

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷
G01N 33/53
G01N 33/567



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02824279.3

[43] 公开日 2005年3月23日

[11] 公开号 CN 1599867A

[22] 申请日 2002.12.4 [21] 申请号 02824279.3

[30] 优先权

[32] 2001.12.4 [33] US [31] 60/337,113

[32] 2002.4.12 [33] US [31] 60/371,966

[86] 国际申请 PCT/US2002/038780 2002.12.4

[87] 国际公布 WO2003/048334 英 2003.6.12

[85] 进入国家阶段日期 2004.6.4

[71] 申请人 默克专利有限公司

地址 德国达姆施塔特

[72] 发明人 S·D·吉利斯

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 5 页 说明书 39 页 序列表 23 页
附图 2 页

[54] 发明名称 具有调节的选择性的免疫细胞因子

[57] 摘要

本发明提供了治疗指数增加的细胞因子融合蛋白和增加这些融合蛋白的治疗指数的方法。本发明融合蛋白能够结合一种以上类型的在细胞上表达的细胞因子受体，还能够结合一种以上细胞类型。此外，本发明融合蛋白比相应的天然发生的细胞因子在病人体内显示出更长的循环半衰期。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 含有融合到突变 IL-2 部分的非 IL-2 部分的融合蛋白，其中所述融合蛋白比参考蛋白对表达高亲和性受体的细胞显示出更高选择性，其中所述参考蛋白含有融合到非突变 IL-2 部分的非 IL-2 部分，并且其中所述选择性测量为表达 IL-2R α β γ 受体的细胞的活化与表达 IL-2R β γ 受体的细胞的活化的比值。

2. 权利要求 1 的融合蛋白，其中突变 IL-2 部分含有选自氨基酸置换、氨基酸缺失和氨基酸修饰的氨基酸突变。

3. 权利要求 1 的融合蛋白，其中所述选择性为含有融合到突变人 IL-2 部分上的非 IL-2 部分的参考融合蛋白的选择性的约 0.1%到约 100%，其中突变人 IL-2 部分在成熟人 IL-2 蛋白的 88 位具有 N 到 R 的氨基酸置换。

4. 权利要求 1 的融合蛋白，其中所述选择性为含有融合到突变人 IL-2 部分上的非 IL-2 部分的参考融合蛋白的选择性的约 0.1%到约 30%，其中突变人 IL-2 部分在成熟人 IL-2 蛋白的 88 位具有 N 到 R 的氨基酸置换。

5. 权利要求 1 的融合蛋白，其中所述选择性为含有融合到突变人 IL-2 部分上的非 IL-2 部分的参考融合蛋白的选择性的约 1%到约 20%，其中突变人 IL-2 部分在成熟人 IL-2 蛋白的 88 位具有 N 到 R 的氨基酸置换。

6. 权利要求 1 的融合蛋白，其中所述选择性为含有融合到突变人 IL-2 部分上的非 IL-2 部分的参考融合蛋白的选择性的约 2%到约 10%，其中突变人 IL-2 部分在成熟人 IL-2 蛋白的 88 位具有 N 到 R 的氨基酸置换。

7. 权利要求 1 的融合蛋白，其中表达 IL-2R α β γ 受体的细胞选自 CTLL-2、Kit225 和成熟 T 细胞。

8. 权利要求 1 的融合蛋白，其中表达 IL-2R β γ 受体的细胞选自 TF-1 β 细胞和 NK 细胞。

9. 权利要求 1 的融合蛋白,其中所述融合蛋白比成熟人 IL-2 蛋白具有更长的血清半衰期。

10. 权利要求 1 的融合蛋白,其中所述非 IL-2 部分是白蛋白。

11. 权利要求 1 的融合蛋白,其中所述非 IL-2 部分含有抗体域。

12. 权利要求 11 的融合蛋白,其中抗体域选自 KS-1/4、dI-KS、dI-KS(γ 4h)(FN>AQ)、huKS、huKS(N 到 Q)、NHS76(γ 2h)、NHS(γ 4h)NHS76(γ 2h)(FN>AQ)、NHS76(γ 4h)(FN>AQ) 和 14.18。

13. 权利要求 2 的融合蛋白,其中所述突变对融合蛋白的 IL-2R β γ 受体亲和性相对于对该蛋白的 IL-2R α β γ 受体亲和性具有差别效应。

14. 权利要求 1 的融合蛋白,其中差别效应大于 2 倍,并且定义如下:

$$\text{差别效应} = \frac{\text{ED50}_{\text{突变}}(\text{IL-2R } \beta \gamma \text{ 受体})}{\frac{\text{ED50}_{\text{突变}}(\text{IL-2R } \alpha \beta \gamma \text{ 受体})}{\text{ED50}_{\text{非突变}}(\text{IL-2R } \beta \gamma \text{ 受体})}} \\ \text{ED50}_{\text{非突变}}(\text{IL-2R } \alpha \beta \gamma \text{ 受体})$$

15. 权利要求 14 的融合蛋白,其中差别效应在约 5 倍到约 10 倍之间。

16. 权利要求 14 的融合蛋白,其中差别效应在约 10 倍到约 1000 倍之间。

17. 权利要求 14 的融合蛋白,其中突变 IL-2 部分含有氨基酸置换 N88R 或 D20T。

18. 权利要求 1 的融合蛋白,其中所述融合蛋白含有在成熟人 IL-2 蛋白的 88 位 N 变为 R 的氨基酸置换。

19. 权利要求 18 的融合蛋白,其中所述融合蛋白还含有在成

熟人 IL-2 蛋白的 85 位 L 到 T 和 86 位 I 到 T 的氨基酸置换。

20. 权利要求 1 的融合蛋白,其中所述融合蛋白含有在成熟人 IL-2 蛋白的 20 位 D 变为 T 的氨基酸置换。

21. 权利要求 1 的融合蛋白,其中所述突变 IL-2 部分含有在选自 K8、Q13、E15、H16、L19、D20、Q22、M23、N26、H79、L80、R81、D84、N88、I92 和 E95 的氨基酸位置具有氨基酸突变的成熟人 IL-2 蛋白。

22. 权利要求 1 的融合蛋白,其中所述突变 IL-2 部分含有在选自 L25、N31、L40、M46、K48、K49、D109、E110、A112、T113、V115、E116、N119、R120、I122、T123、Q126、S127、S130 和 T131 的氨基酸位置具有氨基酸突变的成熟人 IL-2 蛋白。

23. 权利要求 21 的融合蛋白,其中氨基酸置换为 N88R。

24. 权利要求 21 的融合蛋白,其中氨基酸置换为 D20T。

25. 权利要求 22 的融合蛋白,其中氨基酸置换为 Q126D。

26. 权利要求 21 或 22 的融合蛋白,其中所述氨基酸置换中的一个或多个对所述融合蛋白的 IL-2R β γ 受体亲和性相对于对所述蛋白的 IL-2R α β γ 受体亲和性具有差别效应。

27. 权利要求 21 或 22 的融合蛋白,其中差别效应大于 2 倍并且定义为:

$$\text{差别效应} = \frac{\text{ED50}_{\text{突变}}(\text{IL-2R } \beta \gamma \text{ 受体})}{\frac{\text{ED50}_{\text{突变}}(\text{IL-2R } \alpha \beta \gamma \text{ 受体})}{\frac{\text{ED50}_{\text{非突变}}(\text{IL-2R } \beta \gamma \text{ 受体})}{\text{ED50}_{\text{非突变}}(\text{IL-2R } \alpha \beta \gamma \text{ 受体})}}$$

28. 含有 IL-2 部分和非 IL-2 部分的融合蛋白,所述非 IL-2 部分含有对所述融合蛋白的 IL-2R β γ 受体亲和性相对于对所述蛋白的 IL-2R α β γ 受体亲和性具有差别效应的突变。

29. 权利要求 28 的融合蛋白,其中所述差别效应在约 5 倍到约 10 倍之间。

30. 权利要求 28 的融合蛋白,其中所述差别效应在约 10 倍到约 1000 倍之间。

31. 权利要求 28 的融合蛋白,其中所述非 IL-2 部分含有抗体域。

32. 权利要求 31 的融合蛋白,其中所述抗体域含有 IgG γ 1 域、IgG γ 2 域或 IgG γ 4 域。

33. 权利要求 31 的融合蛋白,其中所述突变在所述抗体域中。

34. 权利要求 33 的融合蛋白,其中所述突变将 SEQ ID NO:1 中的 N 改变为不同的氨基酸。

35. 权利要求 34 的融合蛋白,其中所述 N 被变成 Q。

36. 权利要求 32 的融合蛋白,其中所述突变将 SEQ ID NO:2 中的 FN 变成 AQ。

37. 权利要求 31 的融合蛋白,其含有 SEQ ID NO:35 和 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列。

38. 权利要求 11 的融合蛋白,其中所述抗体域含有 IgG γ 1 域、IgG γ 2 域或 IgG γ 4 域。

39. 权利要求 11 的融合蛋白,其中所述抗体域含有突变。

40. 权利要求 39 的融合蛋白,其中所述突变将 SEQ ID NO:1 中的 N 变为不同的氨基酸。

41. 权利要求 40 的融合蛋白,其中所述 N 被变成 Q。

42. 权利要求 41 的融合蛋白,其中所述突变将 SEQ ID NO:2 中的 FN 变成 AQ。

43. 权利要求 11 的融合蛋白,其中所述融合蛋白是含有 SEQ ID NO:35 和 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列的两个肽的二聚体。

44. 一种改进治疗性融合蛋白的方法,所述融合蛋白含有两个或多个结合细胞表面不同受体的蛋白域,所述方法包括:

- i. 在两种或多种体外分析中检测所述融合蛋白的活性,所述分析对所述不同受体是特异的,
- ii. 通过突变或化学或生物化学修饰法来修饰所述融合蛋白,

- iii. 在所述两种或多种分析中检测所述修饰的融合蛋白,
- iv. 鉴定相对于所述未修饰的融合蛋白在所述分析中活性受到差别影响的修饰的融合蛋白,
- v. 在动物中检测所鉴定的修饰融合蛋白的活性。

45. 权利要求 44 的方法, 其中所述融合蛋白的所述修饰影响该融合蛋白的部分与所述部分的受体的相互作用。

46. 权利要求 45 的方法, 其中所述受体存在于一种或多种所述体外分析中。

47. 权利要求 46 的方法, 其中所述体外分析是基于细胞的分析。

48. 权利要求 47 的方法, 其中所述分析利用表达 IL-2R α β γ 或 IL-2R β γ 或两者的细胞。

具有调节的选择性的免疫细胞因子

相关申请的参考

本申请要求 U.S.S.N. 60/337,113(2001 年 12 月 4 日提交)和 U.S.S.N. 60/371,966(2002 年 4 月 12 日提交)的优先权和权益,在此将它们的完整公开引入作为参考。

发明领域

本发明一般涉及含有细胞因子的融合蛋白和提高这些融合蛋白的治疗效力的方法。更具体地,本发明涉及显示出在病人体内比相应的天然发生的细胞因子具有更长循环半衰期并且具有改进的治疗性质的细胞因子融合蛋白。本发明尤其涉及具有改进的治疗特征的 IL2 融合蛋白。

背景技术

白介素-2(IL-2)是一种作用于免疫系统而主要产生细胞介导的免疫应答的有效细胞因子。在适宜的条件下,在抗原位点的附近局部产生高浓度的 IL-2 以便提供抗原免疫应答产生所需要的共同刺激信号。由于 IL-2 在 T 细胞的生长和分化中的作用,它已经成为治疗肿瘤的免疫治疗方法中的候选者。除了刺激 T 细胞,IL-2 还显示出刺激 B 细胞、NK 细胞、淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)、单核细胞、巨噬细胞和树突细胞。

IL-2 是被批准的治疗转移性肾癌和转移性黑素瘤的治疗性药物,但是其应用受到严重的毒副作用的限制,这些毒副作用包括发烧、恶心、血管渗漏和低血压。在施用 IL-2 时所观察到的各种毒性作用中,最不希望的并且被认为严重干扰 IL-2 治疗的一种毒性作用是血管渗漏综合症(vascular leak syndrome, VLS)及其相关并发症。

因此，在本领域中需要进一步增强 IL-2 蛋白的治疗有用性。

发明概述

本发明部分基于 IL-2 融合蛋白的 IL-2 部分中的突变的鉴定，该突变增加 IL-2 融合蛋白的最大耐受剂量(相对于施用于病人时，该蛋白的最大有效剂量而言)。优选的融合蛋白能够通过明显不同的相互作用结合一种以上在病人体内的相同细胞上表达的受体种类。优选的细胞因子融合蛋白包括能够结合一种以上类型的细胞因子受体复合物和结合一种以上细胞类型的细胞因子。本发明还提供了鉴定具有有用性质的特定细胞因子融合蛋白变体的方法。

本发明提供的融合蛋白含有融合到突变 IL-2 部分上的非 IL-2 部分，其中该融合蛋白显示出比参考蛋白(包括与非突变 IL-2 部分融合的非 IL-2 部分)更强的选择性，并且选择性测量为表达 IL-2R α β γ 受体的细胞的活化相对于表达 IL-2R β γ 受体的细胞的活化的比值。

融合蛋白的突变 IL-2 部分包括成熟人 IL-2 蛋白的一个或多个氨基酸的突变。在一个实施方案中，根据本发明的融合蛋白包括 IL-2 部分中的一个或多个氨基酸位点的氨基酸置换。在另一个实施方案中，本发明的融合蛋白包括 IL-2 部分中的一个或多个氨基酸位点的氨基酸的缺失。在另一个实施方案中，本发明的融合蛋白包括该融合蛋白的 IL-2 部分中的一个或多个氨基酸的修饰。

本发明的融合蛋白中的突变改变了融合蛋白相对于参考融合蛋白的选择性，其中选择性测量为表达 IL-2R α β γ 受体的细胞的活化相对于表达 IL-2R β γ 受体的细胞的活化的比值。融合蛋白中的突变还可以导致对该融合蛋白的 IL-2R β γ 受体亲和性相对于对该融合蛋白的 IL-2R α β γ 受体亲和性产生差别效应。优选的突变或变更导致融合蛋白对表达 IL-2R β γ 受体的细胞的活化作用相对于该融合蛋白对表达 IL-2R α β γ 受体的细胞的活化作用减少。

本发明优选的融合蛋白通常显示出大于约 2 倍的差别效应。在一个方

面, 通过依赖 IL-2 生长的细胞或细胞系的增殖性应答来测量差别效应。这种对融合蛋白的应答表示为 ED50 值, 其通过绘出剂量应答来曲线和确定导致半数最大应答的蛋白浓度得到。通过本发明融合蛋白在表达 IL-2R β γ 受体的细胞上的 ED50 值与在表达 IL-2R α β γ 受体的细胞上的 ED50 值的比值相对于参考融合蛋白的 ED50 值的比值, 测量了该融合蛋白的差别效应。

