



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112724263 B

(45) 授权公告日 2021.08.03

(21) 申请号 202110360712.4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2021.04.02

*C07K 19/00* (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

*C07K 14/55* (2006.01)

申请公布号 CN 112724263 A

*A61K 38/20* (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.04.30

*A61K 47/68* (2017.01)

*A61P 35/00* (2006.01)

(73) 专利权人 上海偌妥生物科技有限公司

审查员 赵二双

地址 200131 上海市浦东新区自由贸易试  
验区临港新片区新杨公路1800弄2幢  
3040室

(72) 发明人 何虹霖 严宇媛 徐阳华 杨敏

夏爱坤 岳翠华 钟子洋

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公  
司 31100

代理人 陈静

权利要求书2页 说明书14页  
序列表4页 附图6页

(54) 发明名称

改造抗CD20单克隆抗体以提高其药物疗效  
的方法及其应用

(57) 摘要

本发明揭示一种改造抗CD20单克隆抗体以  
提高其药物疗效的方法及其应用。本发明的方法  
包括将抗CD20单克隆抗体的基因和IL-2突变体  
的基因进行连接,通过表达得到融合蛋白,应用  
于抑制肿瘤。本发明的方法改造获得的融合蛋白  
可对于抑制肿瘤具有非常优异的抑制效果,且毒  
副作用可控。

1. 一种改造抗CD20单克隆抗体以提高其药物疗效的方法,其特征在于,所述方法包括:将抗CD20单克隆抗体与IL-2突变体连接;其中,所述IL-2突变体在IL-2受体结合区存在突变,从而与其受体的结合被抑制;所述受体结合区包括:IL-2与IL-2R $\alpha$ 的结合区,和/或IL-2与IL-2R $\beta$ 的结合区;其中,所述IL-2突变体中,将IL-2的29位至40位的氨基酸NNYKNPKLTRML替换为QSMEIDAT,将第125位C替换为S;所述IL-2的氨基酸如SEQ ID NO: 1所示。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,还包括选自下组的突变:

- (1) 将第16位H突变为E;
- (2) 将第84位D突变为T;
- (3) 将第88位N突变为A;
- (4) 将第92位I突变为A。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述IL-2突变体连接于所述抗CD20单克隆抗体的其一或两条重链的末端;和/或

在抗CD20单克隆抗体的氨基酸序列和IL-2突变体的氨基酸序列之间,包括4-20个氨基酸的连接子;和/或

所述IL-2突变体连接于所述抗CD20单克隆抗体的其中一条重链末端时,抗CD20单克隆抗体的两条重链上分别设置Knob和Hole,形成Knob-into-Hole结构。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述抗CD20单克隆抗体包括IgG1, IgG2或IgG4型抗体;或

所述抗CD20单克隆抗体包括:单价抗体、单链抗体、双链抗体、嵌合抗体;或

所述抗CD20单克隆抗体包括含有抗原结合结构域的多肽。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述抗CD20单克隆抗体是利妥昔单抗。

6. 一种融合蛋白,其包括:抗CD20单克隆抗体和IL-2突变体;其中,所述IL-2突变体在IL-2受体结合区存在突变,从而与其受体的结合被抑制;所述受体结合区包括:IL-2与IL-2R $\alpha$ 的结合区,和/或IL-2与IL-2R $\beta$ 的结合区;其中,所述IL-2突变体中,将IL-2的29位至40位的氨基酸NNYKNPKLTRML替换为QSMEIDAT,将第125位C替换为S;所述IL-2的氨基酸如SEQ ID NO: 1所示。

7. 如权利要求6所述的融合蛋白,其特征在于,还包括选自下组的突变:

- (1) 第16位H突变为E;
- (2) 第84位D突变为T;
- (3) 第88位N突变为A;
- (4) 第92位I突变为A。

8. 如权利要求6所述的融合蛋白,其特征在于,所述IL-2突变体连接于所述抗CD20单克隆抗体的其一或两条重链的末端;和/或

在抗CD20单克隆抗体的氨基酸序列和IL-2突变体的氨基酸序列之间,包括4-20个氨基酸的连接子;和/或

所述IL-2突变体连接于所述抗CD20单克隆抗体的其中一条重链末端时,抗CD20单克隆抗体的两条重链上分别设置Knob和Hole,形成Knob-into-Hole结构。

9. 如权利要求6所述的融合蛋白,其特征在于,所述抗CD20单克隆抗体包括IgG1, IgG2或IgG4型抗体;或

所述抗CD20单克隆抗体包括：单价抗体、单链抗体、双链抗体、嵌合抗体；或  
所述抗CD20单克隆抗体包括含有抗原结合结构域的多肽。

10. 如权利要求6所述的融合蛋白，其特征在于，所述抗CD20单克隆抗体是利妥昔单抗。

11. 一种核酸分子，所述的核酸分子编码权利要求6~10任一所述融合蛋白。

12. 一种载体，所述的载体中含有权利要求11所述的核酸分子。

13. 一种基因工程化的细胞，所述的细胞含有权利要求12所述的载体；或所述的细胞基因组中整合有权利要求11所述的核酸分子。

14. 一种制备权利要求6~10任一所述的融合蛋白的方法，所述的方法包括：培养权利要求13所述的细胞，使所述细胞产生所述的融合蛋白。

15. 权利要求6~10任一所述的融合蛋白的用途，用于制备抑制肿瘤的药物组合物。

16. 一种用于抑制肿瘤的药物组合物，其特征在于，所述的药物组合物含有：

(i) 权利要求6~10任一所述的融合蛋白；和

(ii) 生物学上可接受的载体。

17. 一种用于抑制肿瘤的药盒，其特征在于，其中含有：

权利要求6~10任一所述的融合蛋白；或

权利要求16所述的药物组合物。

## 改造抗CD20单克隆抗体以提高其药物疗效的方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,更具体地,本发明涉及一种改造抗CD20单克隆抗体以提高其药物疗效的方法及其应用。

### 背景技术

[0002] CD20是一种跨膜蛋白,表达在B细胞上,起到调节B细胞活化和增殖的作用。CD20在大多数B细胞恶性肿瘤中都有表达,因此CD20是淋巴瘤、白血病和某些自身免疫等疾病治疗的热门目标靶点。抗CD20的抗体药物,利妥昔单抗,于1997年11月26日获FDA批准上市,用于治疗非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病以及其他非肿瘤疾病。虽然一部分患者在注射利妥昔单抗之后,疾病能得到很好的控制,但是还是有相当一部分患者存在无效或者用药后复发的情况,因此需要开发更为有效的药物,惠及更多的患者。

[0003] 白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 是一种由激活的T细胞产生的细胞因子,通过促进辅助性T淋巴细胞,细胞毒性T淋巴细胞以及NK细胞的增殖,从而增强人体的免疫能力,达到通过自身的免疫细胞去杀死肿瘤细胞的目的,因为也被应用到治疗恶性肿瘤中。但是由于IL-2带来的超强免疫反应,会过度地激活免疫细胞,在杀伤肿瘤细胞的同时,也会对正常器官造成严重的毒性,例如血管渗漏综合征,因此限制了其在临床上应用。

[0004] 目前也有将抗CD20抗体和IL-2做成融合蛋白,一方面利用抗CD20抗体的靶向性,特异地作用于高表达CD20的肿瘤细胞上,另一方面利用IL-2能够激活免疫细胞的作用,将免疫细胞吸引到肿瘤细胞附近,从而更有效地杀伤肿瘤细胞。因此,理论上融合蛋白治疗肿瘤的效果可能要优于单独的抗CD20抗体药物。

[0005] 但是将抗CD20抗体和IL-2制备成融合蛋白,同样会遇到IL-2对机体造成毒性过大的问题,对病人的正常组织造成损害,而且用药的剂量会受到限制,进一步影响到抗CD20抗体部分的功效。因此如何降低IL-2部分的毒性,更好发挥抗肿瘤的效果,成为将抗CD20抗体和IL-2做成融合蛋白,能够更好地应用到临床的一个亟待解决的难题。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种改造抗CD20单克隆抗体以提高其药物疗效的方法。

[0007] 在本发明的第一方面,提供一种改造抗CD20单克隆抗体以提高其药物疗效的方法,包括:将抗CD20单克隆抗体与IL-2突变体连接;其中,所述IL-2突变体在IL-2受体结合区存在突变,从而与其受体的结合被抑制;所述受体结合区包括:IL-2与IL-2R $\alpha$  (CD25)的结合区,和/或IL-2与IL-2R $\beta$  (CD122)的结合区。

