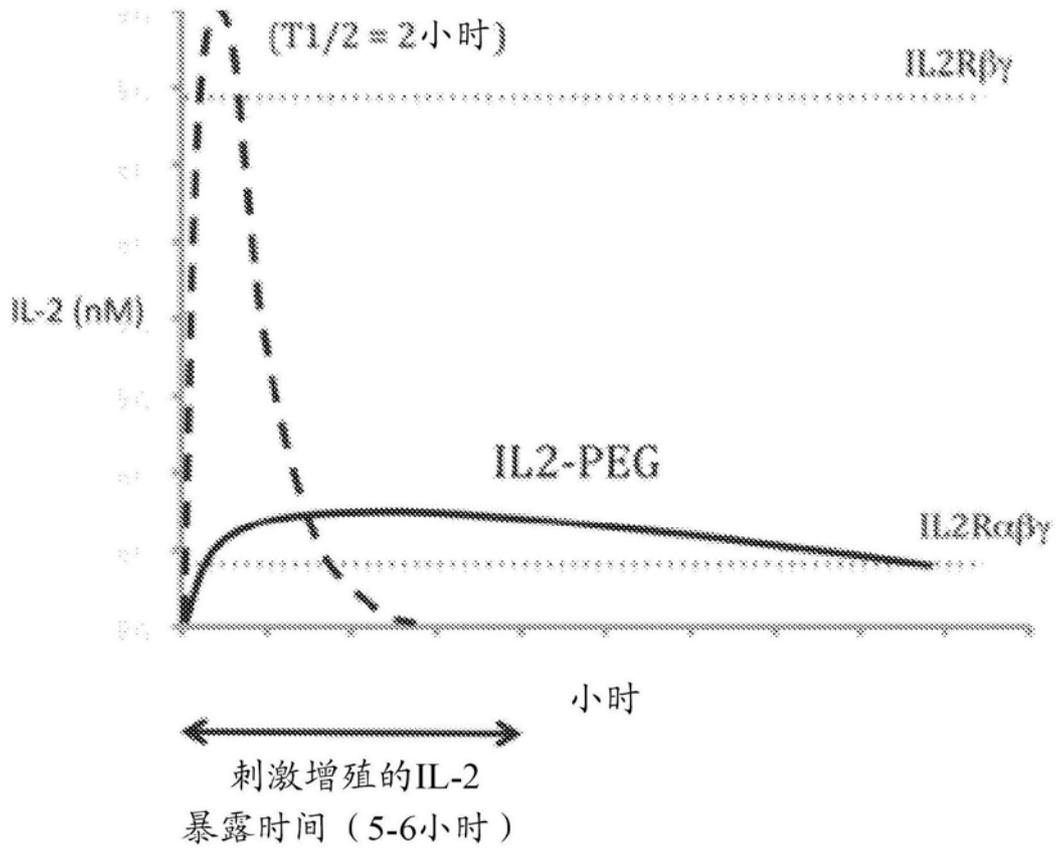


图1

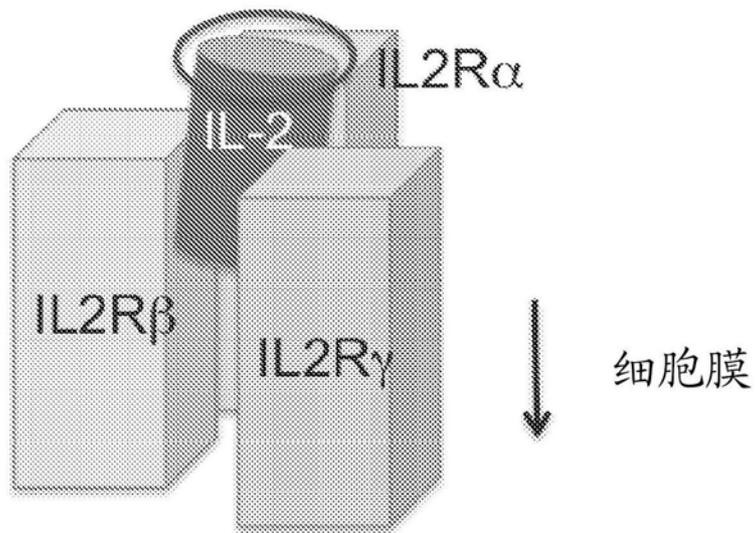