本发明融合蛋白的选择性可以相对于含有融合到非突变 IL-2 部分上与融合蛋白中的非 IL-2 部分相同的非 IL-2 部分的参考融合蛋白来测量。在优选的实施方案中, 如上面描述针对本发明融合蛋白测量到的差别效应在约 5 倍到约 10 倍之间。优选地, 本发明融合蛋白显示出的差别效应在约 10 倍到约 1000 倍之间。

在一个备选的优选实施方案中, 将融合蛋白的选择性与如下参考融合蛋白的选择性作比较, 该参考融合蛋白含有与该融合蛋白相同的非 IL-2 部分, 该非 IL-2 部分在参考融合蛋白中融合到 IL-2 部分(包括在 88 位具有天冬酰胺变为精氨酸的氨基酸置换(N88R)的成熟人 IL-2)上。具有改进的治疗指数的本发明融合蛋白包括选择性和 N88R 的选择性接近但是为具有 N88R 氨基酸置换的参考融合蛋白的选择性的约 0.1%到约 100%的融合蛋白。在另一个实施方案中, 本发明融合蛋白的选择性是在 IL-2 部分具有 N88R 氨基酸置换的参考融合蛋白的选择性的约 0.1%到约 30%。本发明融合蛋白还包括选择性是在 IL-2 部分具有 N88R 氨基酸置换的参考融合蛋白的选择性的约 1%到约 20%的融合蛋白。本发明融合蛋白的选择性还可以是在成熟人 IL-2 部分中包含 N88R 氨基酸置换的参考融合蛋白的选择性的约 2%到约 10%。

本发明融合蛋白具有比成熟人 IL-2 蛋白的血清半衰期更长的血清半衰期。本发明融合蛋白的长血清半衰期可以归因于该融合蛋白的非 IL-2 部分。例如, 在一个实施方案中, 本发明融合蛋白的非 IL-2 部分是白蛋白。在另一个实施方案中, 本发明融合蛋白的非 IL-2 部分是抗体域, 包括例如 KS-1/4 抗体域变体、NHS76 抗体域变体和 14.18 抗体域变体。该抗体域也

可选自各种其他抗体，例如抗各种肿瘤和病毒抗原的抗体。

在一个优选的实施方案中，如上描述，针对本发明融合蛋白测量到的差别效应为约 5 倍到约 10 倍。优选地，本发明融合蛋白所显示的差别效应在约 10 倍到约 1000 倍之间。

有用的是突变本发明融合蛋白的 IL-2 部分的氨基酸以便导致 2 倍或更大的差别效应。IL-2 部分中不同的氨基酸突变可以导致差别效应大于约 2 倍、在约 5 倍和约 10 倍之间或优选地在约 10 倍和约 1000 倍之间。在一个优选的实施方案中，氨基酸突变是用苏氨酸置换相应于成熟的人 IL-2 部分的第 20 位的天冬氨酸(D20T)。在另一个优选的实施方案中，氨基酸突变是用精氨酸置换成熟的人 IL-2 蛋白的 88 位的天冬酰胺(N88R)。本发明融合蛋白还可以包括在一个以上的氨基酸位置的突变。在一个实施方案中，根据本发明的融合蛋白包括将成熟人 IL-2 蛋白第 88 位天冬酰胺变为精氨酸、85 位亮氨酸变为苏氨酸和 86 位异亮氨酸变为苏氨酸的氨基酸置换。

IL-2 部分中某些位置的氨基酸突变可以导致大于约 2 倍的差别效应。有用的是突变相应于成熟人 IL-2 蛋白的 K8、Q13、E15、H16、L19、D20、Q22、M23、N26、H79、L80、R81、D84、N88、I92 和 E95 位的氨基酸。其他有用的可突变氨基酸位置是成熟人 IL-2 蛋白的 L25、N31、L40、M46、K48、K49、D109、E110、A112、T113、V115、E116、N119、R120、I122、T123、Q126、S127、S130 和 T131。在本发明融合蛋白中优选的突变氨基酸位置包括 D20、N88 和 Q126。

在一个实施方案中，在上面列出的优选位置处的一个或多个氨基酸在融合蛋白中被突变。在一个优选的实施方案中，用精氨酸置换 88 位的天冬酰胺(N88R)。在另一个优选的实施方案中，用苏氨酸置换 20 位的天冬氨酸(D20T)。在另一个优选的实施方案中，用天冬氨酸置换 126 位的谷氨酰胺(Q126D)。各种氨基酸置换导致本发明融合蛋白在具有 IL-2R α β γ 受体的细胞上的活性相对于其在具有 IL-2R β γ 受体的细胞上的活性有选择性，此选择性可以通过融合蛋白对 IL-2R β γ 受体的亲和性相对于融合蛋白对 IL-2R α β γ 受体的亲和性反映出来。

在上述一个或多个氨基酸位置含有突变的融合蛋白具有大于约 2 倍的差别效应。优选地，差别效应在约 5 倍到 10 倍之间，更优选地，在约 10 倍到约 1000 倍之间。

除了突变 IL-2 部分中的氨基酸，也可以突变非 IL-2 部分中的氨基酸。在一个优选的实施方案中，非 IL-2 部分是抗体域。该抗体域可以选自各种不同的免疫球蛋白(Ig)抗体，优选 IgG 抗体，包括例如，IgG γ 1、IgG γ 2 和 IgG γ 4 的抗体域，或者这些抗体域的任何组合。如本文中所述的，术语“抗体”和“免疫球蛋白”意指(i)一种完整抗体(例如，单克隆抗体或多克隆抗体)，(ii)完整抗体的抗原结合部分，包括例如，Fab 片段、Fab'片段和(Fab')₂片段、Fv 片段、单链抗体结合位点、sFv，(iii)双特异性抗体和其抗原结合部分，和(iv)多特异性抗体和其抗原结合部分。在本发明蛋白中，免疫球蛋白 Fc 区可包括至少一个免疫球蛋白恒定重链区，例如免疫球蛋白恒定重链 2(CH₂)区、免疫球蛋白恒定重链 3(CH₃)区，以及依赖于用于产生 Fc 区的免疫球蛋白的类型，任选地免疫球蛋白恒定重链 4(CH₄)区，或者上面的组合。在特定实施方案中，免疫球蛋白 Fc 区可能缺乏免疫球蛋白恒定重链 1(CH₁)区。虽然免疫球蛋白 Fc 区可以基于任何免疫球蛋白种类，例如，IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，但是优选免疫球蛋白 Fc 区基于 IgG。本发明融合蛋白中包括的抗体部分优选来自人，但是也可来自鼠抗体或者任何其他哺乳动物或非哺乳动物免疫球蛋白。本发明融合蛋白中所用的 Fc 区可以考虑改良以适应于该分子的特定应用。在一个实施方案中，Fc 区来自免疫球蛋白 γ 1 同种型或其变体。在另一个实施方案中，Fc 区来自免疫球蛋白 γ 2 同种型或其变体。在另一个实施方案中，Fc 区可来自免疫球蛋白 γ 3 同种型或其变体。Fc 区可以含有一个铰链区，该铰链区来自与 Fc 区自身不同的免疫球蛋白同种型。例如，Fc 区可以来自免疫球蛋白 γ 2 同种型并且包括一个来自免疫球蛋白 γ 1 同种型或其变体的铰链区。在本发明的另外一个优选的实施方案中，Fc 区来自免疫球蛋白 γ 4 同种型。尤其优选经修饰后含有一个来自免疫球蛋白 γ 1 同种型或其变体的铰链区的免疫球蛋白 γ 4 同种型。

在一个实施方案中，本发明融合蛋白在 Ig 部分含有突变。一个有用的突变是 IgG γ 1 序列 QYNSTYR(SEQ ID NO:1)中的突变——将 N 变为 Q；一个尤其有用的突变是 γ 2 或 γ 4 序列 QFNST(SEQ ID NO:2)中的突变——将二肽基元 FN 变为 AQ。

本发明还描述了编码本发明各种融合蛋白的 DNA 构建体。本发明融合蛋白对于治疗癌症、病毒感染和免疫疾病尤其有用。

此处公开的这些目的和其他目的以及优点和特征将在下面的说明、附图和权利要求中进一步彰显。

附图简述

图 1 描述了细胞因子与第二蛋白部分的融合，该融合改变了细胞因子的天然结合特征。图 1A 描述了含有 Fc 的融合蛋白中 IL-2 的融合配偶体，其是一种二聚体分子，如抗体或 Fc 部分，因此当融合蛋白的 IL-2 部分和其受体相互作用时两分子的 IL-2 被带到细胞表面。图 1B 描述了产生相同效果的另一种机理。

图 2 显示了融合蛋白免疫细胞因子 huKS-IL2(用三角形代表)和两个变体——huKS-ala-IL2(用圆形代表)和 huKS-ala-IL2(N88R)(用星号代表)的典型药物动力学曲线。

发明详述

本发明提供了提高 IL-2 融合蛋白尤其是 IL-2 免疫细胞因子的治疗指数的方法和组合物。根据本发明，治疗分子的治疗指数是分子的最大耐受剂量除以该分子的最大有效剂量的比值。本发明包括 IL-2 免疫细胞因子的改良变体，其与游离的 IL-2 相比显示出明显更长的循环半衰期。本发明还提供了显示出选择性 IL-2 应答的 IL-2 融合蛋白，尤其是 IL-2 免疫细胞因子，选择性 IL-2 应答可以反映为本发明融合蛋白对具有各种效应子功能的细胞的活化作用降低，这些细胞的活化是 IL-2 毒性作用的主要原因。而且，本发明提供了具有改良活性的 IL-2 融合蛋白。一种本发明 IL-2 融合蛋白

包括在一个或多个氨基酸位置的变化,这些变化改变 IL-2 融合蛋白对不同 IL-2 受体的相对亲和性,导致 IL-2 融合蛋白的生物学性质改变。本发明可以用于减少或最小化与 IL-2 治疗相关的毒性。不管任何给定 IL-2 毒性(如 VLS)的根本机制如何,该毒性均部分由如下事实导致,即尽管希望 IL-2 在特定位点起作用,但由于 IL-2 为静脉内注射,所以 IL-2 可以在身体内发挥全身性作用。IL-2 的全身性施用比局部施用需要高得多的剂量,这反过来将促进在较低剂量时看不到的毒性,因此上述事实会使问题恶化。本发明提供了减毒 IL-2 融合蛋白。本发明还提供了生产减毒 IL-2 融合蛋白的方法。

一般地,本发明对包括融合到非 IL-2 部分上的 IL-2 部分的融合蛋白有用。根据本发明,非 IL-2 部分可以是合成的或天然蛋白或其一部分或变体(包括物种变体、等位变体和突变体)。优选的非 IL-2 部分包括 Fc 和白蛋白部分。根据本发明,IL-2 部分可以是天然 IL-2 分子或其保留了至少一种 IL-2 活性或功能的部分或变体(包括物种变体、等位变体和突变体)(根据本发明,IL-2 部分可以是修饰后具有不同的 IL-2 受体结合亲和性的 IL-2)。

根据本发明,细胞通过特定细胞表面受体(IL-2R)应答 IL-2,IL-2R 以两种形式存在。高亲和性受体是异源三聚体,由 α 、 β 、 γ 亚基组成;中等亲和性受体是异源二聚体,由 β 和 γ 亚基组成。这两种 IL-2R 对 IL-2 的结合常数相差两个数量级。通过 β γ 复合物内的相互作用在受体的胞质侧介导信号的转导。不同细胞类型表达不同量的 α 、 β 和 γ 亚基。例如,活化的 T 细胞表达所有三种亚基以形成高亲和性 IL-2R α β γ , 而成熟的静息 T 细胞和 NK 细胞表达 β 和 γ 亚基以得到中等亲和性 IL-2R β γ 。这样,为达到刺激,细胞需要不同水平地暴露于 IL-2,反过来,通过调节特定细胞环境中的 IL-2 活性,可以控制免疫应答的性质。

本发明的方法和组合物在 IL-2 融合蛋白如带有 IL-2 的免疫细胞因子的情况下尤其有用。根据本发明,带有 IL-2 的免疫细胞因子是已被证实可以通过直接将 IL-2 靶向肿瘤微环境内而显著提高 IL-2 的治疗效力的合成

分子。免疫细胞因子是由抗体部分和细胞因子部分如 IL-2 部分组成的融合蛋白。根据本发明，抗体部分可以是完整抗体或免疫球蛋白或其具有生物学功能如抗原特异结合亲和性的部分或变体(包括物种变体、等位变体和突变体)。类似地，本发明的细胞因子部分可以是天然细胞因子或其保持至少某种细胞因子活性的部分或变体(包括物种变体、等位变体和突变体)。免疫细胞因子治疗的好处是显而易见的。例如，免疫细胞因子的抗体部分可以识别肿瘤特异性表位而将免疫细胞因子分子靶向肿瘤位点。因此，可以将高浓度的 IL-2 递送到肿瘤微环境中，从而导致许多上面提到的免疫效应细胞的活化和增殖，而所用的免疫细胞因子的剂量比使用游离 IL-2 时所需要的剂量要低得多。而且，与游离 IL-2 相比，免疫细胞因子更长的循环半衰期也有助于免疫细胞因子的效力。最后，也可以利用抗体的天然效应子功能，例如在含有 Fc γ RIII 的 NK 细胞中激活抗体依赖的细胞的细胞毒性(ADCC)。

IL-2 免疫细胞因子比游离 IL-2 有更大的效力。然而，IL-2 免疫细胞因子的某些特征可能加重 IL-2 分子的潜在副作用。因为相对于游离 IL-2，IL-2 免疫细胞因子在血流中有显著更长的循环半衰期，IL-2 或融合蛋白分子的其他部分激活通常在脉管系统中存在的组分的可能性亦增加。同样的考虑也适用于含有融合到可导致循环中 IL-2 半衰期延长的另一部分如 Fc 或白蛋白上的 IL-2 的其他融合蛋白。

本发明提供了改变的 IL-2 融合蛋白，例如与完整抗体或抗体的一部分或者白蛋白融合的 IL-2，和这些融合蛋白未改变的形式相比，此改变形式的融合蛋白的毒性减弱。本发明还提供了在 IL-2 和/或非 IL-2 部分中具有一个或多个变化的融合蛋白，这些变化改变了融合蛋白在表达 α 、 β 和 γ IL-2 受体亚基的细胞中相对于在表达 β 和 γ IL-2 受体亚基的细胞中的相对活性。本发明还提供了含有改变的 IL-2 的融合蛋白，与这些融合蛋白未改变的形式相比，此改变的融合蛋白显示出对 IL-2 受体的 α 、 β 或 γ 亚基的亲合性发生改变。

许多含有 IL-2 的抗体融合蛋白显示出与游离 IL-2 相比具有量变的但

是对于治疗应用却不是质量上最优的 IL-2 活性。本发明提供了修饰形式的抗体-IL2 融合蛋白,其中 IL-2 或抗体或两部分都发生改变以为给定应用从质量上改进 IL-2 活性。