[0008] 在一个选例中,所述的抑制包括全部抑制或部分抑制;所述部分抑制包括:抑制20%以上,较佳地抑制40%以上,更佳地抑制60%以上;如抑制70%、80%或90%。

[0009] 在另一优选例中,所述的IL-2突变体是将IL-2的29位至40位的氨基酸NNYKNPKLTRML替换为与之氨基酸排列不同的氨基酸序列,序列长度5~10个(如6、7、8、9个)。

[0010] 在另一优选例中,所述的IL-2突变体中,IL-2的29位至40位的氨基酸NNYKNPKLTRML被替换为QSMEIDAT;其中,该QSMEIDAT序列中每一氨基酸可以由性质相同或近似的氨基酸替代。

[0011] 在另一优选例中,所述的IL-2突变体还包括选自下组的突变(包括1、2或多个突变):(1) 将第16位H进行突变;(2) 将第84位D进行突变;(3) 将第88位N进行突变;(4) 将第92位I进行突变。

[0012] 在另一优选例中,(1)中,将第16位H突变为E;(2)中,将第84位D突变为T;(3)中,将第88位N突变为A;(4)中,将第92位I突变为A。

[0013] 在另一优选例中,所述的突变为选自(1)~(4)的1、2或多个突变。

[0014] 在另一优选例中,所述IL-2突变体连接于所述抗CD20单克隆抗体的其一或两条重链的末端。

[0015] 在另一优选例中,在抗CD20单克隆抗体的氨基酸序列和IL-2突变体的氨基酸序列之间,包括4-20个氨基酸的连接子(连接肽)。

[0016] 在另一优选例中,所述IL-2突变体连接于所述抗CD20单克隆抗体的其中一条重链末端时,抗CD20单克隆抗体的两条重链上分别设置Knob和Hole,形成Knob-into-Hole结构。

[0017] 在另一优选例中,所述IL-2突变体连接于所述抗CD20单克隆抗体的非“抗原结合部位”。

[0018] 在另一优选例中,所述的连接子的氨基酸序列为(GGGS) $n$ ,其中, $n=1\sim 5$ 。更优选的, $n=1\sim 4$ ,更优选的, $n=2\sim 3$ 。更优选的,所述的连接子具有GGGSGGGSGGGGS的氨基酸序列。

[0019] 在另一优选例中,所述抗CD20单克隆抗体包括IgG1,IgG2或IgG4型抗体。

[0020] 在另一优选例中,所述抗CD20单克隆抗体包括:单价抗体、单链抗体、双链抗体、嵌合抗体,或它们的衍生物、功能等同物或同源物。

[0021] 在另一优选例中,所述抗CD20单克隆抗体包括抗体片段或含有抗原结合结构域的多肽。

[0022] 在另一优选例中,所述抗CD20单克隆抗体是利妥昔单抗。

[0023] 在另一优选例中,抗CD20单克隆抗体其重链的可变区中CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示,CDR2氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示,CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示;其轻链的可变区中CDR1氨基酸序列如SEQ ID NO: 7所示,CDR2氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示,CDR3氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示。

[0024] 在另一优选例中,所述抗CD20单克隆抗体的重链的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示,其轻链的可变区氨基酸序列如SEQ ID NO: 3所示。

[0025] 在本发明的另一方面,提供一种融合蛋白,其包括:抗CD20单克隆抗体和IL-2突变体;其中,所述IL-2突变体在IL-2受体结合区存在突变,从而与其受体的结合被抑制;所述受体结合区包括:IL-2与IL-2R $\alpha$ (CD25)的结合区,和/或IL-2与IL-2R $\beta$ (CD122)的结合区。

[0026] 在一个优选例中,所述的IL-2突变体是将IL-2的29位至40位的氨基酸NNYKNPKLTRML替换为与之氨基酸排列不同的氨基酸序列,序列长度5~10个(如6、7、8、9个)。

[0027] 在另一优选例中,所述的IL-2突变体中,IL-2的29位至40位的氨基酸

NNYKNPKLTRML被替换为QSMEIDAT;其中,该QSMEIDAT序列中每一氨基酸可以由性质相同或近似的氨基酸替代。

[0028] 在另一优选例中,所述的融合蛋白还包括选自下组的突变(包括1、2或多个突变): (1) 第16位H突变; (2) 第84位D突变; (3) 第88位N突变; (4) 第92位I突变。

[0029] 在另一优选例中, (1) 中, 第16位H突变为E; (2) 中, 第84位D突变为T; (3) 中, 第88位N突变为A; (4) 中, 第92位I突变为A。

[0030] 在另一优选例中,所述的突变为选自(1)~(4)的1、2或多个突变。

[0031] 在另一优选例中,所述IL-2突变体连接于所述抗CD20单克隆抗体的其一或两条重链的末端。

[0032] 在另一优选例中,在抗CD20单克隆抗体的氨基酸序列和IL-2突变体的氨基酸序列之间,包括4-20个氨基酸的连接子(连接肽)。

[0033] 在另一优选例中,所述IL-2突变体连接于所述抗CD20单克隆抗体的其中一条重链末端时,抗CD20单克隆抗体的两条重链上分别设置Knob和Hole,形成Knob-into-Hole结构。

[0034] 在另一优选例中,所述IL-2突变体连接于所述抗CD20单克隆抗体的非“抗原结合部位”。

[0035] 在另一优选例中,所述的连接子的氨基酸序列为(GGGS)<sub>n</sub>,其中,n=1~5。更优选的,n=1~4,更优选的,n=2~3。更优选的,所述的连接子具有GGGSGGGSGGGGS的氨基酸序列。

[0036] 在另一优选例中,所述抗CD20单克隆抗体包括IgG1,IgG2或IgG4型抗体。

[0037] 在另一优选例中,所述抗CD20单克隆抗体包括:单价抗体、单链抗体、双链抗体、嵌合抗体,或它们的衍生物、功能等同物或同源物。

[0038] 在另一优选例中,所述抗CD20单克隆抗体包括抗体片段或含有抗原结合结构域的多肽。

[0039] 在另一优选例中,所述抗CD20单克隆抗体是利妥昔单抗。

[0040] 在本发明的另一方面,提供一种核酸分子,所述的核酸分子编码所述融合蛋白。

[0041] 在本发明的另一方面,提供一种载体,所述的载体中含有所述的核酸分子。

[0042] 在本发明的另一方面,提供一种基因工程化的细胞,所述的细胞含有所述的载体;或所述的细胞基因组中整合有所述的核酸分子。

[0043] 在本发明的另一方面,提供一种制备所述的融合蛋白的方法,所述的方法包括:培养所述的细胞,使所述细胞产生所述的融合蛋白。

[0044] 在一个优选例中,所述方法还包括:回收所述的融合蛋白;更优选的,包括分离和纯化所述的融合蛋白。

[0045] 在本发明的另一方面,提供所述的融合蛋白的用途,用于制备抑制肿瘤的药物组合物。

[0046] 在一个优选例中,所述肿瘤是表达CD20抗原的肿瘤。

[0047] 在另一优选例中,所述表达CD20抗原的肿瘤包括(但不限于):B细胞淋巴瘤(包括弥漫大B细胞淋巴瘤),滤泡淋巴瘤,慢性淋巴细胞白血病。

[0048] 在本发明的另一方面,提供一种用于抑制肿瘤的药物组合物,所述的药物组合物含有:(i)所述的融合蛋白;和(ii)生物学上可接受的载体。

[0049] 在本发明的另一方面,提供一种用于抑制肿瘤的药盒,其中含有所述的融合蛋白;或,含有所述的药物组合物。

[0050] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

### 附图说明

[0051] 图1、本发明去除了与受体IL-2R $\alpha$  (CD25) 的结合的IL-2突变体与野生型IL-2的序列比对。

[0052] 图2、本发明构建的抗CD20与IL-2的融合蛋白的结构示意图。

[0053] 图3、本发明IL-2突变体 (RT001-10) 以及野生型IL-2 (wt IL-2) 与IL-2R $\alpha$  (CD25) 的亲合力。