图2

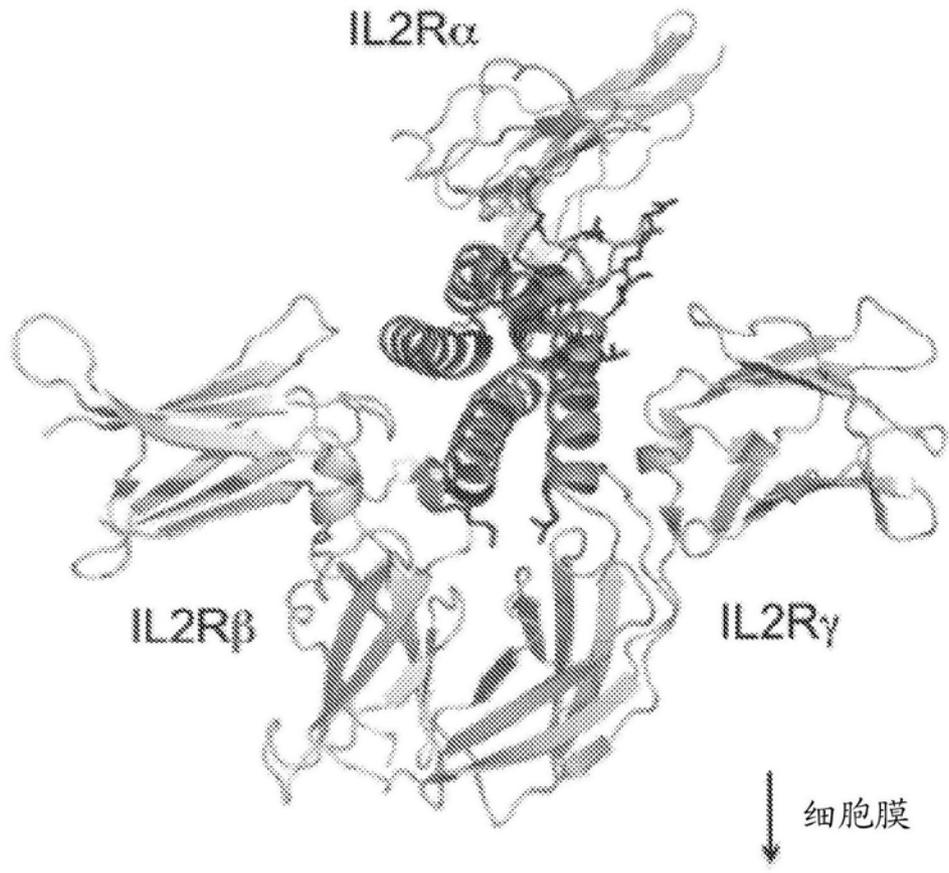


图3