本发明还提供了用于确定在设计用于治疗疾病的修饰融合蛋白时尤其有用的修饰类型的策略。

图 1 描述了融合蛋白可以结合至细胞表面从而改变融合蛋白内的部分的受体结合特征的可能机制。例如,图 1A 描述了 IL-2 的融合配偶体是二聚体分子。这增加了另一个 IL-2 分子与其受体相互作用的可能性,这例如可以通过降低解离速率实现,从而导致结合的净增加。图 1B 描述了产生相同效果的另一个机制。在带有 IL-2 受体和针对融合蛋白中的 IL-2 融合配偶体的受体(例如针对 Ig 部分的 Fc 部分的 Fc 受体)的细胞中,融合配偶体的受体(例如 Fc 受体)能够结合融合蛋白并将其拴在细胞表面,在细胞表面融合蛋白结合 IL-2 受体的可能性增加。

最近完成了一种抗体-细胞因子融合蛋白(称为 huKS-IL2)的 I/II 期试验。huKS-IL2 是由融合到细胞因子白介素 2 的 KS-1/4 抗体组成的融合蛋白。KS-1/4 识别肿瘤细胞表面抗原 EpCAM(上皮细胞粘附分子)从而具有将 IL-2 浓缩在肿瘤位点的效果。在该试验过程中,测量了病人对治疗的反应。对治疗显示出显著反应的一个病人经历了临床部分反应,接着是疾病的稳定和痛苦药物治疗的减少。该病人在前的标准治疗已经失败。该病人的生命比没有这种治疗时所预期的有显著延长。

令人惊奇的是,作为前面的化疗的结果,该病人的 T 细胞群基本上被消除了,该病人的 T 细胞数比试验中的所有其他病人的要低得多。考虑到已知 IL-2 激活 T 细胞,例如,已知 IL-2 增强 CD8(+)T 细胞对肿瘤细胞的细胞毒性,明显缺少 T 细胞的该病人的强烈反应是尤其没想到的。该发现促使进一步研究新的抗体-IL-2 融合蛋白,其中 IL-2 部分可以显示出改变的细胞特异性,导致 IL-2 融合蛋白的治疗指数的提高。

从 IL-2 的晶体结构、与相关细胞因子的序列比较和定点诱变研究,在阐明 IL-2 中与不同 IL-2 受体亚基接触的氨基酸和它们对生物学活性的重

要性方面取得了很大进步。例如，D20 残基(在所有哺乳动物的 IL-2 中都保守)是结合 IL-2 受体的 β 亚基的关键残基，在此位置的各种置换造成明显不同的影响。例如，变体 IL-2(D20K)不能结合任何 IL-2R 复合体并且通常没有活性，而变体 IL-2(D20E)或 IL-2(D20T)保留它们的生物学活性。氨基酸位置 R38 和 F42 对于结合 α 亚基是关键，尽管在这些位点的突变减小了 IL-2 和高亲和性受体 IL-2R $\alpha \beta \gamma$ 的相互作用，它仍然结合中等亲和性受体 IL-2R $\beta \gamma$ ，从而保留了一些生物活性。N88 是另一个参与介导与 β 亚基相互作用的残基，虽然 IL-2(N88R)变体对中等亲和性受体的亲和力显著降低，其对于高亲和性受体的亲和力基本没变。所以 IL-2 的 N88R 突变体仍然能够活化 T 细胞。

可以通过许多本领域中已知方法(包括例如放射免疫测定法)测定本发明融合蛋白对不同受体的结合亲和性。

因此，可以通过突变与受体亚基之一接触的特定氨基酸或者改变氨基酸残基的组合而扰乱 IL-2 的结构，使得其对一种 IL-2 受体复合体比对另一种 IL-2 受体复合体具有更大亲和力。结果，该分子在一种细胞类型中比在另一种细胞类型中显示出更大活性。根据本发明，可以操纵 Ig-IL2 融合蛋白中的 IL-2 结构而得到期望效果。而且，在某些情况下，Ig-IL2 变体融合蛋白和相应的游离 IL-2 突变蛋白相比具有不同的生物学特征。

根据本发明，还可以操纵融合蛋白中的 IL-2 部分使得其对一个或多个 IL-2 受体亚基(α ， β 或 γ)的亲和力改变从而导致该融合蛋白的生物活性总体降低。这些变体能够活化 IL-2 应答细胞，但是需要比游离 IL-2 更高的浓度。所以，当 IL-2 融合蛋白被浓缩在目的靶位点(例如通过靶定部分)时，这些变体具有改良的治疗指数。

IL-2R 的 α 受体亚基似乎具有拴系功能：该低亲和性受体结合 IL-2 并保持 IL-2 接近细胞表面，从而附近的细胞表面 IL-2R β 和 IL-2R γ 受体亚基的有效浓度增加了。IL-2 受体的 α 亚基和 $\beta \gamma$ 亚基一起产生了高亲和性 IL-2R 复合体。本发明部分是基于认识到 IL-2 融合蛋白能够与细胞表面受体发生多种不同的相互作用。例如，对于含有抗体部分的融合蛋白，抗体

部分自身能够促进融合蛋白与细胞表面的结合,而且 IL-2 可以以多份拷贝存在于融合蛋白中。结果,IL-2 可以被拴在只表达 IL-2R 的 β 或 γ 亚基的细胞上,从而 IL-2 活化这种细胞的能力增强。

例如,一种融合 IL-2 的二聚体免疫球蛋白(Ig)具有 IL-2 的两份拷贝,从而一个 IL-2 部分与其受体的结合增加了第二个 IL-2 部分与相同细胞表面上的受体分子的相互作用的可能性。图 1A 中的图解代表了细胞表面上 Ig-IL2 融合蛋白的可能构型。本发明提供了 Ig-IL2 融合蛋白,其中 IL-2 部分被改变而降低与 IL-2R β γ 受体的结合。

可以改变 Ig-IL2 融合蛋白与某些免疫细胞表面的结合的另一个机制是细胞表面的 Fc 受体可以结合 Ig 部分的 Fc 部分从而将 IL-2 拴到具有 Fc 受体和 IL-2 受体的细胞表面(图 1B)。这些细胞包括 NK 细胞、B 细胞和巨噬细胞。本发明提供了 Ig 部分被改变而降低了与 Fc 受体的结合的 Ig-IL2 融合蛋白。本发明还提供了 Ig 部分和 IL-2 部分都整合了上述性质的改变的 Ig-IL2 融合蛋白。

基于可以人工将 Ig-IL2 融合蛋白拴到具有 IL-2 受体亚基的细胞上这一知识,可以设计拴系部分发生改变的变体融合蛋白。例如,有用的是改变 Ig-IL2 融合蛋白的 Fc 受体结合特征。这可以通过例如突变 Fc 部分内的已知氨基酸接触位点或者通过除去 N-连接的糖基化(通过突变或蛋白的酶促消化)完成。

类似地,根据本发明,有用的是在 IL-2 部分内导入对结合 IL-2 受体亚基有影响的突变。尤其是,有用的是突变 IL-2 中与 IL-2 受体的 β 亚基接触的氨基酸。一类尤其有用的突变是降低 IL-2 与 IL-2R β 的结合能,但是不空间位阻该相互作用。例如,将接触氨基酸突变为具有更小侧链的氨基酸尤其有用。这种突变的效果是显著降低 IL-2 对 β - γ 形式的 IL-2 受体的亲和力和减少这些受体介导的信号途径的活化,但是对 α - β - γ 形式的 IL-2 受体的结合或者 IL-2 在具有这些 IL-2 受体的细胞内引起的活性产生相对很小的影响或没有影响。在本发明一个优选的实施方案中,突变减小了但没有除去对 β - γ 形式的 IL-2 受体的亲和力。

类似地，有用的是在 IL-2 表面的与 IL-2 受体的 α 亚基相互作用的氨基酸中导入突变。一种尤其有用的突变是降低 IL-2 与 IL-2R α 的结合能，但是不空间位阻该相互作用。例如，将接触氨基酸突变为具有更小侧链的氨基酸尤其有用。这种突变的效果是显著降低 IL-2 对 α - β - γ 形式的 IL-2 受体的亲和力，但是对 β - γ 形式的 IL-2 受体的结合影响相对很小或没有影响。在本发明一个优选的实施方案中，突变减小了但没有除去对 α - β - γ 形式的 IL-2 受体的亲和力。

类似地，有用的是在 IL-2 表面的与 IL-2 受体的 γ 亚基相互作用的氨基酸中导入突变。如前面的情况，一种尤其有用的突变是降低 IL-2 与 IL-2R γ 的结合能，但是不空间位阻该相互作用。例如，将接触氨基酸突变为具有更小侧链的氨基酸尤其有用。这种突变的效果是显著降低 IL-2 对 β - γ 形式的 IL-2 受体的亲和力，但是对 α - β - γ 形式的 IL-2 受体的结合影响相对很小或没有影响。在本发明一个优选的实施方案中，突变减小了但没有除去对 β - γ 形式的 IL-2 受体的亲和力。

还有用的是向 IL-2 上与 IL-2 受体亚基的不同表面相互作用的氨基酸中导入突变的组合。尽管每个突变单独地对 IL-2 与 α - β - γ 形式的或 β - γ 形式的 IL-2 受体的结合影响很小或没有影响，但是这些突变的组合可以使 IL-2 对其受体的亲和性或 IL-2 的生物活性达到所需的降低效果。

根据本发明，IL-2 其他部分的突变可以间接地有助于改变 IL-2 与 β - γ 形式或 α - β - γ 形式的 IL-2 受体的相互作用，从而导致具有调整的活性的 IL-2 分子。例如，突变可以轻微的改变该分子的构象，由此改变其结合特性。

根据本发明，还有用的是产生在 IL-2 部分中含有调节 IL-2 部分与 IL-2 受体复合体的结合的突变并在抗体部分中含有突变的融合蛋白。如果想要改变 Ig-IL2 融合蛋白与特定 Fc 受体的相互作用，那么这些融合蛋白可能尤其有用。

与融合到另一个蛋白部分如 Ig 的 IL-2 部分相比，游离的 IL-2 部分可以显示出对 IL-2R 复合体的不同的结合特征。一种可能的发生机制已经在

上面给出。另一种可能机制是免疫细胞因子中的 IL-2 在空间或构象上受限并且该特定限制反映在 IL-2 部分与不同 IL-2 受体复合体的结合特征中。所以，有用的是在融合蛋白中导入调节该限制的改变。例如，非 IL-2 部分的改变可用于调节 IL-2 的活性。

可以在适宜的细胞或动物模型中检验在特定应用(如人类疾病的治疗)中特定 IL-2 融合蛋白(如 Ig-IL2 融合蛋白或含有 Fc 或白蛋白的 IL-2 融合蛋白)的有用性。可能时优选在动物中检验，因为此检验与人类疾病中免疫系统行为的完全复杂性更接近。例如，某些细胞的特定平衡可能对抵抗目的疾病，如癌症或细菌、病毒或寄生虫感染是最佳的。例如，相对高水平的 T 细胞活性可能用于抗某些肿瘤类型，而相对高水平的 NK 细胞活性可能用于抗不同的肿瘤类型。

本发明的另一个特点是具有上佳的毒性谱的 IL-2 融合蛋白变体，如 Ig-IL2 融合物或含有 Fc 或白蛋白的 IL-2 融合物。例如，含有突变 D20T 的 Ig-IL2 融合蛋白在动物如小鼠中显示出比相应的 20 位为 D 的 Ig-IL2 融合蛋白有更低的毒性。在另一个实例中，在 IL-2 部分含有突变 N88R 或 L85T、I86T、N88R 突变组合的 Ig-IL2 融合蛋白在动物如小鼠中显示出比相应的在 88 为 N 的 Ig-IL2 融合蛋白有更低的毒性。而且，在 IL-2 部分含有突变 D20T 或突变 N88R 的抗体-IL2 融合蛋白当用于治疗表达该抗体的抗原靶标的肿瘤时显示出与相应的亲本抗体-IL2 融合蛋白相当的效力。

相对所报道的游离 IL-2 蛋白中的 D20T 突变的性质，Ig-IL2 融合蛋白的 D20T 变体的性质尤其令人惊奇。具体地，游离 IL-2 蛋白的 D20T 突变并不使该蛋白相对于野生型 IL-2 蛋白在对具有 IL-2R α β γ 的细胞或具有 IL2R- β γ 的细胞的活性方面表现出不同 (Shanafelt 等，PCT WO99/60128)。然而，含有 D20T 突变的 Ig-IL2 融合蛋白活化具有 IL2R- β γ 的细胞的潜力急剧降低，但是活化具有 IL-2R α β γ 的细胞的能力基本正常。

所以，Ig-IL2 融合蛋白中 IL-2 部分的几个氨基酸的突变可以导致毒性减弱但对该融合蛋白在各种疾病的治疗中的效力相对几乎无影响。例如，

IL-2 融合蛋白变体对其受体的亲和力可能被改变的程度是该特定融合蛋白浓缩在其目的靶点的状况的函数。尤其有用的是突变 IL-2 部分内的一个或多个下面的氨基酸: Lys8、Gln13、Glu15、His16、Leu19、Asp20、Gln22、Met23、Asn26、Arg38、Phe42、Lys43、Thr51、His79、Leu80、Arg81、Asp84、Asn 88、Val 91、Ile92 和 Glu95。还有用的是突变 IL-2 部分内的一个或多个下面的氨基酸: Leu25、Asn31、Leu40、Met46、Lys48、Lys49、Asp109、Glu110、Ala112、Thr113、Val115、Glu116、Asn119、Arg120、Ile122、Thr123、Gln 126、Ser127、Ser130 和 Thr131。

本发明公开了融合到 IL-2 的 Ig 部分的形式, 例如抗体-IL2 融合物如 huKS-IL2 或 dI-NHS76-IL2, 其中融合到 IL-2 的 Ig 部分的改变影响该融合蛋白对 IL-2R 复合体的结合性质。这些改变可以是重链氨基酸序列中的氨基酸置换, 或者化学修饰。有用的氨基酸置换包括影响该融合蛋白糖基化或直接影响与 Fc 受体相互作用的置换。一种尤其有用的置换可能是抑制通常在 IgG 重链的 N297(EU 命名法)位置处发现的糖基化的置换。化学和生物化学修饰包括分子的 PEG 化或用 N-聚糖酶处理除去 N-连接的糖基链。不希望被理论所束缚, 可以设想分子的抗体部分中的特定改变可以影响 IL-2 的构象, 例如通过改变抗体分子的刚性。对于 huKS-IL2, 这些改变可以导致一种 KS-IL2 分子, 其现在在基于细胞的生物分析中对 T 细胞的选择性增加。