[0054] 图4、本发明IL-2突变体与IL-2R $\beta$  (CD122) 的亲合力。

[0055] 图5、本发明抗CD20与IL-2突变体的融合蛋白与细胞膜上CD20的亲合力。

[0056] 图6A、本发明抗CD20与IL-2突变体的融合蛋白RT001-10对细胞内pSTAT5信号的激活功能,以野生型为对照。

[0057] 图6B、本发明抗CD20与IL-2突变体的融合蛋白RT001-10、RT001-24、RT001-27、RT001-30、RT001-33对细胞内pSTAT5信号的激活功能。

[0058] 图7、本发明抗CD20与IL-2突变体的融合蛋白对肿瘤细胞的杀伤功能。

[0059] 图8、本发明不同IL-2突变体的抗CD20与IL-2突变体的融合蛋白结构图。

[0060] 图9、本发明不同IL-2突变体的抗CD20与IL-2突变体的融合蛋白与细胞膜上CD20的亲合力。

[0061] 图10、本发明不同IL-2突变体的抗CD20与IL-2突变体的融合蛋白对细胞内pSTAT5信号的激活功能。

[0062] 图11、本发明不同IL-2突变体的抗CD20与IL-2突变体的融合蛋白对肿瘤细胞的杀伤功能。

[0063] 图12、本发明IL-2突变体接在抗CD20抗体两条重链末端的融合蛋白与细胞膜上CD20的亲合力。

[0064] 图13、本发明IL-2突变体接在抗CD20抗体两条重链末端的融合蛋白与对细胞内pSTAT5信号的激活功能。

[0065] 图14、本发明IL-2突变体接在抗CD20抗体两条重链末端的融合蛋白对肿瘤细胞的杀伤功能。

[0066] 图15、抗CD20与不同IL-2突变体形成的融合蛋白在小鼠体内的毒性试验。

### 具体实施方式

[0067] 本发明人经过深入的研究和试验,揭示一种改造抗CD20单克隆抗体以提高其药物疗效的方法,其包括将抗CD20单克隆抗体和IL-2突变体进行融合。本发明的方法改造获得的融合蛋白可对于抑制肿瘤具有非常优异的效果,大大高于单用CD20的抑瘤效果。

[0068] 如本文所用,“操作性相连”或“可操作地连于”指这样一种状况,即线性DNA序列的某些部分能够影响同一线性DNA序列其它部分的活性。例如,如果启动子控制以编码序列的

转录,那么它就是可操作地连于编码序列。

[0069] 如本文所用,所述的“含有”,“具有”或“包括”包括了“包含”、“主要由……构成”、“基本上由……构成”、和“由……构成”;“主要由……构成”、“基本上由……构成”和“由……构成”属于“含有”,“具有”或“包括”的下位概念。

[0070] 如本文所用,“生物学可接受的载体”是用于将本发明的融合蛋白传送给需要处理的对象(包括食品、饲料)的,在毒性、副作用方面可控的、环境友好或对人畜无害的溶剂、悬浮剂或赋形剂等。所述载体可以是液体或固体,较佳的是能够较高程度保持本发明的融合蛋白的生物活性的载体。

[0071] 蛋白改造

[0072] 本发明提供了新的改造抗CD20单克隆抗体以提高其药物疗效的方法,包括将抗CD20单克隆抗体和IL-2突变体进行融合,本发明的方法获得的融合蛋白包括CD20单克隆抗体(包括其生物活性片段)和IL-2突变体(包括其生物活性片段)。本发明所述的融合蛋白可以是一种独立的/分离的蛋白,是重组宿主细胞培养的纯化产物或作为一种纯化的提取物。

[0073] IL-2突变体

[0074] 本发明人经过深入分析,获得一些能够与抗CD20单克隆抗体良好兼容和配合的IL-2突变体;获得的融合蛋白抑制肿瘤细胞的能力显著增强,本发明突变蛋白中的氨基酸编号可基于SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列的编号。

[0075] 本发明突变体(突变蛋白)是合成蛋白或重组蛋白,即可以是化学合成的产物,或使用重组技术从原核或真核宿主(例如,细菌、酵母、植物)中产生。根据重组生产方案所用的宿主。本发明的突变蛋白还可包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

[0076] 本发明还包括IL-2突变蛋白的片段、衍生物和类似物。如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明实施例中所列举的突变蛋白相同的生物学功能或活性的蛋白。

[0077] 本发明的IL-2突变蛋白的片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的突变蛋白,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的突变蛋白,或(iii)成熟突变蛋白与另一个化合物(比如延长突变蛋白半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的突变蛋白,或(iv)附加的氨基酸序列融合到此突变蛋白序列而形成的突变蛋白(如前导序列或分泌序列或用来纯化此突变蛋白的序列或蛋白原序列,或与抗原IgG片段的形成的融合蛋白)。然而,所述的片段、衍生物和类似物的氨基酸序列中,对应于野生型IL-2,本发明所主张的关键突变位点/区域,包括IL-2受体结合区的突变是保守存在的;也即,所述的片段、衍生物和类似物所涵盖的序列变化,存在于IL-2上非关键性的部位,所述的片段、衍生物和类似物仍能够与本发明实施例所列举的突变体具有的功能/活性是相同或基本相同的。

[0078] 此外,还可以对本发明突变蛋白进行修饰。修饰(通常不改变一级结构)形式包括:体内或体外的突变蛋白的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化,如那些在突变蛋白的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的突变蛋白。这种修饰可以通过将突变蛋白暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸,磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸)的



序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的突变蛋白。同样地,修饰后的IL-2突变体蛋白的氨基酸序列中,对应于野生型IL-2,本发明所主张的关键突变位点/区域,包括IL-2受体结合区的突变是保守存在的;也即,所述的修饰后的IL-2突变体蛋白所涵盖的序列修饰形式的变化,存在于IL-2上非关键性的部位,所述的修饰后的IL-2突变体蛋白仍能够与本发明实施例所列举的突变体具有的功能/活性是相同或基本相同的。

[0079] 术语“编码突变蛋白的多核苷酸”可以是包括编码本发明IL-2突变蛋白的多核苷酸,也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

[0080] 抗CD20单克隆抗体

[0081] 如本文所用,所述的“抗CD20单克隆抗体”是指能够特异性结合细胞表面CD20抗原的抗体。在本发明中,所述“抗体”可以涵盖具有所需特异性的结合结构域的抗CD20特异性结合因子。因而,这个术语涵盖了与之同源的抗体片段、衍生物以及抗体的功能等同物和同源物,也包括含有抗原结合结构域的任何多肽,无论是天然的还是合成产生的。

[0082] 本发明所述抗CD20单克隆抗体可以是单价的或是单链抗体、双链抗体、嵌合抗体以及上述抗体的衍生物、功能等同物和同源物,也包括抗体片段和含有抗原结合结构域的任何多肽。抗体可以通过许多方式修饰,可用DNA重组技术来产生保留原来抗体特异性的其它抗体或嵌合分子。这种技术可以包括将编码抗体的免疫球蛋白可变区或互补性决定区(CDRs)的DNA引入不同免疫球蛋白的恒定区或恒定区加框架区。还可以对杂交瘤细胞或产生抗体的其它细胞进行遗传突变或其它改变,这可以改变或者不改变所产生抗体的结合特异性。

[0083] 本发明所述抗CD20单克隆抗体除了重链和轻链中的高度可变区CDR1、CDR2和CDR3和连接序列外,其它为框架区。框架区可在结合所需的三维结构不受影响的条件下被其他序列置换,抗体特异性的分子基础主要来自于它的高度可变区CDR1、CDR2和CDR3,这些区域是与抗原结合的关键部位。为维持优选的结合特性,CDR的序列应尽可能保留,然而,可能需要一些氨基酸改变使结合特性最优化。

[0084] 在本发明的优选方式中,所述的抗CD20单克隆抗体为利妥昔单抗,或与其同功能的经改造或修饰的单抗。

[0085] 连接

[0086] 本发明的新型融合蛋白中,所包括的抗CD20单克隆抗体和IL-2突变体是可操作性连接的,两者兼容性理想,生物活性高。

[0087] 作为本发明的一种优选的方式,所述的IL-2突变体和CD20单克隆抗体通过多肽连接子连接,从而形成融合蛋白。在IL-2突变体和CD20单克隆抗体的氨基酸序列之间连接上一段适当长度的氨基酸接头有利于两者发挥较高的生物活性。

[0088] 在本发明的一种优选方式中,所述的连接子包括4-20个氨基酸。在本发明的更优选的方式中,所述的连接子的氨基酸序列为(GGGS)<sub>n</sub>(其中,n=1~5);更优选的,所述的n=1-4;最优的,所述的n=3,即所述连接子为GGGSGGGSGGGS。

