



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202115115 A

(43) 公開日：中華民國 110 (2021) 年 04 月 16 日

(21) 申請案號：109121834 (22) 申請日：中華民國 109 (2020) 年 06 月 29 日

(51) Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) A61K38/20 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2019/07/02 歐洲專利局 19183829.1

(71) 申請人：瑞士商赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
瑞士

(72) 發明人：富雷摩捨 葛倫雪伯 安 FREIMOSER-GRUNDSCHOBBER, ANNE (CH)；克雷恩
克雷斯俊 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO (CR)；
華德豪爾 櫻加 WALDHAUER, INJA (DE)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：35 項 圖式數：5 共 147 頁

(54) 名稱

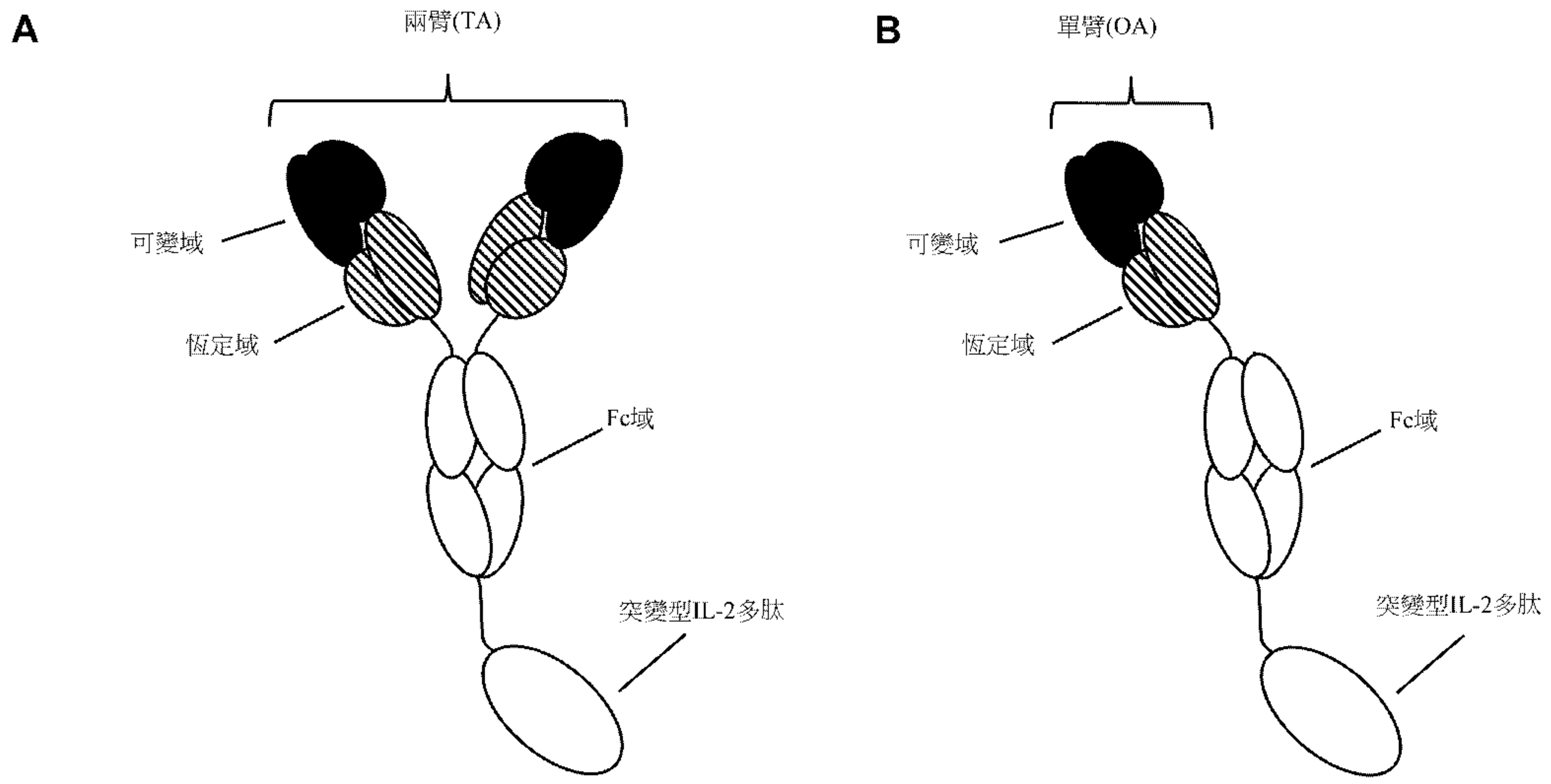
免疫結合物

(57) 摘要

本發明大體上係關於免疫結合物，特定言之包含突變型介白素-2 多肽及與 CD8 結合之抗體的免疫結合物。另外，本發明係關於編碼該等免疫結合物之聚核苷酸分子，以及包含此類聚核苷酸分子之載體及宿主細胞。本發明另外係關於產生該等突變型免疫結合物之方法、包含其之醫藥組合物及其用途。

The present invention generally relates to immunoconjugates, particularly immunoconjugates comprising a mutant interleukin-2 polypeptide and an antibody that binds to CD8. In addition, the invention relates to polynucleotide molecules encoding the immunoconjugates, and vectors and host cells comprising such polynucleotide molecules. The invention further relates to methods for producing the mutant immunoconjugates, pharmaceutical compositions comprising the same, and uses thereof.

指定代表圖：



【圖1】



202115115

【發明摘要】**【中文發明名稱】**