对于抗体-IL2 融合蛋白, 常有用的是选择一种可赋予该分子其他希望的性质的 Ig 部分。例如, 可能优选 $\gamma 1$ 亚类的 IgG 部分以保持免疫效应子功能如 ADCC。备选地, 可能优选 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 亚类的 IgG 部分, 例如以便减少 FcR 受体相互作用。当使用 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 亚类的 IgG 部分时, 尤其优选包含衍生自 $\gamma 1$ 的铰链区。

常有用的是将 Ig-IL2 融合蛋白的突变和化学或生物化学修饰与具有明显不同有用性质的其他突变(例如, 某些 Fc 区的 C 末端的赖氨酸到丙氨酸或另一疏水性残基的突变)组合使用。例如, 尤其有用的是将本发明修饰应用于抗体融合蛋白 huKS-ala-IL2 或 dI-NHS(76)-ala-IL2。还优选的是向

分子中导入能除去潜在 T 细胞表位的其他突变。尤其优选的是这些突变不会实质性地改变分子的期望性质。

本发明还公开了融合到 IL-2 的 Ig 部分的形式，例如抗体-IL2 融合物如 huKS-IL2，其中 IL-2 氨基酸序列中的特定改变，例如 IL2(D20T)或 IL2(N88R)改变了融合蛋白对 IL-2R 复合体的结合性质。成熟人 IL-2 蛋白的氨基酸序列描述于 SEQ ID NO:3。结合性质的改变反映在在基于细胞的生物分析中对 T 细胞的选择性增加。该特定突变影响对 T 细胞的选择性程度。而且，这些改变导致一种当全身性施用于小鼠时比例如 huKS-ala-IL2 的毒副作用小的融合分子，例如 huKS-ala-IL2(D20T) 或 huKS-ala-IL2(N88R)。这些改变还导致一种在许多小鼠肿瘤模型中在肿瘤治疗方面至少和正常 huKS-IL2 或 huKS-ala-IL2 一样有效的融合蛋白，例如 huKS-ala-IL2(N88R)。

因为需要清除肿瘤的免疫应答是多种多样的并且随肿瘤类型的不同而不同，所以当使用减毒分子时完全从该分子除去某个功能是不希望的。例如，在诱导了结肠癌的肺部转移的小鼠模型中，huKS-IL2 通过 T 细胞介导的机制不需要 NK 细胞能有效治疗该癌症，而在成神经细胞瘤小鼠模型中，已证实通过 huKS-IL2 消灭肿瘤需要 NK 细胞而不需要 T 细胞。因此，存在以下情况：可以更适当地调节选择性谱使得仍然允许 NK 介导的应答。在本发明的一个实施方案中，更希望的方法是精细地改变该分子的选择性谱使得仍然完成涉及多种受体类型的应答(最优选在该分子浓缩的位置)。例如，本发明提供 Ig-IL2 融合蛋白的改变，其中与相应的未修饰的 Ig-IL2 融合蛋白相比，改变的蛋白对 IL-2R α β γ 的选择性，相对于 IL-2R β γ 而言，增强了 2-10 倍、10-100 倍、100-1000 倍或者大于 1000 倍。

本发明的另一个目的是提供减毒 Ig-IL2 融合蛋白对于治疗癌症或感染性疾病的最适用途。虽然改变的选择性可能导致血管毒性降低，但增加融合蛋白的剂量不一定最优地增加治疗指数。例如，这些剂量的增加可能导致调节免疫应答的负调节机制的诱导。所以，有用的是使用低毒 Ig-IL2 融合蛋白和降低这些效果的药物的联合治疗模式。

一种最近鉴定的细胞免疫应答的有力抑制剂是一类表达高亲和 IL-2R 的 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(综述见 Maloy 和 Powrie, (2001) *Nature Immunol.* 2: 816)。根据本发明, 低毒 Ig-IL2 融合蛋白的增加的剂量可以额外地活化这些细胞。这些细胞受到刺激时将上调它们的细胞表面的 CTLA-4, CTLA-4 接合免疫细胞上的细胞表面分子 B7-1 和 B7-2 并反过来引起有效的负信号(Takahashi 等, (2000) *J. Exp. Med.* 192: 303)。这样, 这些过程的抑制剂可用于和本发明融合蛋白的联合疗法中。在一个实施方案中, 可以使用中和 CTLA-4 及其效果的抗体。在另一个实施方案中, 可以使用具有类似活性的其它蛋白, 如可溶性 B7 受体和它们的融合蛋白(例如 B7-Ig)。其他实施方案包括杀死或抑制这些调节性 T 细胞自身的抗体如抗 CD4 和抗 CD25 抗体的使用。在一个优选的实施方案中, 后者作相继施用而不是同时施用。

根据本发明, 另一个有用的机制涉及过度刺激可以导致前列腺素产生的环加氧酶 2(COX-2), 已知前列腺素抑制免疫应答(见 PCT US99/08376)。所以, 进一步的实施方案组合使用低毒 Ig-IL2 分子与 COX-2 抑制剂如吲哚美辛(indomethacin)或者更特异的抑制剂塞来考昔(Celecoxib)(Pfizer)和罗非考昔(Rofecoxib)(Merck&Co)。可以理解通过增加低毒 Ig-IL2 融合蛋白剂量也可以激活其他免疫机制, 并且可以设计组合疗法以应对这些机制。而且, 低剂量的某些细胞毒性药物(如环磷酰胺)具有体内免疫增强效果, 这些药物可能是组合治疗中有用的治疗剂。

已经开发了白蛋白融合物, 目的是产生具有延长的血清半衰期的治疗性融合蛋白。例如 Yeh 等(Yeh P 等 *Proc Natl Acad Sci USA.* [1992] 89: 1904-8.)构建了一种白蛋白-CD4 融合蛋白, 其比单独的相应 CD4 部分有长得多的血清半衰期。

有用的是构建白蛋白与 IL-2、红细胞生成素、 α 干扰素和其他配体的融合物。这些融合蛋白比单独的相应配体具有更长的血清半衰期。使用标准的遗传工程和蛋白表达技术可以在 N-到 C-末端方向构建配体-白蛋白融合物或白蛋白-配体融合物形式的这些融合物。备选地, 可以通过化学偶联

连接白蛋白和配体。

然而，白蛋白-配体融合蛋白常具有不想要的性质。不想被理论束缚，为什么白蛋白-配体融合蛋白可能具有不想要的性质的一个原因是事实上在血管内皮细胞上有白蛋白受体(Tiruppathi 等 Proc Natl Acad Sci USA. [1996] 93:250-4)。结果，配体对血管内皮细胞的影响可能被增强。

例如，白蛋白-IL2 融合蛋白具有延长的血清半衰期，但是也导致增强的血管渗漏。不想被理论束缚，注意到血管系统中 IL-2 介导的应答的活化因为融合蛋白对血管系统的内皮细胞上存在的白蛋白受体的结合而增加。白蛋白-IL2 融合蛋白对具有白蛋白受体和 IL-2 受体的细胞的结合增强，其机制和图 1b 中所示的导致 Ig-配体融合蛋白对细胞表面的结合增强的机制类似。

为了减少白蛋白-IL2 导致的血管渗漏，有用的是向 IL-2 部分导入特异性降低 IL-2 对 IL-2R β γ 受体的亲和力的突变。例如，构建白蛋白-IL2(N88R)或白蛋白-IL2(D20T)融合蛋白，随后发现其在动物如小鼠的疾病模型中具有减低的毒性和增强的治疗指数。

本发明分子用于癌和肿瘤的治疗，尤其是实体瘤的治疗。根据本发明可以治疗的肿瘤的实例是上皮来源的肿瘤，如存在但不限于，卵巢癌、前列腺癌、胃癌、肝癌、膀胱、头和颈部的癌。同样，根据本发明，神经外胚层起源的癌和肿瘤(例如，但不限于，黑素瘤、小细胞肺癌、软组织肉瘤和成神经细胞瘤)是合适的治疗候选者。

根据本发明，有用的是使治疗剂靶向到肿瘤位点或癌或转移的位点。含有抗优选由肿瘤或癌细胞呈递的抗原的抗体的 Ig 融合蛋白尤其有用。例如，含有对 EpCAM(例如 KS1/4)或胚纤连蛋白 (例如 BC1)或 CEA 或染色质复合体 (例如 NHS76)或 GD2 (例如 14.18)或 CD19 或 CD20 或 CD52 或 HER2/neu/c-erbB-2 或 MUG-1 或 PSMA 具有特异性的抗体部分的融合蛋白尤其有用。而且，抗各种病毒抗原的抗体也尤其有用。

实施例

实施例 1 在 IL-2 编码序列或抗体编码序列中具有密码子置换的 Ig-IL2 融合基因的构建

在 Gillies 等, (1998) *J. Immunol.* 160:6195-6203 中描述了一种用于免疫细胞因子的表达载体。核苷酸序列中的几处修饰使得能够将编码序列加入到人 γ -1 基因的 3' 末端。在编码重链的人 γ -1 基因中, 通过导入一个沉默突变(TCC 到 TCA)破坏了翻译终止密码子上游 280bp 处的 XmaI 限制酶切位点。另一个沉默突变(TCT 到 TCC)被导入重链的 C 末端赖氨酸上游三个残基的 Ser 密码子处产生序列 TCC CCG GGT AAA(SEQ ID NO.4), 该序列含有一个新的 XmaI 位点[Lo 等, (1998) *Protein Engineering* 11: 495-500]。

通过化学合成了 IL-2 cDNA, 其含有一个新的且单一的 PvuII 限制性酶切位点[Gillies 等, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 1428-1432]。XmaI 和 PuvII 在该表达载体中都是单一的, 它们方便了包括以下的抗体 IL-2 变体的构建。

1) huKS-ala-IL2。 先前已经描述了 huKS-ala-IL2 的构建(例如 WO01/58957)。所得蛋白在 Ig 重链恒定区和成熟 huIL-2 的连接处有一个氨基酸置换。该连接通常具有序列 SPGK-APT(SEQ ID NO:5), 其中 -SPGK- 是重链的 C-末端, -APT- 是成熟 IL-2 蛋白的 N-末端。在 huKS-ala-IL2 中导入了一个 K 到 A 的置换(称作位置 K[-1])并且该连接现具有序列 SPGA-APT(SEQ ID NO:6)。结果该蛋白的血清半衰期提高了(见实施例 5)。

2) dI-KS-ala-IL2。 该 KS-IL2 融合蛋白在 KS-ala-IL2 中含有置换以致产生潜在 T-细胞表位被除去的融合蛋白形式(在共同待审的专利申请 U.S.S.N. 10/112,582 和 10/138,727 中描述, 此处引用它们的完整公开作为参考)。

本发明融合蛋白的 Ig 部分的恒定区可以选自正常与可变区结合的恒定区或者不同的恒定区, 后者导致融合蛋白的 Ig 部分包含来自不同亚类的 Ig 分子或不同种类的可变区和恒定区。例如, 可以使用 IgG 的 γ 4 恒定区

(SEQ ID NO:7)代替 γ 1 恒定区(SEQ ID NO:8)。该改变具有 γ 4 链能导致更长血清半衰期的优点。因此,也可以用 IgG γ 2 恒定区(SEQ ID NO:9)代替 IgG γ 1 恒定区(SEQ ID NO:8)。而且,衍生自 IgG γ 1 的铰链区(SEQ ID NO:10)可以代替通常在 IgG γ 2(SEQ ID NO:11)或 IgG γ 4 恒定区(SEQ ID NO:12)中发生的铰链区。融合蛋白的 Ig 组分也可以在恒定区中包含使得 IgG 对 Fc γ RI、Fc γ RII 或 Fc γ RIII 中的至少一个的结合亲和力降低的突变。本发明融合蛋白可以在 IgG 恒定区中包括除去潜在糖基化位点和 T 细胞表位的突变。例如,各种恒定区可在恒定区的 C 末端部分包括除去潜在 T 细胞表位的改变。例如,通过将 IgG γ 1 和 IgG γ 2 恒定区中的氨基酸序列 KSLSLSPGK(SEQ ID NO:13)和 IgG γ 4 恒定区中的氨基酸序列 KSLSLSLGK(SEQ ID NO:14)改变成氨基酸序列 KSATATPGA(SEQ ID NO:15),除去 IgG 分子的各种恒定区的 C 末端部分中的潜在 T 细胞表位。

3)huKS-ala-IL2(N88R)。该 huKS-IL2 变体在上述 Ig 重链恒定区和成熟 huIL-2 之间的连接处含有相同的氨基酸置换(K[-1]A,通过密码子 AAA 变成 GCC 产生),而且该变体在成熟 huIL-2 序列的 N88 处置换成 R(通过将密码子 aAT 改变成 aGG 产生)。通过向 huIL-2 的核苷酸序列中导入另一改变——沉默突变(氨基酸位置 G98,密码子从 ggAtcc 变成 ggCtcc),除去已有的 Bam HI 限制性酶切位点。

在 huKS-ala-IL2(N88R)的构建中使用基于 PCR 的诱变策略。使用 Bluescript 载体(Stratagene)中的 huIL2 作为模板产生了横跨成熟 huIL2 的编码序列的两个重叠的 PCR 片段。通过这些突变分别整合到有义引物和反义引物中使得上游 PCR 片段含有编码 K[-1]A 和 N88R 的核苷酸变化。这些变化通过引物序列中的黑体核苷酸表示。有义引物序列是:

5' CCCC^{**GGGTGCCGCCCA**}ACTTCAAGTTCTACA3' (SEQ ID NO: 16); 反义引物序列是:

5' AGCCCTTTAGTTCCAGAACTATTACGTTGATCCTGCTGATTAA
GTCCCTAGGT3'. (SEQ ID NO: 17)。带下划线的核苷酸指示破坏 Bam HI 位点的变化。第二,下游 PCR 片段含有与上游 PCR 片段重叠的 20 个核

昔酸和剩余 IL2 序列。该反应中所用有义引物是 5'AGTTCTGGAACTAAAGGGCTCCGAAACAACATTCATGTGT (SEQ ID NO: 18)。带下划线的核苷酸表示破坏 Bam HI 位点的沉默突变。所用反义引物是与 pBluescript 载体序列退火的标准 M13 反向引物。这些重叠 PCR 片段和引物 SEQ ID 16 和 M13 反向引物用于反应中以产生 PCR 终产物，其随后插入到 TA 载体(Invitrogen)。

校验插入片段的序列，用含有修饰的 IL2 序列的 442bp Xma I/Xho I 片段(来自质粒 TA-IL2(N88R))置换亲本免疫细胞因子表达质粒(编码 huKS-IL2)中的野生型 huIL-2 序列。通过限制性图谱和测序校验所得编码 huKS-ala-IL2(N88R)的免疫细胞因子表达质粒。