[0089] 作为一种优选的方式,当表达后形成抗体的Y形结构时,所述IL-2突变体连接于所述抗CD20单克隆抗体的重链的一条氨基酸序列的末端上。当表达后形成抗体的Y形结构时,其构成如本发明实施例图2的左图或中图的连接方式。

[0090] 作为另一种优选的方式,当表达后形成抗体的Y形结构时,所述IL-2突变体连接于所述抗CD20单克隆抗体的重链的两条氨基酸序列的末端上。其构成如本发明实施例图2的右图的连接方式。

[0091] 作为另一种方式,将所述的IL-2突变体和CD20单克隆抗体直接连接,比如把抗CD20单克隆抗体与IL-2突变体的编码基因直接连接,融合表达,二者之间不加氨基酸连接子。

[0092] 本发明的融合蛋白,还可以与其它的同源功能性分子进一步连接或耦合,从而构成免疫偶联物;所述的同源功能性分子可以包括但不限于:细胞因子,可检测标记物,毒素(如抑制肿瘤的毒素)、转录激活域、转录抑制域、核酸酶、脱氨基酶、甲基酶、脱甲基酶、转录释放因子等。所述的可检测标记物可以包括但不限于:荧光标记物、显色标记物、报告基因、定位信号等。所述同源功能结构域可连接、偶联或缀合于本发明的融合蛋白的N端、C端或内部。

[0093] 所述的可检测标记物例如可包括但不限于:荧光标记物、显色标记物;如:酶、辅基、荧光材料、发光材料,生物发光材料、放射性材料、正电子发射金属以及非放射性顺磁性金属离子。也可包含一个以上的标记物。为了检测和/或分析和/或诊断目的用于标记抗体的标记依赖于使用的特定检测/分析/诊断技术和/或方法例如免疫组织化学染色(组织)样品、流式细胞计量术等。对于本领域已知的检测/分析/诊断技术和/或方法合适的标记为本领域技术人员所熟知。

[0094] 核酸分子及含有其的构建体或细胞

[0095] 另一方面,本发明提供了编码所述的融合蛋白的分离的核酸,也可以是其互补链。

[0096] 并且,本发明还提供了包含编码所述融合蛋白的核酸分子的载体。所述的载体还可包含与所述核酸分子的序列操作性相连的表达调控序列,以便于所述融合蛋白的表达。

[0097] 任何编码IL-2突变体的合适的核酸分子都适用于本发明。任何编码抗CD20单克隆抗体的合适的核酸分子也适用于本发明。下文实例中提及的序列都适用于本发明的方法。应理解,当提供了蛋白的氨基酸序列后,本领域技术人员能够方便地确定编码其的核酸分子。

[0098] 任何合适的载体都可以使用,比如一些用于哺乳动物、细菌、真菌、酵母的克隆和表达的载体,如Pouwels等,克隆载体:实验室手册(Elsevier最新版)中所描述的。在本发明的优选方式中,所述的载体为哺乳动物细胞适用的载体。

[0099] 在一些实施方案中,所述载体可以是一些病毒类载体,例如但不限于逆转录病毒载体、噬菌体载体、腺病毒载体、单纯疱疹病毒(HSV)载体、AAV载体、或慢病毒载体。

[0100] 表达载体包括连接有合适的转录和翻译调节序列的融合蛋白DNA序列,如哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因。调节序列包括转录启动子、操纵子、增强子、核糖体结合位点或控制转录和翻译起始和终止的合适序列。在融合蛋白序列需要调节序列功能的时候,则连接合适的调节序列。这样,启动子序列被连接在编码融合蛋白DNA序列前端。在宿主细胞内的复制的能力通常由复制起始点控制。用于转化株识别的筛选基因也可加入表达载体。

[0101] 另外,非天然的IL-2突变体或CD20单克隆抗体的信号肽的编码序列可以引入表达载体。例如:信号肽(分泌引导物)序列可以和与融合蛋白编码序列融合,从而使翻译的融合蛋白可分泌到细胞外。信号肽可增强宿主细胞向胞外分泌嵌合多肽。信号肽在多肽从细胞

内分泌出来的过程中可被切去。

[0102] 此外,含有编码所述融合蛋白的核酸序列的重组细胞也包括在本发明中。在本发明的一种方式中,该细胞可为真核细胞。优选地,所述细胞可包括但不限于:CHO细胞或基于其改造的细胞,NS2/0细胞或基于其改造的细胞,293细胞或基于其改造的细胞;更优选地,所述的细胞为CHO细胞或基于其改造的细胞。

[0103] 生产融合蛋白的方法也已包括在本发明中。所述方法包括培养含有融合蛋白编码核酸的重组细胞。所述的融合蛋白包括IL-2突变体以及CD20单克隆抗体。所述方法可包括让细胞表达编码的融合蛋白,以及使表达的融合蛋白的复性。在一个实例中,所述方法还可包括复性的融合蛋白的分离和/或纯化。所述方法的产物也被保护。

[0104] 可将上述制备获得的融合蛋白纯化为基本均一的性质,例如在SDS-PAGE电泳上呈单一条带。例如,当重组蛋白为分泌表达时,可以采用商品化的超滤膜,例如Millipore、Amicon、Pellicon等公司产品,首先将表达上清浓缩。浓缩液可采用凝胶层析的方法进一步加以纯化,或采用离子交换层析的方法纯化。例如阴离子交换层析(DEAE等)或阳离子交换层析。凝胶基质可为琼脂糖、葡聚糖、聚酰胺等常用于蛋白纯化的基质。SP基团是较为理想的离子交换基团。最后,还可用反相高效液相色谱(RP-HPLC)等方法对上述纯化产物进一步精制纯化。上述所有纯化步骤可利用不同的组合,最终使蛋白纯度达到基本均一。

[0105] 可利用含有IL-2突变体或CD20单克隆抗体的抗体、受体或配体的亲和层析柱对表达的融合性多肽进行纯化。根据所使用的亲和柱的特性,可利用常规的方法,如高盐缓冲液、改变pH等方法洗脱结合在亲和柱上的融合性多肽。

[0106] 重组蛋白以及编码该重组蛋白的核酸可利用适当的方法制备,例如,化学合成、重组表达,或其合并应用。

[0107] 融合蛋白的用途

[0108] 将抗CD20抗体和野生型IL-2形成融合蛋白时,本发明人发现,IL-2的毒性较大,会对人体造成伤害,导致药效差,而且用药的剂量不会很高,进一步影响到抗CD20抗体部分的用量。本发明就是为了克服这个缺点,对IL-2做了两个方面的改造,一个方面是去掉了IL-2与IL-2R $\alpha$  (CD25)的结合,另一个方面是降低了IL-2与IL-2R $\beta$  (CD122)的亲和力,经过两个方面的改造,将毒性被适当调控而大大降低的IL-2再与CD20抗体制备融合蛋白。

[0109] 在降低甚至去掉IL-2与受体IL-2R $\alpha$  (CD25)的结合的同时,进一步降低IL-2与IL-2R $\beta$  (CD122)的亲和力,能够进一步减小融合蛋白对机体的毒副作用,但是对肿瘤的杀伤作用不受影响。

[0110] IL-2在机体内产生毒性的一个重要原因就是与IL-2R $\alpha$ 有很强的亲和力,本发明的突变体可基本上实现完全阻止IL-2与IL-2R $\alpha$ 结合,这样可以完全去掉与IL-2R $\alpha$ 的结合而产生的毒性。与之有区别的是,IL-2与IL-2R $\beta$ 的结合关系到IL-2的药效,结合太低会影响效果、但是太高了则导致毒性的产生,本发明实现了保证药效的同时,适当降低毒性。

[0111] 本发明的IL-2突变体与CD20单克隆抗体的融合蛋白可用于抑制肿瘤。一些肿瘤细胞,例如细胞淋巴瘤(包括弥漫大B细胞淋巴瘤)细胞表面有一种表面分子为CD20,当本发明的融合蛋白进入到机体后,其具有特异性结合CD20而靶向于肿瘤的特点,还能通过结合吞噬细胞或者杀伤细胞发挥作用,使得肿瘤细胞被吞噬细胞吞噬或被杀伤细胞杀死;或者,也可以通过CD20与抗体结合后活化“补体”,而补体可以在淋巴瘤细胞上“穿洞”,使淋巴瘤细