免疫結合物

【英文發明名稱】

IMMUNOCONJUGATES

【中文】

本發明大體上係關於免疫結合物，特定言之包含突變型介白素-2多肽及與CD8結合之抗體的免疫結合物。另外，本發明係關於編碼該等免疫結合物之聚核苷酸分子，以及包含此類聚核苷酸分子之載體及宿主細胞。本發明另外係關於產生該等突變型免疫結合物之方法、包含其之醫藥組合物及其用途。

【英文】

The present invention generally relates to immunoconjugates, particularly immunoconjugates comprising a mutant interleukin-2 polypeptide and an antibody that binds to CD8. In addition, the invention relates to polynucleotide molecules encoding the immunoconjugates, and vectors and host cells comprising such polynucleotide molecules. The invention further relates to methods for producing the mutant immunoconjugates, pharmaceutical compositions comprising the same, and uses thereof.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

免疫結合物

【英文發明名稱】

IMMUNOCONJUGATES

【技術領域】

【0001】 本發明大體上係關於免疫結合物，特定言之包含突變型介白素-2多肽及與CD8結合之抗體之免疫結合物，該等免疫結合物僅對於CD8⁺細胞具有強力順式-靶向效果。另外，本發明係關於編碼該等免疫結合物之聚核苷酸分子，以及包含此類聚核苷酸分子之載體及宿主細胞。本發明另外係關於產生該等突變型免疫結合物之方法、包含其之醫藥組合物及其用途。

【先前技術】

【0002】 介白素-2 (IL-2)，亦稱為T細胞生長因子(TCGF)，為15.5 kDa球形糖蛋白，其在淋巴球產生、存活及穩態方面起關鍵作用。其具有133個胺基酸之長度且由形成其功能必不可少之四級結構之四個反平行兩性 α 螺旋組成(Smith, Science 240, 1169-76 (1988); Bazan, Science 257, 410-413 (1992))。來自不同物種之IL-2之序列發現於NCBI RefSeq編號NP000577 (人類)、NP032392 (小鼠)、NP446288 (大鼠)或NP517425 (黑猩猩)。

【0003】 IL-2藉由與IL-2受體(IL-2R)結合來介導其作用，該等受體由至多三個個別次單元組成，其不同的結合可產生對於IL-2之親和力不同的受體形式。 α (CD25)、 β (CD122)及 γ (γ_c , CD132)次單元之結合產生IL-