4)huKS M1-IL2(TTSR(SEQ ID NO:19))。通过标准重组 DNA 技术构建免疫细胞因子变体 huKS M1-IL2(在例如共同待审的专利申请 U.S.S.N. 10/112,582 中描述，此处引入其完整公开作为参考)。它在融合蛋白的抗体-IL2 连接区中含有多个氨基酸置换，这些置换除去了潜在的 T 细胞表位而导致免疫原性降低的蛋白。该序列从 KSLSLSPGA-APT (SEQ ID NO: 20) 变为 KSATATPGA-APT (SEQ ID NO:21)(短划线表示 Ig/IL-2 连接位点，下划线为置换的氨基酸)并且用“M1”表示。整合到该变体中的还有连接处前的最后一个氨基酸由 K 到 A 的改变，该变化已被证实增加免疫细胞因子的血清半衰期。

HuKS M1-IL2(TTSR)在免疫细胞因子的 IL-2 部分还含有其它氨基酸置换。为了除去通过上述 N88R 置换产生的潜在 T 细胞表位，天然 huIL-2 的序列从-DLISNI-(SEQ ID NO:22)改变为-DTTSRI-(SEQ ID NO:23)。

通过将突变整合到有义引物中，使用基于 PCR 的诱变方法向 huIL-2 基因的核苷酸序列中导入这些变化。分别通过密码子变化 ACC、ACC 和 AGG 产生序列 TTxR。用序列为

5'ACTTAAGACCTAGGGACACCACCAGCAGGATCAACGTAATAGT3'
(SEQ ID NO: 24)的有义引物和序列为 5'ATCATGTCTGGATCCCTC3'
(SEQ ID NO: 25)的反义引物从编码 huKS-ala-IL2(N88R)的模板免疫细胞

因子表达质粒产生包含 hu IL-2 序列的 3'末端的诱变的 197bp PCR 片段。将 PCR 片段克隆到 TA 载体并校验序列。为了再生完整 IL-2 序列,将该片段作为 Afl II/Xho I 限制性消化物连接到从编码 huKS-ala-IL2(N88R)的免疫细胞因子表达质粒得到的 2 kb Hind III/Afl II 片段上并插入到 Hind III/Xho I 限制性切割的 pBluescript 载体中。在三向连接中,诱变的 IL-2 基因交换代替编码 KS M1-IL2 的免疫细胞因子表达质粒中的天然 huIL-2 序列。

5) huKS(N 到 Q)-IL2。用标准重组 DNA 技术构建编码 huKS(N 到 Q)-IL2 的免疫细胞因子表达质粒。huKS(N 到 Q)-IL2 在抗体 Fc γ 1 恒定区的 CH2 域含有一个除去 N-连接的糖基化的氨基酸置换。氨基酸序列从 QYNSTYR (SEQ ID NO: 1) 改变为 QYQSTYR (SEQ ID NO: 26), 被置换的氨基酸用粗体显示。类似地,构建包含 γ 2 和 γ 4 恒定区的融合蛋白,其含有氨基酸序列从 QFNST (SEQ ID NO: 2) 变化到 QAQST (SEQ ID NO: 27)而额外地除去潜在 T 细胞表位的突变。

实施例 2: 导致修饰的受体特异性的 Ig-IL2 融合蛋白的化学或酶学修饰

该实施例描述用于产生 PEG 化 huKS-IL2 或去糖基化 huKS-IL2 及其变体的免疫细胞因子的生物化学操作。同样的方法可以应用于其他 IL-2 融合蛋白,如免疫细胞因子 14.18-IL2 或白蛋白-细胞因子融合物。这些变体在随后的实施例中用于研究在基于细胞的生物分析中它们对各种细胞系的增殖应答(表 1)或者该分子的药物动力学性质的影响。

HuKS-IL2 的 PEG 化。 PEG(20,000)通过蛋白上的胺基团共价连接到该蛋白。为此目的,使用了一种含有琥珀酰亚胺连接子的 PEG 反应性衍生物(mPEG-琥珀酰亚胺基丙酸酯,下面叫做“SPA-PEG”)。将 huKS-IL2 在由 50 mM 磷酸钠(pH7.5)、0.05% Tween 80 组成的无胺缓冲液中充分透析后浓缩。以摩尔比 5:1 或 10:1 将过量 SPA-PEG 与 huKS-IL2 混合。临使用前用去离子水制备 5 mM SPA-PEG 储存液。将合适体积的 SPA-PEG 溶液与 huKS-IL2 混合并且将反应物于室温下在摇动平台上孵育 30 到 40

分钟。在加入 5 到 10 摩尔过量甘氨酸结束反应后，通过大小排阻层析纯化反应产物。将反应物样品加到在 50mM HEPES 和 150 mM NaCl 中平衡的 Superdex 200 柱上，合并并浓缩含有 PEG 化蛋白的洗脱部分。

HuKS-IL2 的 N-聚糖酶处理。 在 37°C 用 30 mU PNGaseF(New England Biolabs)孵育 huKS-IL2(1.5 mg)过夜。通过使反应产物通过蛋白 A-Sepharose 柱并在 pH3 洗脱结合的 huKS-IL2 来纯化反应产物。中和洗脱物并将其在 PBS 和 0.05% Tween80 的缓冲液中于离心柱中浓缩。通过大小排阻层析和尿素凝胶校验 huKS-IL2 的去糖基化。

实施例 3: Ig-IL2 和 Ig-IL2 变体的表达和纯化

此处描述的针对 huKS-ala-IL2(N88R)的一般性方法可用于多种多样的 Ig-细胞因子融合蛋白，包括突变细胞因子的 Ig-融合物。为了得到表达 huKS-ala-IL2(N88R)的稳定转染的克隆，通过电穿孔将编码 huKS-ala-IL2(N88R)的免疫细胞因子表达质粒的 DNA 导入小鼠骨髓瘤 NS/0 细胞。NS/0 细胞生长于补加 10%热失活的胎牛血清、2mM 谷氨酰胺和青霉素/链霉素的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基中。用 PBS 将约 5×10^6 个细胞洗涤一次并重新悬浮于 0.5 ml PBS。在冰上于 Gene Pulser Cuvette(0.4 cm 电极距, BioRad)中将 10 μ g 线性化质粒 DNA 与细胞孵育 10 分钟。用 Gene Pulser(BioRad, Hercules, CA)(0.25V 和 500 μ F)进行电穿孔。将细胞在冰上恢复 10 分钟，之后将它们重新悬浮于生长培养基中并涂于两个 96 孔板上。通过在 100 nM 氨甲蝶呤(MTX)(转染后两天加入生长培养基)存在下生长选择稳定转染的克隆。每 3 天喂养细胞 2 到 3 次以上，在 2 到 3 周内出现 MTX 抗性克隆。通过抗 Fc ELISA 分析克隆的上清液以鉴定高产克隆。分离并在含有 100 nM MTX 的生长培养基中增殖高产克隆。

通过蛋白 A 亲和柱层析从组织培养上清液纯化免疫细胞因子。对于 huKS-ala-IL2(N88R)，将重组蛋白 A(rPA)Agarose 柱用 10 体积层析缓冲液(running buffer)(如 100 mM 精氨酸，5 mM 柠檬酸，0.01% Tween 80 pH5.6)预平衡，向柱子加入含有 huSK-ala-IL2(N88R)的过滤过的细胞培养

上清液，流速 16 ml/min，每毫升 rPA 树脂结合约 40 mg huSK-ala-IL2(N88R)。用同样的缓冲液充分洗涤柱子，最后用 50 mM 甘氨酸(pH3)洗脱免疫细胞因子。收集峰级分并用 1N NaOH 调节 pH 到中性。

实施例 4 生物分析中 Ig-IL2 变体的活性

对于基于细胞的生物分析，利用依赖于 IL-2 生长的细胞系，通过这些细胞的增殖评价 Ig 融合蛋白(例如 huKS-IL2 和 huKS-IL2 变体)的活性。例如，CTLL-2(ATCC#TIB-214; Matesanz 和 Alcina, 1996)和 TF-1 β (Farner 等, [1995] Blood 86:4568-4578)被分别用于跟踪 T 细胞应答和 NK 细胞样应答。CTLL-2 是一种表达高亲和性 IL-2R $\alpha \beta \gamma$ 的鼠 T 淋巴母细胞细胞系，TF-1 β 是来自表达中等亲和性 IL-2R $\beta \gamma$ 的未成熟前体类红细胞的人细胞系。对这些分析有用的另一个细胞系是例如，来自人成年 T 细胞淋巴瘤 Kit-225(K6)的细胞系(Uchida 等, [1987] Blood 70: 1069-1072)。当与细胞系 TF-1 β 配对时，在含有相同哺乳动物物种的受体的一对细胞系中估计融合蛋白的活性。也可以来自人 PBMC(外周血单个核细胞)的细胞群——以分离 NK 细胞(含有 IL-2R $\beta \gamma$)或产生活化的 T 细胞(表达 IL-2R $\alpha \beta \gamma$)——进行这些分析。本领域普通技术人员已经知道从人 PBMC 中分离这些细胞群体的技术。例如，通过在 10mg/ml 植物凝集素(PHA-P; L9017, Sigma, St. Louis)中孵育 PBMC 3 天得到 T 细胞或 PHA-blast。通常通过负选择实验方案，例如将 NK-细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)用于人细胞得到静息 NK 细胞。为了使这些融合蛋白的活性与从小鼠肿瘤模型得到的结果相关联，有用的是在从表达一种或另一种 IL-2 受体复合体的小鼠得到的细胞群体上进行这些分析。例如，可以用 SPINSEPTM 鼠 NK 细胞富集试剂盒(Stemcell Technologies Inc, Vancouver, BC, Canada)从重组缺陷(SCID)Balb/C 小鼠的脾脏得到 NK 细胞群体。可通过 FACS 分析评价这些富集的群体之任一的纯度。

简单地说，将洗涤后的细胞以 10,000 个细胞/孔的密度接种在 96 孔微量滴定板上并在补加例如，纯化的 huKS-IL2 或 huKS-IL2 变体的细胞培养基中孵育。而且，将从 R&D Systems(Minneapolis, MN)得到的野生型

huIL-2 蛋白作为标准分析。将所加蛋白制备成在 0.45 ng/ml 到 420 ng/ml(按 IL-2 的摩尔当量标准化)之间跨大约 1000 倍的浓度范围的稀释系列。32 小时后,向每孔中加入 0.3 μ Ci[甲基-3H]胸苷(Dupont-NEN-027)并将细胞再孵育 16 小时。然后收获细胞并于玻璃滤器上裂解。在闪烁计数器中测量掺入到 DNA 中的 3H-胸苷。

作出剂量应答曲线并鉴定导致半数最大应答的蛋白浓度,得到关于细胞增殖的每种 huKS-IL2 蛋白变体的 ED50 值。应答的选择性表示为 ED50 值的比,例如 ED50[TF1- β]/ED50[CTLL-2]。这样,高 ED50 比表明相比 CTLL-2 细胞应答,需要相对更高的蛋白剂量以引起 TF-1 β 细胞应答。将 HuKS-IL2 变体的 ED50 值的比与游离 huIL-2 和亲本 huKS-IL2 蛋白的相比。该标准化的值是差别效果的量度。比参考蛋白更大的值说明选择性向 CTLL-2 细胞偏移。在某些情况下,可能优选来自相同物种的细胞系得到 ED50 比,以便 IL-2 活性不会在它们与受体的相互作用方面额外地受到交叉物种差异的影响。下面的实施例用鼠 CTLL-2 和人 TF-1 β 细胞计算 Ig-IL2 融合蛋白和游离 IL-2 的 ED50 比,从该实验所得代表性结果如表 1 所示。

表 1

蛋白	ED50 比
IL-2	0.81
HuKS-IL2	0.11
HuKS-ala-IL2	0.17
KS(N 到 Q)-IL2	0.72
HuKS-ala-IL2(N88R)	2300
KS-IL2(TTSR)	>6
PEG 化 HuKS-IL2	1.99
HuKS-IL2 + 聚糖酶	0.45
14.18-IL2	0.07
PEG 化 14.18-IL2	1.34
14.18-IL2+聚糖酶	0.21

在该实施例中,用 huKS-IL2 得到的 ED50 比(0.17)为用游离 IL-2 得到的 ED50 比(0.81)的大约 5 分之一。这说明该融合蛋白的选择性谱偏移了,显示出对 TF-1 β 细胞的更强的选择性。一种不同的抗体/IL-2 组合——14.18-IL2 对于 TF-1 β 的选择性也高于单独 IL-2 (ED50 比为 0.07),说明该效果不局限于抗体-IL2 融合蛋白中所含的特定抗体,并且人 Ig-IL2 融合蛋白相对于 huIL-2 对鼠源高亲和性受体携带细胞的活性降低可能反映了 Ig-IL2 融合蛋白的一般特性。

其他变体具有改变的 ED50 比,从而有利于 CTLL-2 细胞应答。可看到 huKS-ala-IL2(N88R)(ED50 比大于 2000)的急剧效果,反映了在这些细胞中通过中等亲和性受体介导的 TF-1 β 细胞增殖几乎不能检测。这样,虽然 huKS-ala-IL2(N88R)激活了具有 IL-2R $\alpha \beta \gamma$ 的细胞的信号传导,但是它没有显著激活具有 IL-2R $\beta \gamma$ 的细胞。也可以在纯化的表达鼠 IL-2R $\beta \gamma$ 复合体的鼠 NK 细胞上分析 huKS-ala-IL2(N88R)的活性;不同于所报道的游离人 IL2(N88R)蛋白的活性——当检查小鼠 T 细胞和 NK 细胞时选择性实质上丧失(见 Wetzel 等, ASCO 2001 会议摘要),小鼠 NK 细胞中 huKS-ala-IL2(N88R)的 ED50 值和用 TF-1 β 细胞时观察到的相似。

在具有影响融合蛋白抗体部分的糖基化的变化的 Ig-IL2 变体中观察到应答的选择性向 CTLL-2 细胞有微妙的偏移。具体地,KS(N 到 Q)-IL2(其在抗体的 Fc 部分缺乏糖基化)的 ED50 比值(0.72)相对于 huKS-IL2 的增加了 3 倍,而用 N-聚糖酶处理的 huKS-IL2 的 ED50 比为 0.45,相对于 huKS-IL2 增加了两倍。同样的,用 N-聚糖酶处理的融合不同抗体分子的 IL-2 导致类似结果;例如,用 N-聚糖酶处理的 14.18-IL2 和未处理的 14.18-IL2 相比 ED50 比增加了 3 倍。这些结果表明该分子自身的抗体部分中的某些改变影响融合的 IL-2 分子的结合和活化性质。

融合蛋白的 PEG 化也改变其选择性谱。再次观察到向 CTLL-2 刺激活性的偏移。对于 huKS-IL2, PEG 化的变体对 CTLL-2 细胞的选择性增加了 9 倍(ED50 比为 1.99),对于 14.18-IL2, PEG 化导致选择性增加了 20