胞死亡。由于抗体的特异靶向性,正常细胞受到的影响小(正常B淋巴细胞上也有CD20,也会被清除,但大多数正常细胞不受影响)。所以本发明的融合蛋白可以实现针对肿瘤细胞的靶向治疗。

[0112] 在一些实施方案中,所述用途/方法可以是体外方法、体内方法或离体方法。

[0113] 抗CD20抗体与IL-2突变体的融合蛋白,不仅利用了抗CD20抗体能有效识别和杀伤肿瘤细胞,以及IL-2能激活机体自身的免疫细胞,并且两者的融合蛋白还能起到协同作用,能够将免疫细胞吸引到肿瘤细胞周围,起到更好的杀伤肿瘤细胞的作用。通过降低甚至去掉IL-2与受体IL-2R $\alpha$  (CD25)的结合,起到在保持融合蛋白的杀伤肿瘤细胞的功能的同时,能够减小融合蛋白对机体的毒副作用。

[0114] 本发明人的研究结果显示,本发明的融合蛋白不仅药物的疗效非常高,而且毒性低,在肿瘤的临床治疗上,可以使得在毒性可控的情况下,大大提高给药量。

[0115] 药物组合物或药盒

[0116] 本发明还提供一种用于抑制肿瘤的药物组合物,所述的药物组合物包括:本发明所述的融合蛋白或编码其的多核苷酸,或含有该多核苷酸的表达载体或表达该融合蛋白的重组细胞;以及药学上或生理学上可接受的载体。

[0117] 合适的药学上可接受的载体是本领域普通技术人员所熟知的。在Remington's Pharmaceutical Sciences中可找到关于药学上可接受的载体的充分说明。在组合物中药学上可接受的载体可含有液体,如水、磷酸盐缓冲液、ringer溶液、生理盐水、平衡盐溶液、冻干保护剂如甘油或山梨醇等。另外,这些载体中还可能存在辅助性的物质,如润滑剂、助流剂、润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质和稳定剂,如白蛋白等。

[0118] 在使用时,是将安全有效量的本发明所述的融合蛋白或编码其的多核苷酸,或含有该多核苷酸的表达载体或表达该融合蛋白的重组细胞施用于哺乳动物(如人),其中该安全有效量通常至少约0.001微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约10毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围之内的。

[0119] 对于某一对象的精确有效量取决于该对象的体型和健康状况、病症的性质和程度、以及选择给予的治疗剂和/或治疗剂的组合。对于某给定的状况而言,可以用常规实验来确定该有效量,临床医师是能够判断出来的。

[0120] 本发明还提供了一种药盒或试剂盒,其中包括:本发明所述的融合蛋白或编码其的多核苷酸,或含有该多核苷酸的表达载体或表达该融合蛋白的重组细胞;或所述的药物组合物。

[0121] 为了便于临床应用,本发明的药物组合物可以包含在注射用给药器(如注射用针)中,所述的注射用给药器中,可以包含一次给药量的所述的药物组合物。所述的注射用给药器可以被包含在药盒中,以方便储存、使用。

[0122] 本发明所述的药盒或试剂盒中,还可包括使用说明书,以利于本领域技术人员按照正确的方式使用。

[0123] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如J.萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,第三版,科学出版社,2002中所述的条件,

或按照制造厂商所建议的条件。

[0124] 序列信息

**IL-2 序列如下(SEQ ID NO: 1):**

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE	60
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR	120
WITFCQSIIS TLT	133

**抗 CD20 抗体可变区序列如下(SEQ ID NO: 2):**

[0125] **重链可变区:**

QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYTFT <u>SYNMHWVKQT</u> PGRGLEWIGA <u>IYPGNGDTSY</u>	60
<u>NQKFKGKATL</u> TADKSSSTAY MQLSSLTSED <u>SAVYYCARST</u> <u>YYGGDWYFNV</u> WGAGTTVTVS	120
A	121

**轻链可变区(SEQ ID NO: 3):**

QIVLSQSPAI LSASPGEKVT MTCRASSSVS <u>YIHWFQQKPG</u> SSPKPWIYAT <u>SNLASGVPVR</u>	60
FSGSGSGTSY SLTISRVEAE DAATYYCQW <u>TSNPPTFGGG</u> TKLEIKRTV	109

[0126] 各个CDR区如下:

[0127] HCDR1 (SEQ ID NO: 4) :SYNMH;

[0128] HCDR2 (SEQ ID NO: 5) :AIYPGNGDTSYNQKFKG;

[0129] HCDR3 (SEQ ID NO: 6) :STYYGGDWYFNV;

[0130] LCDR1 (SEQ ID NO: 7) :RASSSVSYIH;

[0131] LCDR2 (SEQ ID NO: 8) :ATSNLAS;

[0132] LCDR3 (SEQ ID NO: 9) :QQWTSNPPT。

[0133] 实施例1、IL-2的突变及其与利妥昔单抗的融合

[0134] 1、突变体的建立

[0135] 为了达到降低IL-2毒性的目的,本发明人进行了反复研究和实验,分析了IL-2序列的很多位点,以确定既能降低毒性、又能良好维持其生物活性的方式。本发明人希望去掉IL-2 与其受体IL-2R $\alpha$  (CD25) 的结合能力但保留其良好的生物活性、以及能够与CD20融合后具有良好的作用。

[0136] 首先,本发明人将来自IL-15的一部分序列替换IL-2上与IL-2R $\alpha$ 结合部位,具体做法是将IL-2的29位至40位的氨基酸NNYKNPKLTRML (SEQ ID NO: 10) 替换成IL-15的QSMEIDAT (SEQ ID NO: 11)。

[0137] 其次,本发明人还将第125的C突变成了S。突变后,序列如图1中RT001-10所示。

[0138] 2、融合蛋白的建立及效果及亲和力研究

[0139] 融合蛋白的结构如图2所示,将突变后的IL-2突变体,分别连接到利妥昔单抗其中一条或者两条重链的末端,中间由氨基酸序列为GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 12) 的一段多肽作为连接子(linker)。以将IL-2突变体连接到其中一条重链的末端为例,具体做法是采用knob-into-hole技术(Oncotarget. 2017 Aug 1; 8(31): 51037-51049),将IL-2的突变体的基因,分别连接到利妥昔单抗其中一条重链基因的末端,该重链的Fc段经过基因突变改造成hole链,将连接后的基因构建到已经带有利妥昔单抗的轻链基因的pCGS3 (Merck) 表达载体的BstBI/PacI酶切位点中,将该表达载体命名为pCGS3-RTX-LC-RTX-hole-HC-IL2 mutant1。另外,再将利妥昔单抗的重链基因经过基因突变改造成knob链,构建到已经带有

利妥昔单抗的轻链基因的pCGS3表达载体上,将该表达载体命名为pCGS3-RTX-LC-RTX-knob-HC。将以上两种质粒,pCGS3-RTX-LC-RTX-hole-HC-IL2 mutant1和pCGS3-RTX-LC-RTX-knob-HC一起转染到ExpiCHO细胞中表达,通过纯化获得融合蛋白(图2中图),本发明人将其命名为RT001-10。将IL-2突变体连接到其中另一条重链的末端的操作也是如此(图2左图);将IL-2突变体连接到两条重链的末端的操作也是如此(图2右图)。

[0140] 利用常规的Octet亲和力测定仪,检测融合蛋白与CD25的亲和力。结果如图3所示,与野生型的IL-2具有明显的结合信号相比,IL-2的突变体的融合蛋白RT001-10完全没有结合信号,说明经过突变后,其与CD25的结合能力被完全去除。

[0141] 实施例2、IL-2的进一步突变及其与利妥昔单抗的融合

[0142] 在获得了没有CD25的结合能力的IL-2突变体的融合蛋白之后,本发明人进一步进行突变改造。

[0143] 经过深入研究,本发明人选择了4种突变方式,具体如下:

[0144] 第一种:将第16位H突变为E;

[0145] 第二种:将第84位D突变为T;

[0146] 第三种:将第88位N突变为A;

[0147] 第四种:将第92位I突变为A。

[0148] 如实施例1同样的方法,本发明人将这些人IL-2突变体的基因,分别构建到利妥昔单抗其中一条重链基因的末端,将连接后的基因构建到已经带有利妥昔单抗的轻链基因的pCGS3表达载体上,将该表达载体命名为pCGS3-RTX-LC-RTX-hole-HC-IL2 reduced。将该pCGS3-RTX-LC-RTX-hole-HC-IL2 reduced和pCGS3-RTX-LC-RTX-knob-HC一起转染到ExpiCHO细胞中表达,通过纯化获得融合蛋白。