2的高親和力三聚合受體。由 β 及 γ 次單元組成之二聚合IL-2受體稱為中等親和力IL-2R。 α 次單元形成低親和力單體IL-2受體。雖然中等親和力的二聚合IL-2受體結合IL-2的親和力比高親和力三聚合受體低約100倍，但二聚合與三聚合IL-2受體變體均能夠在IL-2結合後傳輸信號(Minami等人, *Annu Rev Immunol* 11, 245-268 (1993))。因此， α 次單元CD25對於IL-2信號傳導不係必要的。其賦予對於其受體之高親和力結合，儘管 β 次單元CD122及 γ 次單元對於信號轉導為關鍵的(Krieg等人, *Proc Natl Acad Sci* 107, 11906-11 (2010))。三聚合IL-2受體(包括CD25)由(靜息) CD4⁺叉頭框P3 (FoxP3)⁺調節T (T_{reg})細胞表現。其亦短暫誘導於習知活化T細胞上，而此等細胞在靜息狀態下僅表現二聚合IL-2受體。T_{reg}細胞在活體內始終最高量地表現CD25 (Fontenot等人, *Nature Immunol* 6, 1142-51 (2005))。

【0004】 IL-2主要由活化T細胞(特定而言，CD4⁺輔助T細胞)合成。其刺激T細胞增殖及分化，誘導細胞毒性T淋巴球(CTL)產生及周邊血液淋巴球分化成細胞毒性細胞及淋巴介質活化殺手(LAK)細胞，促進T細胞表現細胞介素及溶細胞分子，促進B細胞增殖及分化以及B細胞合成免疫球蛋白，且刺激自然殺手(NK)細胞產生、增殖及活化(綜述於例如 Waldmann, *Nat Rev Immunol* 6, 595-601 (2009)；Olejniczak 及 Kasprzak, *Med Sci Monit* 14, RA179-89 (2008)；Malek, *Annu Rev Immunol* 26, 453-79 (2008)中)。

【0005】 其使淋巴球群體在活體內擴增及增強此等細胞效應子功能的能力賦予IL-2抗腫瘤作用，使得IL-2免疫療法成為某些轉移性癌症之吸引人的治療選項。因此，高劑量IL-2療法已批准用於患有轉移性腎細胞癌

及惡性黑素瘤的患者。

【0006】 然而，IL-2在免疫反應方面具有雙重功能：其不僅介導效應子細胞之擴增及活性，而且主要涉及周邊免疫耐受性的維持。

【0007】 周邊自身耐受性所依據的主要機制為IL-2誘導的T細胞中之活化誘導式細胞死亡(AICD)。AICD為一種過程，完全活化的T細胞藉此過程經由與細胞表面表現的死亡受體(諸如CD95 (亦稱為Fas)或TNF受體)接合而經歷程式化細胞死亡。當在增殖期間表現高親和力IL-2受體(預先暴露於IL-2之後)的抗原活化T細胞用抗原，經由T細胞受體(TCR)/CD3複合物再刺激時，誘導Fas配體(FasL)及/或腫瘤壞死因子(TNF)之表現，使得該等細胞容易發生Fas介導的細胞凋亡。此過程為IL-2依賴性的(Lenardo, Nature 353, 858-61 (1991))且經由STAT5介導。藉由T淋巴球中之AICD過程，可不僅建立對於自身抗原之耐受性且亦建立對於持久性抗原之耐受性，該等持久性抗原明確地不為宿主組成之一部分，諸如腫瘤抗原。

【0008】 此外，IL-2亦涉及周邊CD4⁺ CD25⁺調節T (T_{reg})細胞的維持(Fontenot等人, Nature Immunol 6, 1142-51 (2005)；D'Cruz及Klein, Nature Immunol 6, 1152-59 (2005)；Maloy及Powrie, Nature Immunol 6, 1171-72 (2005)，其亦稱為抑制T細胞。其經由細胞-細胞接觸，藉由抑制T細胞幫助及活化，或經由免疫抑制細胞介素(諸如IL-10或TGF-β)的釋放來抑制效應子T細胞摧毀其(自身)目標。已顯示T_{reg}細胞的耗竭可增強IL-2誘導的抗腫瘤免疫力(Imai等人, Cancer Sci 98, 416-23 (2007))。