倍(ED50 比为 1.34)。

在某些情况下,对给定蛋白的选择性的偏移可能也反映了分析中所用细胞类型的特定组合,如表 2 所示的代表性结果。例如,当用具有人 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 的细胞系 Kit225 代替鼠 CTLL-2 比较 KS-IL2、KS-ala-IL2 和 IL-2 时,选择性偏移模式没有保持。尤其对于 Kit225 细胞,这三种蛋白显示出基本相同的活性。然而,在 TF-1 β 细胞和 Kit-225 细胞间 Ig-IL2 变体的选择性应答的倾向被发现大多数和用 TF-1 β 细胞和 CTLL-2 细胞建立的(包括 Ig-IL2 融合蛋白的 Fc 部分去糖基化的影响)类似(见下表 2 的代表性结果和实施例 10)。

表 2

蛋白	ED50 比 TF-1 β /Kit-225
IL-2	2.8
HuKS-IL2	4
HuKS-ala-IL2	10.4
KS-ala-IL2(N88R)	52,000

此外,发现 Kit-225 细胞比 CTLL-2 细胞对 IL-2 和 IL-2 融合蛋白及其变体更敏感。例如,在 Kit-225 细胞中 HuKS-ala-IL2 的 ED50 值是 0.08 而在 CTLL-2 细胞中是 5.0,对于 KS-ala-IL2(N88R)在 Kit225 细胞中是 0.13 而在 CTLL-2 细胞中是 3,这表明在这些分析中 Kit255 细胞的灵敏性增加了约 10-50 倍。从而对给定蛋白,ED50 比值依赖于所用细胞类型的特定组合。

实施例 5 具有修饰的受体结合特征的 IL-2 融合蛋白的药物动力学
将 huKS-ala-IL2(N88R)的药物动力学(PK)曲线与 huKS-ala-IL2 和 huKS-IL2 的曲线进行了比较。对于每种蛋白,使用了三只 6-8 周龄的小鼠。将 25 μg 在 PBS 中稀释到 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的融合蛋白注射到小鼠的尾部静脉,

在注射后立即(0小时)、0.5、1、2、4、8和24小时通过眼眶后丛采血得到50 μ l 血样。在包被有肝素的试管中收集血样以防止血液凝结,用ELISA测定法测量细胞后血浆上清液中免疫细胞因子水平。以前已经描述了用于药物动力学研究的ELISA测定法的步骤(WO01/58957)。该测定法测量完整免疫细胞因子的存在。在包被EpCAM的板上进行血浆中的免疫细胞因子的捕捉,用抗IL-2的HRP-偶联抗体进行检测。以前的研究表明在连接处具有K到A置换的huKS-IL2变体——huKS-ala-IL2和huKS-IL2相比循环半衰期急剧提高(WO01/58957)。实际上,发现huKS-ala-IL2(N88R)的循环半衰期类似地提高了,这说明该分子的IL-2部分中的N88R改变对药物动力学没有实质影响。代表性实验的结果如图2所示。图2说明了24小时内血清中存在的免疫细胞因子随时间的浓度(用血清中的剩余蛋白浓度相对于静脉内给药后即刻的起始浓度的百分比表示)。在ELISA分析中测定蛋白浓度,其中通过免疫细胞因子的抗体部分捕捉该免疫细胞因子,通过其细胞因子部分检测该免疫细胞因子。X轴=时间(小时);Y轴=log(剩余蛋白浓度百分数)。

实施例6 哺乳动物中具有修饰的受体结合特征的Ig-IL2融合蛋白的毒性

检测了小鼠中KS-IL2变体huKS-IL2、huKS-ala-IL2和huKS-ala-IL2(N88R)的相对毒性。如实施例5所示,与huKS-IL2相比,huKS-ala-IL2和huKS-ala-IL2(N88R)具有实质上增加的PK。不过,为了比较的目的,虽然PK不同仍对不同分子使用了相同的给药时间表。尽管更长的血清半衰期可能增加治疗剂的功效,但是也可能导致毒性增加。然而,本实施例表明虽然与huKS-IL2相比huKS-ala-IL2毒性增加(因为更长的循环半衰期),huKS-ala-IL2(N88R)与huKS-IL2相比虽然循环半衰期更长,但是毒性降低。

连续5天每天对Balb/C小鼠(每个实验条件3只动物)静脉注射三种蛋白中的一种。将融合蛋白稀释到200 μ l PBS中并按下面的剂量施用:

huKS-IL2 和 huKS-ala-IL2 为每只小鼠 25、50 或 75 μg ，huKS-ala-IL2(N88R)为每只小鼠 50、75 或 100 μg 。对照组静脉注射 PBS。每天监测小鼠的存活并且检查对小鼠存活的影响。施用所有剂量的 huKS-IL2 的小鼠都幸存下来。然而 huKS-ala-IL2 毒性较强。虽然小鼠耐受 25 μg huKS-ala-IL2 剂量，但是剂量为 50 μg 时所有 3 只小鼠在第 6 天都死亡了，在剂量为 75 μg 时在第 4.5 天两只小鼠死亡，第三只小鼠在第 5 天死亡。另一方面，小鼠良好耐受所有剂量(包括 100 μg)的 huKS-ala-IL2(N88R)。实际上，还以每只小鼠 200 μg 的剂量施用了 huKS-ala-IL2(N88R)，并且小鼠幸存下来了。从而，huKS-ala-IL2(N88R)的毒性显著比 huKS-ala-IL2 的低。

将在用 huKS-ala-IL2 治疗过程中死亡的小鼠解剖并评价了它们的器官。所有器官(包括肺、脾、肝、胃和肾)都总体上肿大，表明广泛的血管渗漏。也评价了用变体 huKS-ala-IL2(N88R)处理的动物的器官。如上所述处理小鼠，发现用 huKS-ala-IL2(N88R)处理的动物的器官重量基本上和对照动物的类似，尤其是肺和肝。不希望受理论束缚，认为脾的重量的增加更多是由于抗该人蛋白的抗体免疫应答导致的蜂窝状结构 (Cellularity) 增加而不是血管渗漏引起的。推论 huKS-ala-IL2(N88R)导致的血管渗漏没有 huKS-ala-IL2 的严重。表 3 提供了相对于对照小鼠器官，器官重量增加倍数 (x) 的大约值的实例。

表 3

器官	重量增加(x 倍)	
	HuKS-ala-IL2 (20 μg /小鼠)	huKS-ala-IL2(N88R) (100 μg /小鼠)
肺	4	1.7
脾	3	3
肝	1.5	1
肾	1	1

评价了各种小鼠品系背景(在它们的免疫系统组成上具有已知的改变)在这些 Ig-IL2 融合蛋白的毒性方面的影响。使用了小鼠品系 DBA/2、Balb/C、B6.CB17-Prkdc^{scid}/SzJ(SCID)、浅棕色鼠和 SCID/浅棕色鼠。对于 huKS-ala-IL2, 以每只小鼠 25 μ g 和 50 μ g 的剂量如上施用融合蛋白, 对于 huKS-ala-IL2(N88R)剂量为每只小鼠 200 μ g, 为期两周评估小鼠存活和重量。

对于 huKS-ala-IL2, 大多数小鼠品系得到的结果与以上用 Balb/C 小鼠所报道的结果类似: 50 μ g 的剂量导致动物在第 5 天死亡, 而在较低剂量动物幸存下来并且它们的重量恢复到约它们原来的体重, 但是没有达到模拟处理的对照动物的体重增加。有趣的是, 缺乏功能性 NK 细胞的浅棕色鼠更能耐受 50 μ g 的高剂量; 两只动物到第 9 天死亡, 但是一只尽管最初体重显著降低(到第 7 天约 25%), 但是却恢复了, 到第 15 天达到模拟处理的动物和低剂量处理的动物的体重。DBA/2 小鼠对 huKS-ala-IL2 更敏感; 甚至在较低剂量时, DBA/2 小鼠在第 5 天和第 9 天死亡了。

对于 huKS-ala-IL2(N88R), DBA/2 小鼠对于 Ig-IL2 融合蛋白的易感性增加也是明显的: 到第 8 天, 所有动物都死亡了, 即使剂量减半(100 μ g)动物也在第 9 天死亡。该融合蛋白在浅棕色鼠中耐受性也是最好的, 而 SCID/浅棕色鼠体重显著降低(到第 10 天保持稳定, 为模拟处理的对照小鼠体重的约 80%)。

实施例 7 具有修饰的受体结合特征的 Ig-IL2 融合蛋白在哺乳动物各种肿瘤的治疗中的功效

a) Balb/C 小鼠中 CT26/KSA 皮下肿瘤的治疗。通过用编码人 KS 抗原 (KSA) 的基因转导的 CT26 结肠癌细胞诱导皮下肿瘤。将 2×10^6 活细胞悬浮于 100 μ l PBS 中并皮下注射到 6 周龄 Balb/C 小鼠的背部。当肿瘤大小达到 100-200 mm^3 时, 将 8 只为一组的小鼠进行下面三种处理之一: 连续 5 天皮下注射稀释到 200 μ l PBS 中的 15 μ g huKS-ala-IL2 或 huKS-ala-IL2(N88R) 或者只施用 PBS。每周两次共 50 天测量肿瘤体积评

价疾病的发展。在对照小鼠中，肿瘤体积稳定增加，处死时(约第 32 天)达到约 3500 到 6000mm³。而两个实验组的肿瘤体积到 50 天时基本保持恒定，这说明 huKS-ala-IL2(N88R)在防止肿瘤生长方面和 huKS-ala-IL2 一样有效。

b) C57BL/6 小鼠中 LLC/KSA 皮下肿瘤的治疗。在另一肿瘤模型中，通过用编码 KS 抗原的基因转导的 Lewis 肺癌细胞诱导皮下肿瘤。将 1 × 10⁶ 表达 EpCAM 的 LLC 活细胞悬浮于 100 μl PBS 中并皮下注射到 6-8 周龄 C57BL/6 小鼠的背部。当肿瘤大小达到 100-150mm³ 时，如上处理和评价 8 只一组的小鼠，只是每次注射施用的剂量增加到 20 μg。在对照动物中，肿瘤体积增加迅速，在 20 天内超过 6500mm³；两个实验条件下的肿瘤生长受到相同程度的阻碍，在相同时间内达到 4000mm³，这再次说明在相同剂量下 huKS-ala-IL2 和 huKS-ala-IL2(N88R)的治疗功效没有差别。

c) B6.CB17-Prkdc^{scid}/SzJ 小鼠中 LLC/KSA 皮下肿瘤的治疗。本发明融合蛋白也可以对成熟 T 细胞之外的细胞有效。例如，在一个实验中，本发明融合蛋白在甚至没有成熟 T 细胞的小鼠中也导致肿瘤生长的阻碍。这些结果提示本发明融合蛋白可以用于例如无免疫应答病人的肿瘤的治疗。

在 11 周龄 B6.CB17-Prkdc^{scid}/SzJ 小鼠(它们无 T 细胞和 B 细胞介导的免疫应答)中评价了 LLC/KSA 皮下肿瘤模型。按照上面描述的相同的治疗方案。对照动物中肿瘤生长快速，在 15 天中达到 3500 mm³。huKS-ala-IL2 和 huKS-ala-IL2(N88R)阻碍肿瘤生长的有效性类似，在相同期间内体积为对照动物中肿瘤体积的一半以下。而且，C57BL/6 小鼠(具有完整免疫系统)和 B6.CB17-Prkdc^{scid}/SzJ 小鼠(无 T 细胞和 B 细胞)的肿瘤生长速率的差别极小。

此外，KS-ala-IL2 对具有完整免疫系统的小鼠中和缺乏功能性 T 细胞的小鼠中的肿瘤具有同样好的治疗效果这一事实表明在该肿瘤模型中，免疫应答通过非 T 细胞介导的机制起作用。所以，有价值的是在治疗分子中保持通过各种效应细胞刺激免疫应答的选择。对于 huKS-ala-IL2(N88R)(其在每种小鼠背景中和 KS-ala-IL2 一样有效)，独立于 T 细胞起作用的效应

细胞活性明显被保存了。

d)对 C57BL/6 小鼠肺的 LLC/KSA 转移的治疗。LLC/KSA 也被用于肺转移模型。将 1×10^6 个成活细胞悬浮于 200 μ l PBS 中并静脉注射到 6-8 周龄 C57BL/6 小鼠中。在第 4 天, 将 8 个一组的小鼠置于下面的治疗条件中的一种之下: 连续 5 天, 小鼠静脉注射 200 μ l PBS 或 20 μ g 稀释到 200 μ l PBS 中的 KS-ala-IL2 或 KS-ala-IL2(N88R)。在约第 27 天处死动物, 解剖肺并在 Bouin 溶液中固定。通过对被转移瘤覆盖的表面区域的百分数和肺的重量评估肺中转移的程度。

对照组的肺有超过 96% 的表面区域被转移瘤覆盖, 并且肺重量(0.75g)比正常肺增加了约 5 倍。而用 huKS-ala-IL2 治疗的小鼠的肺极少被转移瘤覆盖 (5.6%), 用 huKS-ala-IL2(N88R)处理的小鼠的肺实质上无转移(0%)。用 KS-ala-IL2 和 KS-ala-IL2(N88R)治疗的动物的肺重量正常。从而, 证明在比影响动物存活的阈值低许多倍的剂量下, huKS-ala-IL2(N88R)和 KS-ala-IL2 在治疗肺转移中一样有效。

实施例 8 组合疗法中的 KS-IL2 变体

研究了将低毒 KS-IL2 变体(如 huKS-ala-IL2(N88R))和另一种免疫调节剂联合施用治疗肿瘤的效果, 其中使用如实施例 7b 中描述的小鼠皮下肿瘤模型 LLC/KSA 进行。

a) huKS-ala-IL2 变体和环磷酰胺。对于组合治疗, 在第 0 天(此时肿瘤平均 90mm^3)以 75 mg/kg 剂量腹腔内施用环磷酰胺, 然后每天施用融合蛋白共 5 天(从第 1 天到第 5 天)。以 20 μ g 或 100 μ g 剂量施用 KS-ala-IL2(N88R)。对照条件包括模拟处理的动物和单独用 huKS-ala-IL2 以 20 μ g 剂量处理的动物或单独用 huKS-ala-IL2(N88R)以 20 μ g 或 100 μ g 剂量处理的动物。模拟处理的动物的肿瘤到第 19 天长到约 5000mm^3 , 而用 huKS-ala-IL2 处理的小鼠的肿瘤约 2200mm^3 , 用 20 μ g 或 100 μ g huKS-ala-IL2(N88R)处理的小鼠的肿瘤分别为约 2600mm^3 和 1700mm^3 。20 μ g 剂量 huKS-ala-IL2(N88R)与环磷酰胺共同施用导致肿瘤为 1700

mm³并且在高效量时为 1250 mm³，比用 huKS-ala-IL2 单独处理的要显著小。

b) huKS-ala-IL2 变体和吲哚美辛。对于联合治疗，以 35 μg/小鼠/天的剂量口服施用吲哚美辛同时每天施用融合蛋白共 5 天(从第 1 天到第 5 天)。肿瘤最初平均 90mm³。以 20 μg 剂量施用 huKS-ala-IL2(N88R)。对照条件包括模拟处理的动物和单独用 20 μg 剂量 huKS-ala-IL2 或单独用 20 μg 剂量 huKS-ala-IL2(N88R)治疗的动物。模拟处理的动物中肿瘤到第 19 天时长到约 5000mm³，而用 huKS-ala-IL2 治疗的小鼠肿瘤约 2200mm³，用 20 μg huKS-ala-IL2(N88R)治疗的小鼠分别为约 2600mm³和 1700mm³。吲哚美辛与 20 μg 剂量 huKS-ala-IL2(N88R)共同施用导致肿瘤大小降低到 850mm³，比单独用 huKS-ala-IL2 治疗得到的肿瘤显著地小。