[0149] 融合蛋白的名称和对应的IL-2突变方式如表1。

[0150] 表 1

融合蛋白名称	IL-2 突变方式
RT001-24	NNYKNPKLTRML 换成 QSMEIDAT, C125S, H16E
RT001-27	NNYKNPKLTRML 换成 QSMEIDAT, C125S, D84T
RT001-30	NNYKNPKLTRML 换成 QSMEIDAT, C125S, N88A
RT001-33	NNYKNPKLTRML 换成 QSMEIDAT, C125S, I92A

[0151] 利用ELISA检测融合蛋白与CD122的亲和力。结果如图4所示,分别带有H16E,D84T,N88A和I92A这四种人的IL-2突变体的融合蛋白,相比RT001-10,A450的最大信号值明显降低,说明这四种突变均能显著降低融合蛋白与CD122的亲和力。

[0152] 实施例3、本发明融合蛋白与细胞膜上CD20亲和力

[0153] 采用流式细胞术,将不同IL-2突变体的融合蛋白与表达CD20的人淋巴瘤细胞Raji细胞先孵育,然后洗掉不结合的抗体,再加入带有PE标签的抗人Fc抗体的二抗,孵育结束后,洗掉不结合的二抗,用流式细胞仪检测。

[0154] 结果如图5所示,该突变后的IL-2与抗CD20抗体构建成融合蛋白后,融合蛋白与细胞膜上的CD20亲和力,与利妥昔单抗相似,即该融合蛋白对于IL-2部分进行突变,抗CD20抗体部分与CD20的亲和力完全保留。

[0156] 实施例4、本发明融合蛋白对T细胞pSTAT5信号通路的激活功能

[0157] 将融合蛋白与从人PBMC中分离得到的T细胞孵育,然后用pSTAT5试剂盒(Cisbio)检测pSTAT信号。

[0158] 如图6A所示,相比于野生型的IL2,采用本发明的方法获得的IL-2突变体与抗CD20抗体融合后形成的融合蛋白RT001-10,对于T细胞pSTAT5信号通路的激活功能有显著的降低,降低了大概10倍左右。说明采用本发明的方法获得融合蛋白RT001-10在体内的毒性大大降低。

[0159] 如图6B所示,采用本发明的方法获得的IL-2突变体与抗CD20抗体融合后形成的融合蛋白RT001-24、RT001-27、RT001-30、RT001-33,对于T细胞pSTAT5信号通路的激活功能,相比于融合蛋白RT001-10,又显著降低2~30倍左右,其中以RT001-33降低倍数最多、RT001-30次之。

[0160] 该结果说明,用本发明的方法获得融合蛋白RT001-24、RT001-27、RT001-30、RT001-33比RT001-10在体内的毒性更低。

[0161] 实施例5、本发明融合蛋白对肿瘤细胞的杀伤功能

[0162] 将以上融合蛋白先与Raji细胞(人Burkitt淋巴瘤细胞)混合,再加入人PBMC,放至CO2培养箱中孵育20~24小时,最后用LDH试剂盒(Invitrogen)检测融合蛋白对Raji细胞杀伤能力。

[0163] 结果如图7所示,融合蛋白对肿瘤细胞的杀伤功能,均要显著优于利妥昔单抗。但是,无论是只去除了CD25结合(RT001-10),还是同时去除了与CD25结合和降低了与CD122结合的IL-2突变体的融合蛋白(RT001-24、RT001-27、RT001-30、RT001-33)之间,对肿瘤细胞的杀伤能力均效果良好,说明带有IL-2突变体的融合蛋白虽然降低了与IL-2受体的亲和力,但是仍具有激活免疫细胞的能力,所以对肿瘤细胞的杀伤效果显著优于单独的利妥昔单抗。

[0164] 实施例6、不同结构的抗CD20与IL-2的融合蛋白的功能

[0165] 以RT001-10中的IL-2突变体为基础,将该IL-2突变体连接到利妥昔单抗的knob重链或者hole重链的末端,同时验证有无连接子(linker)的情况下(如图8所示),融合蛋白的功能。融合蛋白的名称和对应的结构如表2。

[0166] 表 2

融合蛋白名称	结构
RT001-10	Hole, 有 linker
RT001-02	Knob, 有 linker
RT001-03	Knob, 无 linker
RT001-04	Hole, 无 linker

[0167] 通过流式细胞术,验证不同结构的融合蛋白与细胞膜上CD20的亲和力,结果如图9所示,无论是将IL-2接到knob或者hole的重链末端,或者有无连接子,融合蛋白对细胞膜上CD20的亲和力都很高。

[0169] 通过检测融合蛋白对T细胞pSTAT5信号通路的激活功能,结果如图10所示,无论是将IL-2接到knob或者hole的重链末端,或者有无连接子,融合蛋白对T细胞pSTAT5信号通路

的激活功能均被显著抑制。

[0170] 通过检测融合蛋白对肿瘤细胞的杀伤功能,结果如图11所示,无论是将IL-2接到knob或者hole的重链末端,或者有无连接子,融合蛋白对肿瘤细胞的杀伤功能均非常理想,且均要优于利妥昔单抗。

[0171] 实施例7、IL-2突变体接在抗CD20抗体不同末端的功能变化

[0172] 本实施例中,验证将IL-2突变体接在抗CD20抗体两条重链末端的融合蛋白的功能。

[0173] 以RT001-10中的IL-2突变体为基础,将该IL-2突变体连接到利妥昔单抗两条重链的末端,结构如图2所示,融合蛋白的名称和对应的结构如表3。

[0174] 表 3

融合蛋白名称	IL-2 突变方式
RT001-13	NNYKNPKLTRML 换成 QSMEIDAT, C125S
RT001-14	NNYKNPKLTRML 换成 QSMEIDAT, C125S, H16E
RT001-15	NNYKNPKLTRML 换成 QSMEIDAT, C125S, I92A

[0175] 通过流式细胞术,验证不同IL-2突变体的融合蛋白与细胞膜上CD20的亲和力,结果如图12所示,融合蛋白对细胞膜上CD20的亲和力都很高。

[0176] 通过检测融合蛋白对T细胞pSTAT5信号通路的激活功能,结果如图13所示,RT001-13的信号要强于RT001-10,说明有两个IL-2的融合蛋白对T细胞pSTAT5信号通路的激活功能要强于只有一个IL-2的融合蛋白。

[0177] RT001-14和RT001-15的信号要弱于RT001-10,说明降低了CD122亲和力的融合蛋白,对于T细胞的激活也会减弱。

[0178] 通过检测融合蛋白对肿瘤细胞的杀伤功能,结果如图14所示,融合蛋白对肿瘤细胞的杀伤功能均非常理想,说明带有IL-2突变体的融合蛋白虽然降低了与IL-2受体的亲和力,但是仍具有激活免疫细胞的能力,所以对肿瘤细胞的杀伤效果显著优于单独的利妥昔单抗。

[0179] 实施例8、本发明融合蛋白在动物体内的毒性

[0180] 本发明人采用SCID小鼠,通过腹腔注射不同IL-2突变体的融合蛋白,来研究融合蛋白在动物体内的毒性强弱。一共分为6组,每组6只小鼠,其中RT001-10,RT001-24,RT001-33,RT001-14以及将野生型的IL-2接在利妥昔单抗上的融合蛋白,注射剂量均为3.3mg/kg,每周注射一次。对照组注射利妥昔单抗,注射剂量为3mg/kg,每周注射一次。实验结果如图15所示:

[0181] 对照组注射利妥昔单抗的小鼠完全存活,体重正常,说明利妥昔单抗对小鼠几乎没有毒性。

[0182] 注射野生型IL-2的小鼠,在5天内全部死亡,说明野生型IL-2对小鼠有非常大的毒性。

[0183] 注射RT001-10的小鼠,有2只小鼠死亡,其它小鼠的体重也有明显的减轻,说明RT001-10对小鼠有相对显著的毒性、但毒性低于野生型IL-2。

[0184] 注射RT001-24,RT001-33和RT001-14的小鼠,虽然体重有部分减轻,但是均存活,说明RT001-24,RT001-33和RT001-14对小鼠的毒性最小。