【0009】 因此，IL-2並非抑制腫瘤生長之最佳選項，原因係在IL-2存在下，所產生的CTL可能會將腫瘤識別為自身且經歷AICD，或IL-2依

賴性T_{reg}細胞可能會抑制免疫反應。

【0010】 關於IL-2免疫療法的另一個擔憂為重組人類IL-2治療所產生的副作用。接受高劑量IL-2治療的患者頻繁地經歷嚴重的心血管、肺、腎、肝、胃腸、神經、皮膚、血液及全身不良事件，此需要密集的監測及住院管理。此等副作用中的大部分可以解釋為：所謂血管(或毛細管)滲漏症候群(VLS)的發展；血管滲透性方面之病理性增強，引起多種器官之體液外滲(導致例如肺及皮膚水腫及肝臟細胞損傷)及血管內體液耗竭(導致血壓下降及心率補償性增加)。除停藥IL-2之外，不存在VLS之治療。為了避免VLS，已在患者中測試低劑量IL-2方案，然而以次最佳的治療結果為代價。咸信VLS係由促炎性細胞介素的釋放引起，諸如IL-2活化的NK細胞釋放腫瘤壞死因子(TNF)- α ，然而最近已表明，IL-2誘發的肺水腫起因於IL-2直接與肺內皮細胞結合，該等肺內皮細胞表現低至中等水準之功能性 $\alpha\beta\gamma$ IL-2受體(Krieg等人, Proc Nat Acad Sci USA 107, 11906-11 (2010))。

【0011】 已採取若干方法來克服與IL-2免疫療法相關的此等問題。舉例而言，已發現IL-2與某些抗IL-2單株抗體的組合使IL-2的活體內治療效果增強(Kamimura等人, J Immunol 177, 306-14 (2006)；Boyman等人, Science 311, 1924-27 (2006))。在一替代方法中，IL-2已以各種方式突變，以減少其毒性且/或增強其功效。Hu等人(Blood 101, 4853-4861 (2003)；美國專利公開案第2003/0124678號)已用色胺酸取代IL-2之位置38處的精胺酸殘基，以消除IL-2的血管通透活性。Shanafelt等人(Nature Biotechnol 18, 1197-1202 (2000))已使天冬醯胺88突變為精胺酸，以增強相對於NK細胞對T細胞的選擇性。Heaton等人(Cancer Res 53, 2597-602

(1993)；美國專利第5,229,109號)已引入兩種突變Arg38Ala及Phe42Lys，以減少NK細胞分泌促炎性細胞介素。Gillies等人(美國專利公開案第2007/0036752號)已取代IL-2中之三個殘基(Asp20Thr、Asn88Arg及Gln126Asp)，其有助於針對中等親和力IL-2受體的親和力，從而減輕VLS。Gillies等人(WO 2008/0034473)亦已藉由胺基酸取代Arg38Trp及Phe42Lys而使IL-2與CD25之界面發生突變，以減少與CD25之相互作用及T_{reg}細胞活化，從而增強功效。為了相同目的，Wittrup等人(WO 2009/061853)已產生IL-2突變體，其對CD25的親和力增強，但不活化該受體，從而充當拮抗劑。所引入的突變旨在中斷與受體之β-次單元及/或γ-次單元的相互作用。

【0012】 WO 2012/107417中描述了一種特定的突變型IL-2多肽，其設計成克服與IL-2免疫療法相關的上文所提及之問題(VLS誘導所引起的毒性、AICD誘導所引起的腫瘤耐受性，及T_{reg}細胞活化所引起的免疫抑制)。IL-2之位置42處的苯丙胺酸殘基經丙胺酸取代、位置45處的酪胺酸殘基經丙胺酸取代及位置72處的白胺酸殘基經甘胺酸取代基本上消除了此突變型IL-2多肽與IL-2受體之α-次單元(CD25)的結合。

【0013】 另外關於上文所提及之方法，IL-2免疫療法可藉由選擇性地將IL-2靶向腫瘤來改良，例如呈包含與腫瘤細胞上表現之抗原結合之抗體的免疫結合物形式。已描述若干種此類免疫結合物(參見例如Ko等人, *J Immunother* (2004) 27, 232-239；Klein等人, *Oncoimmunology* (2017) 6(3), e1277306)。