实施例 9 治疗指数提高的 KS-IL2 变体

构建了在 IL-2 序列的特定位置具有突变的 KS-IL2 变体。例如，在可能与 IL-2 受体的 α 亚基接触的位置产生置换。合适的残基为例如 huIL-2 成熟序列中的 F42。该氨基酸的芳香环结构被认为稳定 IL-2 中的局部构象 (Mott 等, JMB 1995, 247:979)，并且发现在免疫细胞因子该位置用例如 Y、A 或 K 进行置换导致分子的 IL-2 受体亲和性和生物活性进行性降低。在动物中检验这些分子，发现和未改变形式的免疫细胞因子相比这些变体在肿瘤治疗中的治疗指数增加了。其他有效的置换是在位置 R38 和 K43。

该免疫细胞因子的 IL-2 部分中的其他置换在可能与 β 亚基接触的区域，例如，在成熟 huIL-2 的 E15 或 L19 位置发生。当免疫细胞因子的这些残基突变成例如 A 或 R 时发现和未改变形式的免疫细胞因子相比，变体免疫细胞因子对 IL-2 受体的 β 亚基的亲和性降低。通常发现置换成 R 比置换成 A 的影响更严重，这可能和 R 的侧链大有关。在动物中检验这些分子，发现和未改变形式的免疫细胞因子相比，这些变体在肿瘤治疗中的治疗指数增加。其他置换在 D84 和 V91 位导入并且它们被证实对治疗指数的增加也有效。

在成熟 hu IL-2 的 N119 位导入免疫细胞因子的 IL-2 部分中的置换，可能影响该分子与 IL-2 受体的 γ 亚基接触的区域。突变到 A 产生更微妙的免疫细胞因子变体，突变到 R 产生更具破坏性的突变。在具有肿瘤的动物中检验这些变体的效果，发现与未改变形式的免疫细胞因子相比这些变体免疫细胞因子具有提高的治疗指数。

还发现可通过在 IL-2 免疫细胞因子中产生多个突变增加治疗指数，尤其是对于其中免疫细胞因子中的单突变已显示只微小或可忽略地增加治疗指数的分子。例如，发现含有 F42A 与 L19A 组合或 L19A 与 N119A 组合的免疫细胞因子比每种单独的免疫细胞因子更有效。对于涉及多个突变的应用，尤其有用的是使用降低氨基酸侧链大小的突变。另一个导入免疫细胞因子的 IL-2 部分的置换在成熟 huIL-2 的 T51 处。尽管向 A 的突变没有显示治疗指数的提高，而向 P 的突变产生了当和未改变形式的免疫细胞因子相比在肿瘤治疗中治疗指数提高的免疫细胞因子。

实施例 10 Ig-IL2 融合蛋白变体 huKS-ala-IL2(D20T)及其变体

产生了基于 Ig-IL2 的变体(D20T)，Ig-IL2(D20T)在成熟 huIL-2 的 20 位含有天冬氨酸向苏氨酸的置换。这些变体在 Ig 结构域，如在 Fc 部分或抗体靶定结构域含有额外的置换。为了产生编码这些分子的 DNA 构建体，基本按照实施例 1 中描述的步骤进行，其中利用构建体-特异性引物通过 PCR 导入突变并利用合适的克隆策略，本领域技术人员熟悉这些方法和策略。

a) huKS-ala-IL2(D20T)。为了导入突变 D20T，使用了 PCR 诱变方法，引物为

5'-CAGCTGCAACTGGAGCATCTCCTGCTGACCCTCCAGATGATTCTGAAT-3' (粗体核苷酸为置换的密码子) (SEQ ID NO: 28) 和引物 T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3') (SEQ ID NO: 29)，从 pBS 质粒的野生型 huIL-2 DNA 扩增 DNA 片段并插入 TA 载体(Invitrogen)中以产生 TA-IL2(D20T)。测序校验突变发生。为了置换 huKS-ala-IL2 中的最初 IL-2

序列，在三重连接反应中将来自 TA-IL2(D20T)的 385 bp PvuII/XhoI 片段克隆到亲本免疫细胞因子质粒中。基本如实施例 3 中所描述的表达和纯化融合蛋白。分别在 SEQ ID NO:30 和 SEQ ID NO:31 中显示了相应于 hu-KS 重链和轻链可变区的氨基酸序列。

产生了 huKS-ala-IL2(D20T)的其他变体，将相同的 PCR-衍生的片段整合到不同质粒主链中。

b) dI-KS-ala-IL2(D20T)。以前已描述了具有除去潜在 T 细胞表位的改变的 KS-ala-IL2。基本如实施例 3 中所描述的表达和纯化融合蛋白。相应于与 IL2(D20T)融合的 dI-KS 抗体重链的氨基酸序列显示在 SEQ ID NO:32 中。SEQ ID NO:33 和 34 相应于 dI-KS 抗体的重链和轻链可变区。

c) 去糖基化 dI-KS-ala-IL2(D20T)。基本如实施例 2 中所描述的在蛋白 dI-KS-ala-IL2(D20T)上用 N-聚糖酶进行了酶学去糖基化。

d) dI-KS(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)。该 IL2(D20T)融合蛋白的 Ig 部分衍生自 IgG γ 4 亚类的恒定区(SEQ ID NO:7)，其还保留 IgG γ 1 铰链(SEQ ID NO:10)的特性。而且，导入了去除潜在 T 细胞表位的突变。此外，该融合蛋白含有天冬氨酸到谷氨酰胺的置换，该置换除去了 Fc 中 N-糖基化位点(见实施例 4)。伴随的苯丙氨酸到丙氨酸的置换除去了潜在的 T 表位。基本如实施例 3 中所描述的表达和纯化融合蛋白。

e) dI-NHS76(γ 2h)-ala-IL2(D20T)。该 IL2(D20T)融合蛋白的 Ig 部分衍生自 IgG γ 2 亚类的恒定区，其还保留 IgG γ 1 铰链的特性。在 NHS76 中，Ig 可变区抗 DNA-组蛋白复合物中所含有的表位并且特异识别肿瘤的坏死中心(Williams 等，PCT WO 00/01822)。还导入了去除轻链可变区中的潜在 T 细胞表位的突变。该残基，即亮氨酸 104，位于 CDR3 V-J 连接处，其被缬氨酸置换。基本如实施例 3 所描述的表达并纯化了该融合蛋白。

f) dI-NHS76(γ 2h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)。该蛋白基于实施例 10e 的蛋白，其还含有如实施例 10d 所述的去除 Fc 中的 N-连接的糖基化和潜在 T 细胞表位的突变。基本如实施例 3 所描述的表达并纯化了该融合蛋白。在一个实施方案中，本发明融合蛋白包括融合到 IL2(D20T)变体的

NHS75(γ 2h)(FN>AQ)分子的重链序列, 如 SEQ ID NO:35 所述, 和相应于 SEQ ID NO:36 的轻链可变和恒定区序列。然而, 可以将 SEQ ID NO:35 的重链区与任何 IgG 轻链可变区或恒定区组合使用。

g) dI-NHS76(γ 4h)-ala-IL2(D20T)。该蛋白和实施例 10e 中描述的蛋白类似, 但是该蛋白含有来自 γ 4 而不是 γ 2 IgG 亚类的重链。如实施例 3 所述表达和纯化了该融合蛋白。

h) dI-NHS76(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)。该蛋白基于实施例 10g 的蛋白, 还含有如实施例 10d 所述的去除 Fc 中的 N-连接的糖基化和潜在 T 细胞表位的突变。基本如实施例 3 所描述的表达并纯化了该融合蛋白。在一个实施方案中, 本发明融合蛋白包括融合到 IL-2(D20T)变体的 dI-NHS76(γ 4h)(FN>AQ)分子的重链序列, 如 SEQ ID NO:37 所述, 和相应于 SEQ ID NO:36 的轻链可变区和恒定区序列。然而, 可以将 SEQ ID NO:37 的重链区与任何 IgG 轻链可变区或恒定区组合使用。

本发明融合蛋白的 Ig 部分可以包括衍生自任何 IgG 亚类的重链恒定区结构域, 包括含有来自不同物种的 IgG 分子结构域的组合。所以, 本发明融合蛋白可以包括衍生自任何 IgG 亚类的铰链区, 例如, 衍生自 IgG γ 1 的铰链区(SEQ ID NO:10)、衍生自 γ 2 的铰链区(SEQ ID 11)或衍生自 γ 4 的铰链区(SEQ ID NO:12)。

生物分析中 Ig-IL2(D20T)的活性: 在生物分析中检验 Ig-IL2(D20T)融合蛋白测量依赖 IL2 生长的细胞增殖的能力, 其表达为 ED50 值(见实施例 4)。在鼠 CTLL-2 细胞或人 Kit-255 细胞(其表达 IL-2R α β γ)和人 TF-1 β 细胞或分离的鼠 NK 细胞(表达 IL-2R β γ)中进行分析。

例如, 在代表性实验中发现, 与 huKS-ala-IL2 相比, dI-KS-ala-IL2(D20T)在具有 IL-2R α β γ 的细胞 CTLL-2 中的 ED50 值没有改变, 而在具有 IL-2R β γ 的细胞 TF-1 β 中, ED50 值高大约 900 倍。所以 ED50 比(如实施例 4 中定义)为约 150, 说明与 huKS-ala-IL2 相比, 选择性向具有 IL-2R α β γ 的 CTLL-2 细胞偏移了约 750 倍。和在这对细胞系中用 huKS-ala-IL2(N88R)所看到的约 20,000 倍的选择性偏移(相对于

KS-ala-IL2)相比, 该选择性对 di-KS-ala-IL2(D20T)降低了约 10 到 20 倍, 这反映了从表达 IL-2R β γ 的细胞得到可测量的增殖性应答。当使用人 Kit225 细胞时该趋势也是明显的。如用其他含有 KS 抗体的融合蛋白所发现的, 抗体部分的去糖基化对降低融合蛋白在表达 IL-2R β γ 的细胞中的活性具有小但一致的影响。

在含有不同抗体部分的 Ig-IL(D20T)变体中也测量了依赖 IL-2 的细胞增殖。发现与 dI-NHS76(γ 2)-ala-IL2 相比, dI-NHS76(γ 2)-ala-IL2(D20T)在带有 IL-2R α β γ 的细胞 Kit-255 中的 ED50 值增加了 3 倍, 而在带有 IL-2R β γ 的细胞 TF-1 β 中 ED50 增加了约 230 倍。所得 ED50 比值 350 与使用 dI-KS(γ 4)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)时所看到的 ED50 比值位于相同的范围内并且比 huKS-ala-IL2(N88R)在选择性上低至少 10 倍。代表性结果如表 4 所示。

表 4

蛋白	ED50 比	ED50 比
	TF-1 β /CTLL-2	TF-1 β /Kit-225
dI-KS-ala-IL2(D20T)	150	3000
dI-KS(γ 4)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)		5600*
dI-NHS76(γ 2)-ala-IL2(D20T)		350

*=不同批的平均值

Ig-IL2(D20T)变体的药物动力学: 为了评价 Ig-IL2 变体与细胞表面 Fc 受体的相互作用, 用 U937 细胞在基于细胞的 ELISA 中分析了 Ig-IL2 融合蛋白与 Fc γ R 受体的结合。将融合蛋白(huKS-ala-IL2、dI-huKS-ala-IL2、dI-KS-ala-IL2(D20T)和 dI-KS(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T))2 倍稀释, 从 100 μ g/ml 到 780 ng/ml, 与细胞孵育并用 FITC 偶联的抗人 IgG Fc Ab F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 检测结合。huKS-ala-IL2 和 dI-KS-ala-IL2 对这些细胞的半最大结合浓度为约 5 μ g/ml, 有趣的是, 用 dI-KS-ala-IL2(D20T)蛋白该浓度增加 2 倍。尽管防止 Ig 部分(dI-KS(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T))糖基化的突变的导入降低了

该蛋白对 U937 细胞的结合 5-10 倍，但是结合并没有被完全消除。

研究了小鼠中 Ig-IL2(D20T)变体的药物动力学性质，基本如实施例 5 所述。令人惊奇的是，当与 dI-KS-ala-IL2 比较时，dI-KS-ala-IL2(D20T)的半衰期急剧降低了。对 PK 曲线的分析表明在 α 期该效果尤其剧烈：虽然 1 小时后仍然可以得到 50% 的 dI-KS-ala-IL2，只有大约 5% 的 dI-KS-ala-IL2(D20T)仍然存在。这些蛋白的 PK 曲线的 β 期的斜率类似。用融合蛋白 dI-NHS76(γ 2h)-ala-IL2(D20T)(其含有通常显示出最小的 FcR 结合亲和性的 γ 2 亚类的 IgG)得到了与用 dI-KS-ala-IL2(D20T)时所看到的基本相同的 PK 曲线。从而，IL(D20T)蛋白部分对融合蛋白的影响不局限于抗体 dI-KS。

发现 Ig 融合蛋白的去糖基化通常具有增强 PK 曲线的 α 期的效果。所以研究了 dI-KS-ala-IL2(D20T)的酶促去糖基化对 PK 曲线的影响。事实上，PK 曲线的 α 期基本恢复到用 dI-KS-ala-IL2 时所观察到的情况。当通过诱变除去糖基化时在融合蛋白 dI-KS(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)中得到相同效果。从而，对 PK 曲线的影响可能是由 FcR 结合的降低所致。

Ig-IL2(D20T)变体的毒性：在 Balb/C 小鼠中比较了 Ig-IL2(D20T)变体 KS(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)与 dI-KS-ala-IL2 的毒性，如实施例 6 所述。

两种融合蛋白在小鼠中有类似的血清半衰期。施用 dI-(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)5 个日剂量，每个日剂量为 100 μ g/小鼠、200 μ g/小鼠或 400 μ g/小鼠，而施用 dI-KS-ala-IL2 5 个日剂量，每个日剂量为 40 μ g/小鼠。发现即使 dI-kS(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)的剂量为 400 μ g/小鼠，小鼠也幸存下来，而接受 1/10 剂量的 dI-KS-ala-IL2 的对照小鼠到第 6 天时就死亡了。用 dI-kS(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)治疗的小鼠的体重受到轻微影响，在第 7 天时暂时降到最初体重的 97%。耐受剂量大于 10 倍的差异可以说明治疗指数的实质提高。