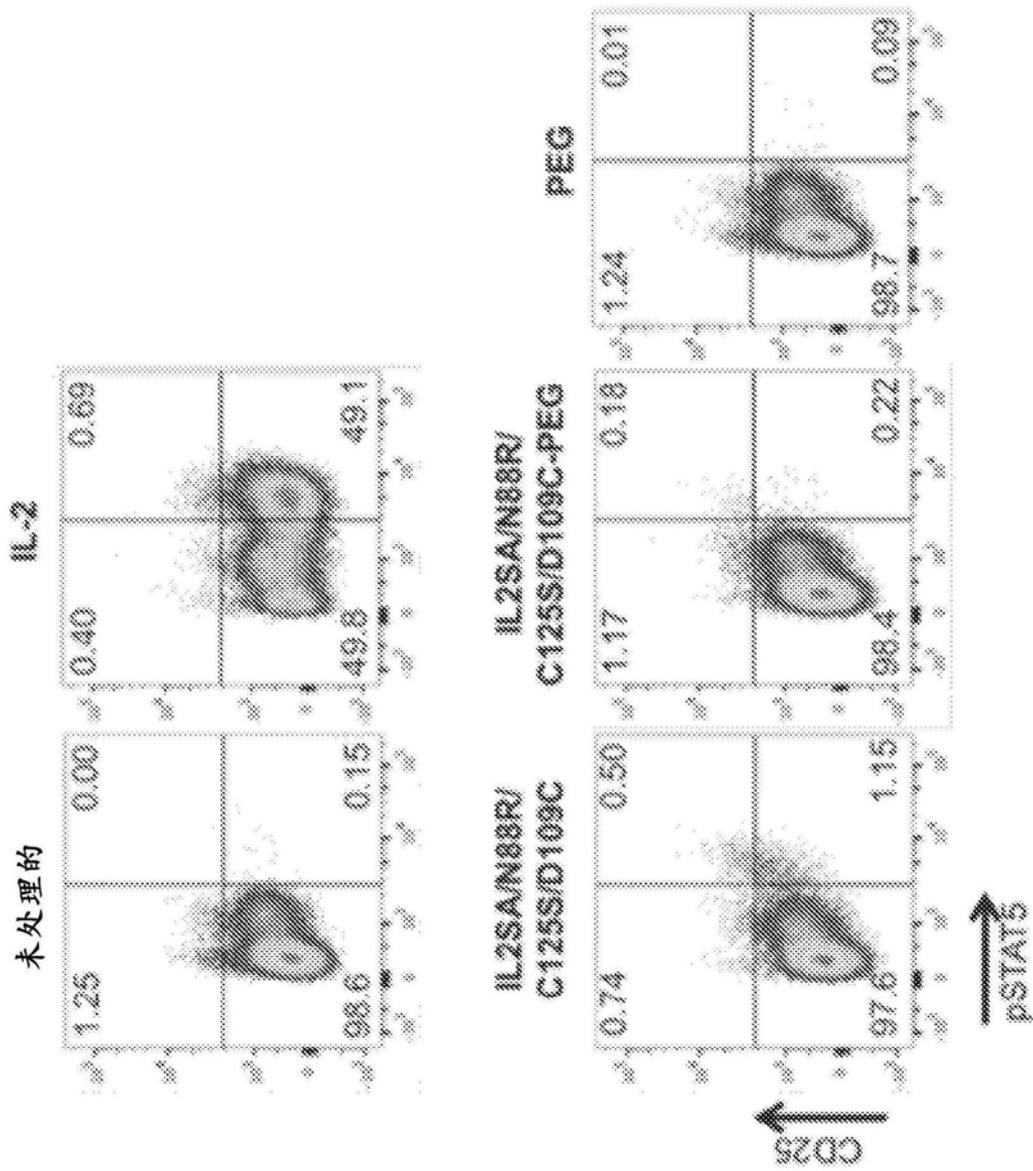


图4

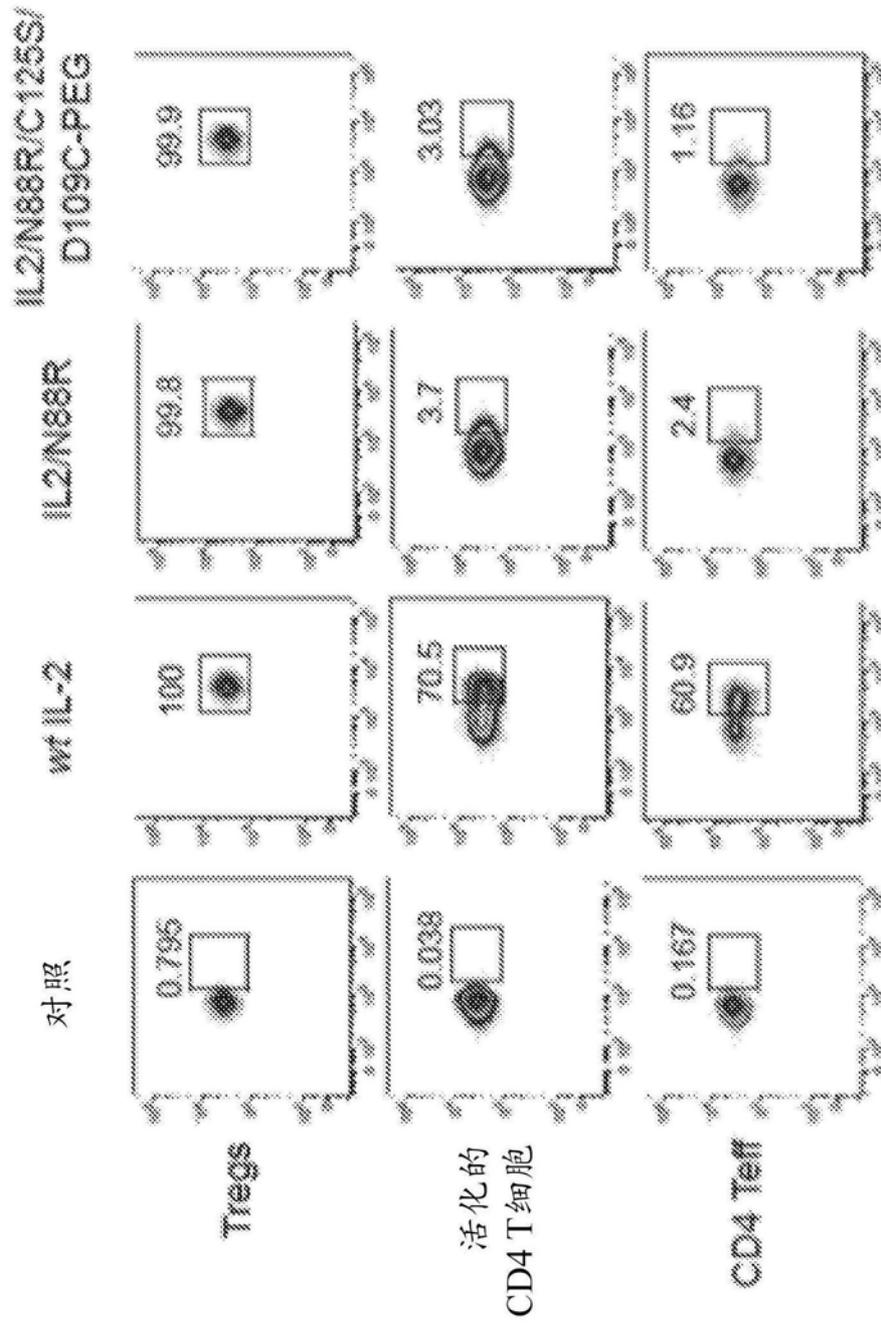