[0186] 上述结果证明,去除了与CD25结合的IL-2突变体的融合蛋白能降低其在体内的毒性,而同时去除了与CD25结合和降低了与CD122结合的IL-2突变体的融合蛋白能显著降低其在体内的毒性。

[0187] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 上海偌妥生物科技有限公司
[0003]	<120> 改造抗CD20单克隆抗体以提高其药物疗效的方法及其应用
[0004]	<130> 209332
[0005]	<160> 12
[0006]	<170> SIPOSequenceListing 1.0
[0007]	<210> 1
[0008]	<211> 133
[0009]	<212> PRT
[0010]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0011]	<400> 1
[0012]	Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
[0013]	1                            5                            10                            15
[0014]	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
[0015]	20                            25                            30
[0016]	Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
[0017]	35                            40                            45
[0018]	Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys
[0019]	50                            55                            60
[0020]	Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
[0021]	65                            70                            75                            80
[0022]	Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
[0023]	85                            90                            95
[0024]	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
[0025]	100                            105                            110
[0026]	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
[0027]	115                            120                            125
[0028]	Ile Ser Thr Leu Thr
[0029]	130
[0030]	<210> 2
[0031]	<211> 121
[0032]	<212> PRT
[0033]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0034]	<400> 2
[0035]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0036]	1                            5                            10                            15
[0037]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[0038]	20                            25                            30

[0039]	Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
[0040]	35 40 45
[0041]	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
[0042]	50 55 60
[0043]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0044]	65 70 75 80
[0045]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0046]	85 90 95
[0047]	Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
[0048]	100 105 110
[0049]	Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
[0050]	115 120
[0051]	<210> 3
[0052]	<211> 109
[0053]	<212> PRT
[0054]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0055]	<400> 3
[0056]	Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
[0057]	1 5 10 15
[0058]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
[0059]	20 25 30
[0060]	His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
[0061]	35 40 45
[0062]	Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
[0063]	50 55 60
[0064]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
[0065]	65 70 75 80
[0066]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
[0067]	85 90 95
[0068]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
[0069]	100 105
[0070]	<210> 4
[0071]	<211> 5
[0072]	<212> PRT
[0073]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0074]	<400> 4
[0075]	Ser Tyr Asn Met His
[0076]	1 5
[0077]	<210> 5

- [0078] <211> 17  
[0079] <212> PRT  
[0080] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0081] <400> 5  
[0082] Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
[0083] 1                           5                           10                           15  
[0084] Gly  
[0085] <210> 6  
[0086] <211> 12  
[0087] <212> PRT  
[0088] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0089] <400> 6  
[0090] Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val  
[0091] 1                           5                           10  
[0092] <210> 7  
[0093] <211> 10  
[0094] <212> PRT  
[0095] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0096] <400> 7  
[0097] Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His  
[0098] 1                           5                           10  
[0099] <210> 8  
[0100] <211> 7  
[0101] <212> PRT  
[0102] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0103] <400> 8  
[0104] Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
[0105] 1                           5  
[0106] <210> 9  
[0107] <211> 9  
[0108] <212> PRT  
[0109] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0110] <400> 9  
[0111] Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr  
[0112] 1                           5  
[0113] <210> 10  
[0114] <211> 12  
[0115] <212> PRT  
[0116] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

---

[0117]	<400>	10
[0118]	Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu	
[0119]	1	5 10
[0120]	<210>	11
[0121]	<211>	8
[0122]	<212>	PRT
[0123]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0124]	<400>	11
[0125]	Gln Ser Met Glu Ile Asp Ala Thr	
[0126]	1	5
[0127]	<210>	12
[0128]	<211>	12
[0129]	<212>	PRT
[0130]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0131]	<400>	12
[0132]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	
[0133]	1	5 10

	1	10	20	30	40	50	60
wtIL-2	APTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	YKNPKLTRML	TFKFYMPKKA	TELKHLQCLE	
RT001-10	APTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGIQS	MEIDAT----	TFKFYMPKKA	TELKHLQCLE	
	70	80	90	100	110	120	
wtIL-2	EELKPLEEVL	NLAQSKNFHL	RPRDLISNIN	VIVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR	
RT001-10	EELKPLEEVL	NLAQSKNFHL	RPRDLISNIN	VIVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR	
	130	133					
wtIL-2	WITFCQSIIS	TLT					
RT001-10	WITFSQSIIS	TLT					