【0014】 然而，腫瘤可以藉由使抗體之目標抗原排出、突變或下調而能夠逃避此類靶向。此外，靶向腫瘤的IL-2與主動排除淋巴球的腫瘤微

環境中的效應子細胞(諸如細胞毒性T淋巴球(CTL))可能不會達成最佳的接觸。

【0015】 因此，仍需要進一步改良IL-2免疫療法。可以避開腫瘤靶向問題的一種方法為使IL-2直接靶向效應子細胞，特定而言，CTL。

【0016】 Ghasemi等人已描述IL-2與NKG2D結合蛋白之融合蛋白(Ghashemi等人, Nat Comm (2016) 7, 12878)，其用於使IL-2靶向攜帶NKG2D的細胞，諸如自然殺手(NK)細胞。

【0017】 腫瘤組織中之免疫細胞之數目、類型及空間分佈之特徵可提供關於癌症診斷、預後、療法選擇及療法反應之關鍵資訊。具體言之，CD8⁺細胞毒性淋巴球已始終報導為在各種癌症中具有診斷性及預後意義。與CD8結合之抗體描述於例如WO 2019/033043 A2中。

【發明內容】

【0018】 本發明提供一種使具有免疫療法有利特性之突變型IL-2直接靶向免疫效應子細胞(諸如細胞毒性T淋巴球)而非腫瘤細胞的新穎方法。靶向免疫效應子細胞藉由突變型IL-2分子與同CD8結合之抗體結合來達成。

【0019】 本發明中所用之IL-2突變體已設計成克服與IL-2免疫療法相關的問題，特定而言，誘導VLS所引起的毒性、誘導AICD所引起的腫瘤耐受性，及活化T_{reg}細胞所引起的免疫抑制。除防止腫瘤躲避如上文所提及的腫瘤靶向之外，IL-2突變體靶向免疫效應子細胞可進一步增強相對於免疫抑制性T_{reg}細胞，對CTL的優先活化。如本文所揭示之與CD8結合之抗體對於CD8⁺細胞具有強力順式-靶向效果。因此，其不干擾T細胞抗原受體(TCR)與肽結合的主要組織相容複合物(pMHC)之相互作用。就此

而言，抗體為非功能性的。

【0020】 在一第一態樣中，本發明提供一種免疫結合物，其包含突變型介白素-2 (IL-2)多肽及與CD8結合之抗體，其中該IL-2多肽為包含胺基酸取代F42A、Y45A及L72G (相對於人類IL-2序列SEQ ID NO: 13編號)之突變型IL-2多肽。

【0021】 在另一態樣中，本發明提供一種免疫結合物，其包含突變型介白素-2 (IL-2)多肽及與CD8結合之抗體，其中該突變型IL-2多肽為包含胺基酸取代F42A、Y45A及L72G (相對於人類IL-2序列SEQ ID NO: 13編號)之人類IL-2分子；且其中該抗體包含：(a)重鏈可變區(VH)，其包含含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列的重鏈互補決定區(HCDR) 1、含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的HCDR 2、含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的HCDR 3；及(b)輕鏈可變區(VL)，其包含含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的輕鏈互補決定區(LCDR) 1、含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列的LCDR 2及含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 28之胺基酸序列的LCDR 3。

【0022】 在另一態樣中，本發明提供一種免疫結合物，其包含突變型介白素-2 (IL-2)多肽及與CD8結合之抗體，其中該突變型IL-2多肽為包含胺基酸取代F42A、Y45A及L72G (相對於人類IL-2序列SEQ ID NO: 13編號)之人類IL-2分子；且其中該抗體包含：(a)重鏈可變區(VH)，其包含與SEQ ID NO: 7之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列；及(b)輕鏈可變區(VL)，其包含與SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 29之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。