Ig-IL2(D20T)变体对治疗肿瘤的功效：如实施例 7a 所述，在具有从 CT26/KSA 细胞衍生的皮下肿瘤的 Balb/C 小鼠中评价 Ig-IL2(D20T)变体的

功效。

以 $15 \mu\text{g}$ /小鼠和 $30 \mu\text{g}$ /小鼠的剂量施用融合蛋白 dI-KS(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)。肿瘤开始时平均大小为 126mm^3 ，到第 28 天大小达到 1800mm^3 到 5000mm^3 。用 $15 \mu\text{g}$ /小鼠 dI-KS-ala-IL2 治疗的小鼠中肿瘤长到平均大小 355mm^3 ，而用 $15 \mu\text{g}$ /小鼠 dI-KS-ala-IL2(D20T) 治疗的小鼠中肿瘤长到平均大小 2250mm^3 。这最可能是由于该分子的较差的 PK 的原因。用较低剂量 $15 \mu\text{g}$ /小鼠 dI-KS(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T) 治疗的小鼠中肿瘤长到一定程度，平均大小为 1450mm^3 ；然而，在 $30 \mu\text{g}$ /小鼠的剂量时肿瘤平均大小达到 950mm^3 ，重要的是，在过半的小鼠中肿瘤没有看得到的生长。从而，剂量增加时 dI-KS(γ 4h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T) 对抑制肿瘤的生长有显著的作用。实际上，实验中所用剂量比该分子的最大耐受剂量低至少 12 倍，所以该分子可能比 huKS-ala-IL2 具有提高的治疗指数，相比较，huKS-ala-IL2 以最大耐受剂量的 $1/3$ 至 $1/2$ 施用。

实施例 11 野生型和突变型 IL-2 融合蛋白对不同 IL-2 受体的相对亲和性

可以通过测定法如放射免疫测定法测量本发明各种融合蛋白对 IL-2R $\beta \gamma$ 受体相对于 IL-2R $\alpha \beta \gamma$ 受体的差异亲和性。将相等数量的表达 IL-2R $\alpha \beta \gamma$ 受体的细胞和表达 IL-2R $\beta \gamma$ 受体的细胞接种于塑料板上。用等量野生型或突变 IL-2 融合蛋白进行系列稀释，加到等数量表达 IL-2R $\alpha \beta \gamma$ 的细胞或表达 IL-2R $\beta \gamma$ 的细胞中以得到标准曲线。洗掉未结合的融合蛋白并通过放射标记的配体检测结合到每种细胞类型的融合蛋白的量。对于 Fc-IL-2 融合蛋白，配体可以是诸如结合 IgG 的 Fc 部分的葡萄球菌 A 蛋白分子。配体还可以是识别特定亚类的 IgG 分子的一部分的另一抗体，例如 Ig γ 1、Ig γ 2 或 Ig γ 4 恒定区的抗体。洗掉未结合的配体，在 γ 计数器上测量含有与野生型 IL-2 融合蛋白结合的 IL-2R $\alpha \beta \gamma$ 表达细胞、与突变 IL-2 融合蛋白结合的 IL-2R $\alpha \beta \gamma$ 表达细胞、与野生型 IL-2 融合蛋白结合

的 IL-2R β γ 表达细胞或与突变融合蛋白结合的 IL-2R β γ 表达细胞的平板的放射性。将从结合测定中得到的数据标准化以计算细胞数和在细胞上表达的受体数。

在另一个测定法中，可以用本领域中熟知的各种技术放射性地或非放射性地标记融合蛋白自身。类似于上述用于标记的配体的测定法，将野生型或突变型标记的融合蛋白加到等数量接种的细胞中并测量标记的融合蛋白的量。

通过结合的配体或结合的融合蛋白的浓度(如上述)与未结合的配体或未结合的融合蛋白的浓度和加到每个反应中的融合蛋白的总浓度的乘积的比来测量融合蛋白对特定受体的结合亲和性。当与野生型 IL-2 融合蛋白相比较时，IL-2 部分中的某些突变改变了融合蛋白对 IL-2R β γ 受体和 IL-2R α β γ 受体的相对亲和性。

等价方案

本发明可以以其他特定形式实施而不脱离本发明的精神或基本特征。所以应该在所有方面都认为前面的实施方案是举例说明性的而不限制此处所描述的发明。从而本发明的范围由所附权利要求而不是前面的说明书说明，并且落入权利要求的等价意义和范围内的所有修改都旨在包括在其中。

本文引用的所有专利、专利申请和科学出版物的全文并入作为参考。

<223> 突变 huKS-ala-IL2 接点

<400> 6

Ser Gly Pro Ala Ala Pro Thr
1 5

<210> 7

<211> 327

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> misc

<222> (1)..(327)

<223> 人 γ 4 恒定区

<400> 7

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 8
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> misc
 <222> (1)..(330)
 <223> IgG1恒定区

<400> 8

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 9

<211> 326

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> misc

<222> (1)..(326)

<223> 人 γ 2恒定区

<400> 9

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人IgGγ1铰链区

<400> 10

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人IgG γ 2 铰链区

<400> 11

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人IgG γ 4 铰链区

<400> 12

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ig G γ 1 和 γ 2 恒定区的C末端

<400> 13

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG γ 4 恒定区的C末端

<400> 14

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

<400> 19

Thr Thr Ser Arg
1

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体-IL-2 接点序列

<400> 20

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

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的抗体-IL-2 接点序列

<400> 21

Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ala Pro Thr
1 5 10

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huKS M1-IL2变体中的序列

<400> 22

Asp Leu Ile Ser Asn Ile
1 5

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huKS M1-IL2 变体中的突变序列

<400> 23

Asp Thr Thr Ser Arg Ile

<220>

<223> 用于D20T突变的有义引物

<400> 28

cagctgcaac tggagcatct cctgctgacc ctccagatga ttctgaat

48

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于D20T突变的反义引物

<400> 29

attaaccctc actaaagga

20

<210> 30

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu-KS重链可变区

<400> 30

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Thr Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80Leu Gln Ile Asn Asn Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95Val Arg Phe Ile Ser Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> hu-KS轻链可变区

<400> 31

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe
 35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Ile Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 32
 <211> 579
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合到IL-2变体的dI-KS-ala IL2 (D20T)重链

<400> 32

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50						55										60
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Thr	Ala	Glu	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Leu	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Leu	Asn	Asn	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	
			85						90					95		
Val	Arg	Phe	Ile	Ser	Lys	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	
			100					105					110			
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
		115					120					125				
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
	130					135					140					
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
145					150					155					160	
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
				165					170					175		
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
			180					185					190			
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
		195					200					205				
Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
	210					215					220					
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
225					230					235					240	
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
				245					250					255		
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
			260					265					270			
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
		275					280					285				
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
	290					295					300					

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ala Pro
 435 440 445

Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
 450 455 460

Leu Thr Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro
 465 470 475 480

Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala
 485 490 495

Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu
 500 505 510

Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro
 515 520 525

Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly
 530 535 540

Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile

<400> 34

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 20 25 30

Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Pro Trp Ile Phe
 35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Phe Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 35

<211> 580

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合到IL2变体的dI-NHS76(γ2h)(FN>AQ)-ala-IL2(D20T)重链

<400> 35

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85					90					95					
Ala	Arg	Gly	Lys	Trp	Ser	Lys	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100					105					110		
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
		115					120					125			
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
	130					135					140				
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150					155					160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165					170					175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180					185					190		
Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
		195					200					205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
	210					215					220				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val
225					230					235					240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				245					250					255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
			260					265					270		
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
		275					280					285			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Ala	Gln	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser
	290					295					300				
Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
305					310					315					320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				325					330					335	

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ala
 435 440 445

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 450 455 460

Leu Leu Thr Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 465 470 475 480

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 485 490 495

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 500 505 510

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 515 520 525

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 530 535 540

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 545 550 555 560

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile
 565 570 575

Ser Thr Leu Thr

580

<210> 36
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> dI-NHS76(γ 4th) (FN>AQ) -ala-IL2 (D20T) 可变轻链区

<400> 36

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
 85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly His Gln
 100 105 110

Asp Ser Asp Pro Leu Pro Leu Ile His Pro Ala Gly Gln Pro Lys Ala
 115 120 125

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
 130 135 140

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

Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val
 165 170 175

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
 180 185 190

Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr
195 200 205

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
210 215 220

Pro Thr Glu Cys Ser
225

<210> 37
<211> 580
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合到IL-2 变体的dI-NHS76(γ 4h) (FN>AQ) -ala-IL2 (D20T) 重链

<400> 37

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Lys Trp Ser Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

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

				405					410							415
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Ile	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
			420					425					430			
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Gly	Ala	Ala	
		435					440					445				
Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	
	450					455					460					
Leu	Leu	Thr	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn	
465					470					475					480	
Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	
				485					490					495		
Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	
			500					505						510		
Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	
		515					520					525				
Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys	
	530					535					540					
Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	
545					550					555					560	
Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	Ile	
				565					570					575		
Ser	Thr	Leu	Thr													
			580													

图1A

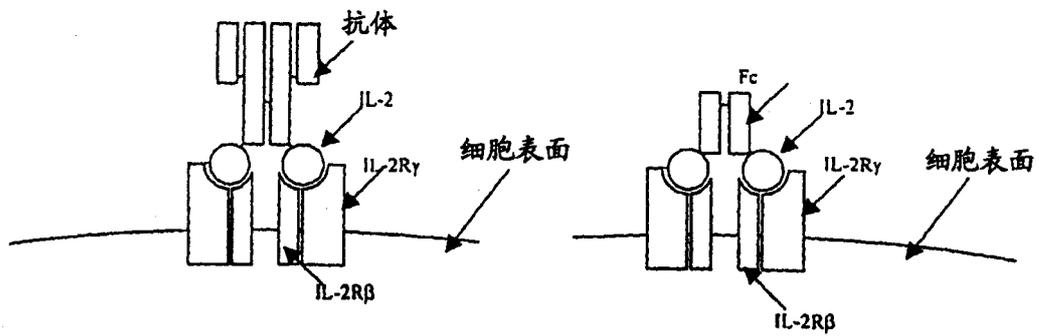


图1B

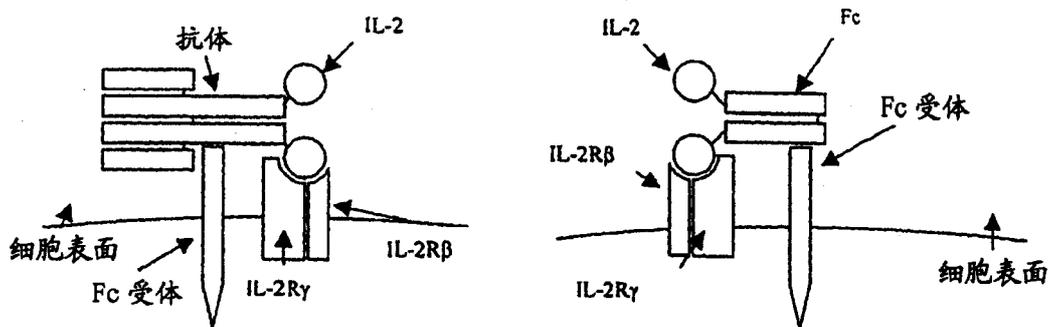
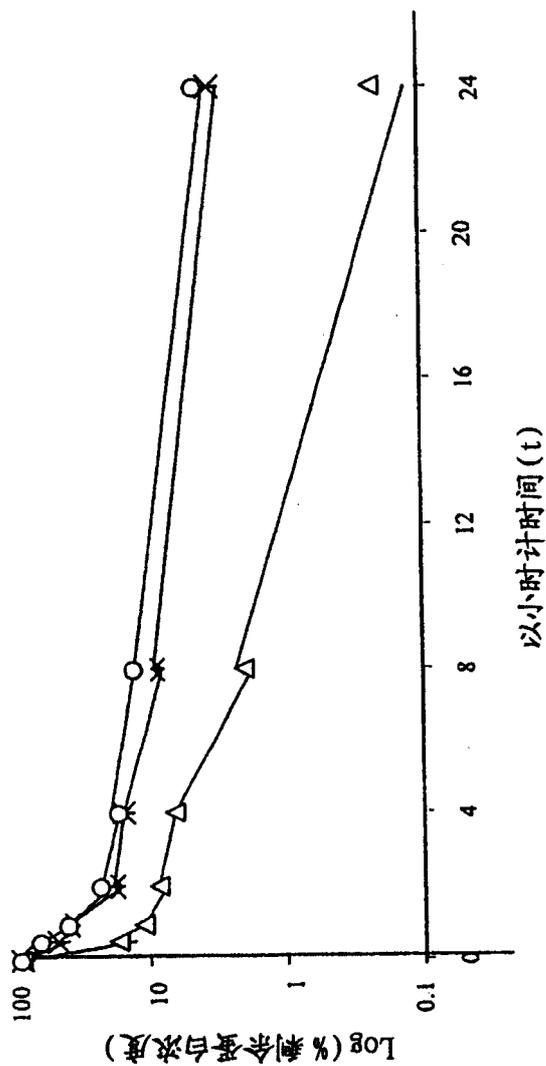


图2



专利名称(译)	具有调节的选择性的免疫细胞因子		
公开(公告)号	CN1599867A	公开(公告)日	2005-03-23
申请号	CN02824279.3	申请日	2002-12-04
申请(专利权)人(译)	默克专利有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	默克专利有限公司		
[标]发明人	SD吉利斯		
发明人	S·D·吉利斯		
IPC分类号	C12Q1/02 A61K38/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 C07K14/55 C07K16/24 C07K19/00 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/567		
CPC分类号	C07K14/55 C07K2319/00		
优先权	60/371966 2002-04-12 US 60/337113 2001-12-04 US		
其他公开文献	CN100390282C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了治疗指数增加的细胞因子融合蛋白和增加这些融合蛋白的治疗指数的方法。本发明融合蛋白能够结合一种以上类型的在细胞上表达的细胞因子受体，还能够结合一种以上细胞类型。此外，本发明融合蛋白比相应的天然发生的细胞因子在病人体内显示出更长的循环半衰期。

$$\text{差别效应} = \frac{\text{ED50}_{\text{突变}}(\text{IL-2R } \beta \gamma \text{ 受体})}{\frac{\text{ED50}_{\text{突变}}(\text{IL-2R } \alpha \beta \gamma \text{ 受体})}{\frac{\text{ED50}_{\text{非突变}}(\text{IL-2R } \beta \gamma \text{ 受体})}{\text{ED50}_{\text{非突变}}(\text{IL-2R } \alpha \beta \gamma \text{ 受体})}}$$