图5

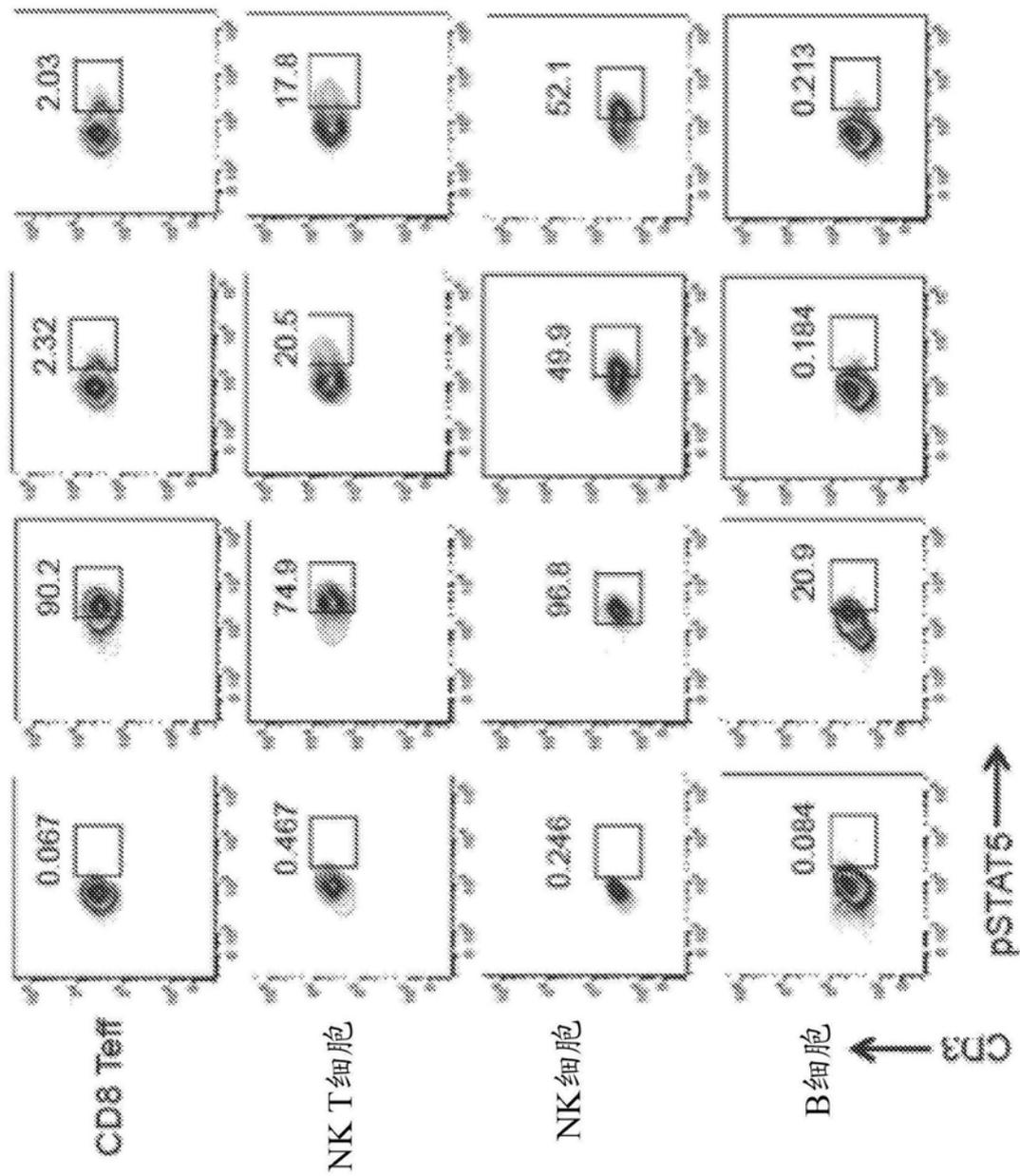


图5(续)