图1

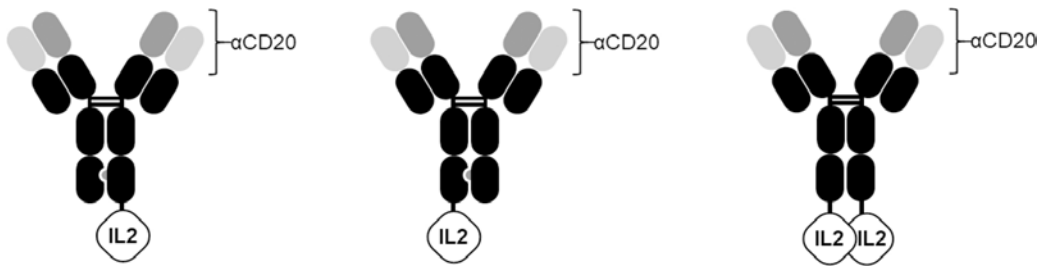


图2

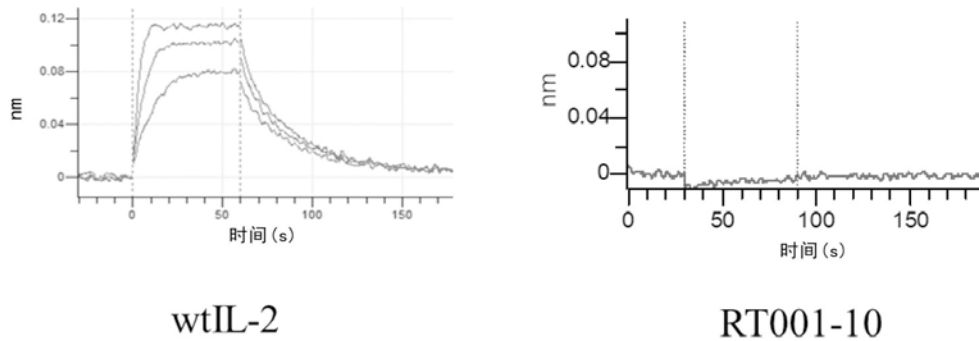


图3

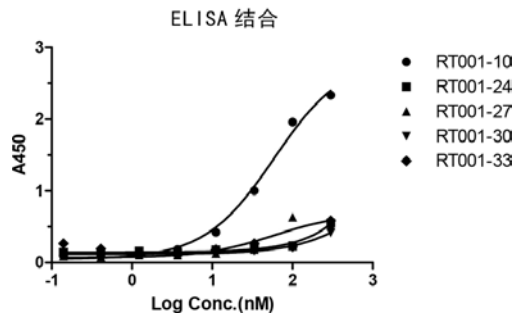


图4

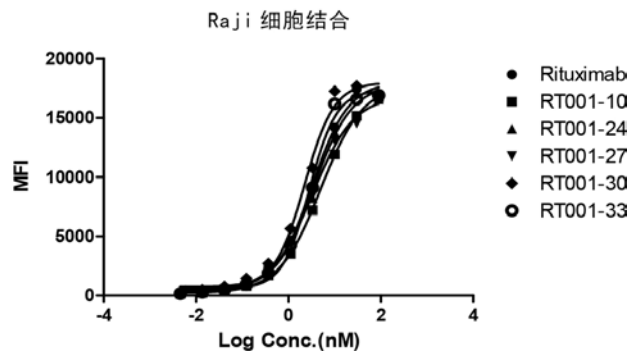


图5

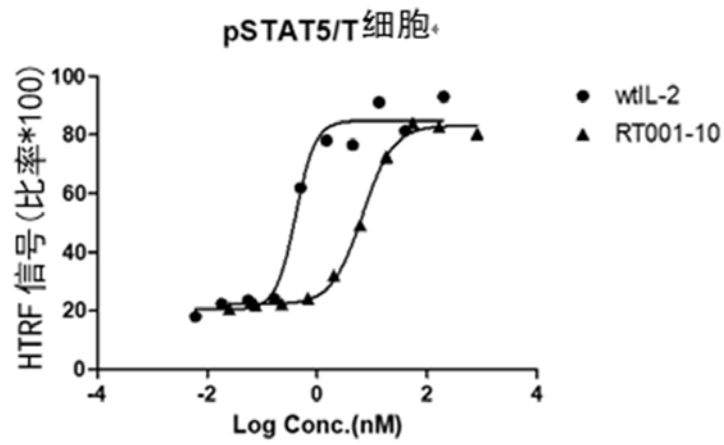


图6A

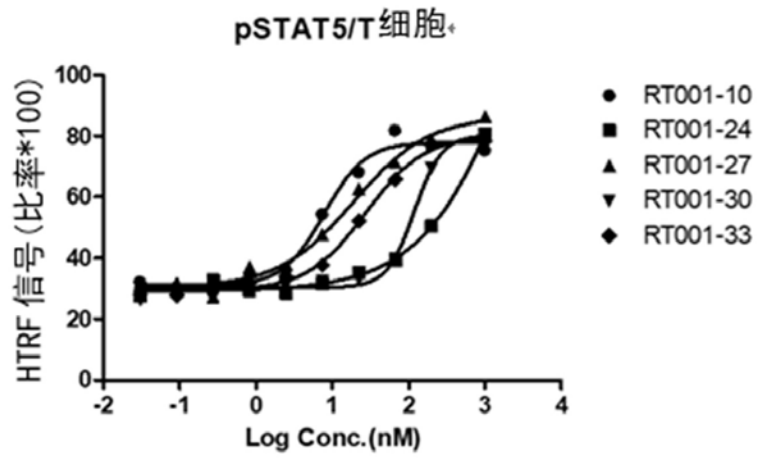


图6B

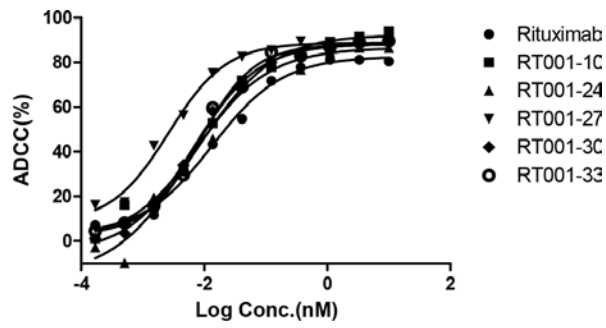


图7

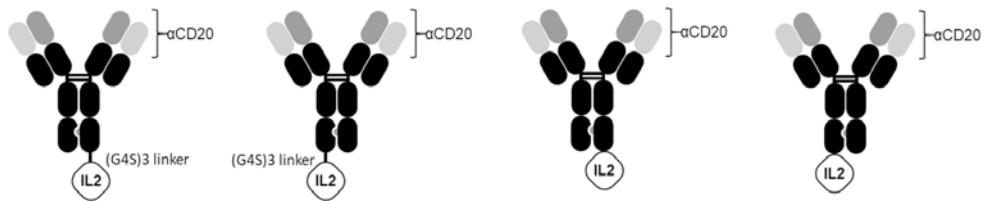


图8



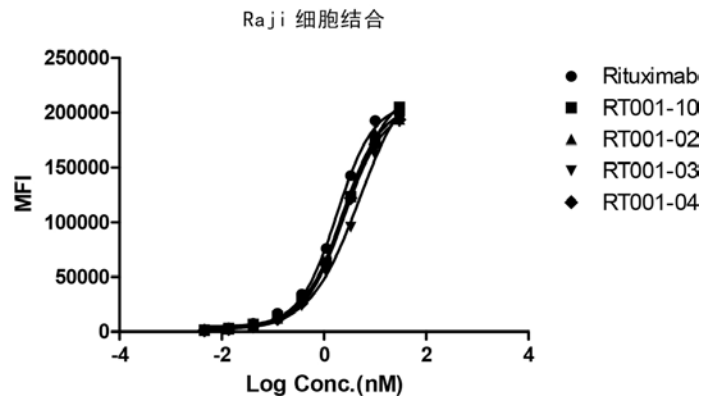


图9

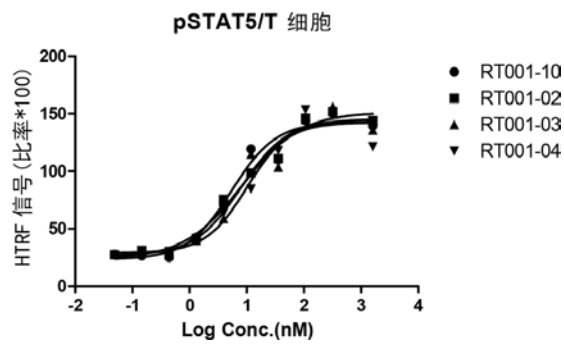


图10

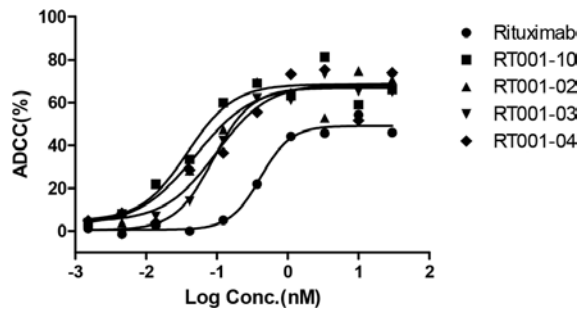


图11

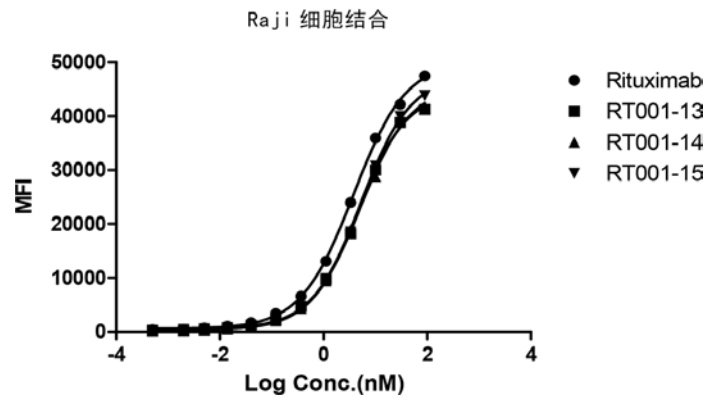


图12

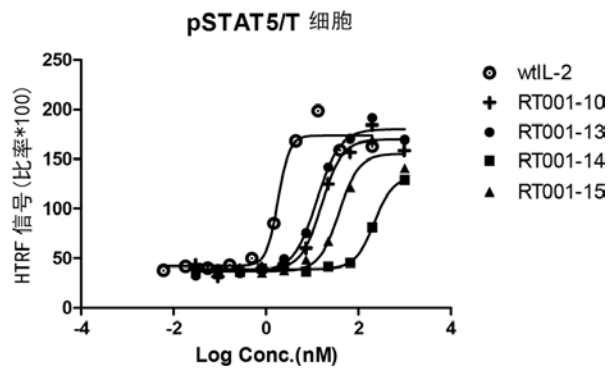


图13

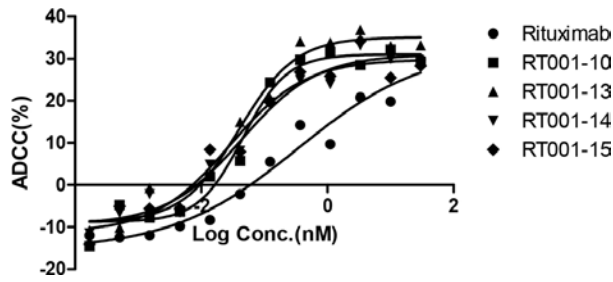


图14

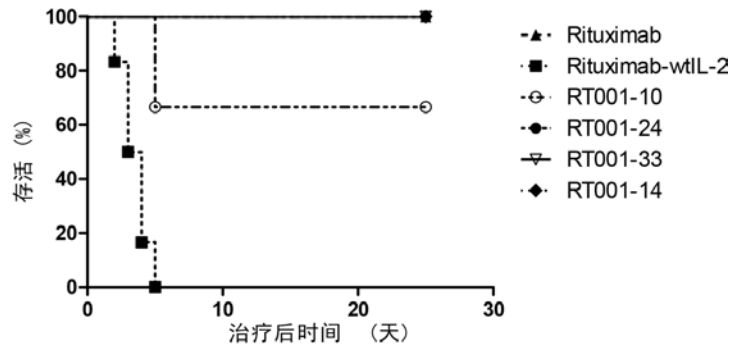


图15