【0023】 在本發明之免疫結合物之一些實施例中，突變型IL-2多肽

進一步包含胺基酸取代T3A及/或胺基酸取代C125A。

【0024】 在一些實施例中，突變型IL-2多肽包含SEQ ID NO: 14之序列。

【0025】 在一些實施例中，免疫結合物包含不多於一種突變型IL-2多肽。在一些此類實施例中，抗體包含由第一次單元及第二次單元構成的Fc域。在一些此類實施例中，Fc域為IgG類，尤其IgG1子類Fc域，且/或Fc域為人類Fc域。在一些實施例中，抗體為IgG類，尤其IgG1子類免疫球蛋白。

【0026】 在一些實施例中，其中免疫結合物包含Fc域，Fc域包含促進該Fc域之第一次單元與第二次單元結合的修飾。在一些實施例中，在Fc域之第一次單元之CH3域中，胺基酸殘基經具有較大側鏈體積的胺基酸殘基置換，藉此在第一次單元之CH3域內產生可定位於第二次單元之CH3域內之空腔中的隆凸，且在Fc域之第二次單元之CH3域中，胺基酸殘基經具有較小側鏈體積的胺基酸殘基置換，藉此在第二次單元之CH3域內產生可供第一次單元之CH3域內之隆凸可定位於其中的空腔。在一些實施例中，在Fc域之第一次單元中，位置366處之蘇胺酸殘基經色胺酸殘基置換(T366W)，且在Fc域之第二次單元中，位置407處的酪胺酸殘基經纈胺酸殘基置換(Y407V)，且視情況位置366處之蘇胺酸殘基經絲胺酸殘基置換(T366S)且位置368處之白胺酸殘基經丙胺酸殘基置換(L368A) (根據Kabat EU索引編號)。在一些此類實施例中，在Fc域之第一次單元中，另外，位置354處之絲胺酸殘基經半胱胺酸殘基(S354C)置換或位置356之麩胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(E356C)，且在Fc域之第二次單元中，另外，位置349處之酪胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(Y349C) (根據Kabat

EU索引編號)。在一些實施例中，突變型IL-2多肽在其胺基端胺基酸處與Fc域之次單元之一(特定言之，Fc域之第一次單元)之羧基端胺基酸融合，視情況經由連接肽融合。在一些此等實施例中，連接肽具有SEQ ID NO: 15之胺基酸序列。

【0027】 在一些實施例中，其中免疫結合物包含Fc域，Fc域包含減少與Fc受體(特定言之Fcy受體)結合及/或效應子功能(特定言之抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)之一或多種胺基酸取代。在一些此類實施例中，該一或多種胺基酸取代係位於選自L234、L235及P329之群的一或多個位置(Kabat EU索引編號)處。在一些實施例中，Fc域中之各次單元包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G (Kabat EU索引編號)。

【0028】 在根據本發明之一些實施例中，免疫結合物包含：多肽，其包含與SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:30之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列；多肽，其包含與SEQ ID NO:10之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列；及多肽，其包含與SEQ ID NO:11或SEQ ID NO: 12之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。

【0029】 在一些實施例中，免疫結合物包含：多肽，其包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:29之胺基酸序列；多肽，其包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列；及多肽，其包含SEQ ID NO:11之胺基酸序列。

【0030】 在一些實施例中，免疫結合物包含：多肽，其包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:29之胺基酸序列；多肽，其包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列；及多肽，其包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列。

【0031】 在一些實施例中，免疫結合物基本上由突變型IL-2多肽及IgG1免疫球蛋白分子藉由連接子序列接合而組成。

【0032】 本發明進一步提供一或多種編碼如本文中所描述之本發明之免疫結合物的經分離之聚核苷酸、一或多種包含該聚核苷酸的載體(特定言之表現載體)及包含該聚核苷酸或該載體的宿主細胞。

【0033】 亦提供一種產生包含突變型IL-2多肽及與CD8結合之抗體之免疫結合物的方法，該方法包含(a)在適合於表現該免疫結合物之條件下培養本發明的宿主細胞，及視情況(b)回收該免疫結合物。本發明亦提供一種藉由該方法產生之免疫結合物，其包含突變型IL-2多肽及與CD8結合之抗體。

【0034】 本發明進一步提供一種醫藥組合物，其包含本發明之免疫結合物及醫藥學上可接受之載劑；及使用本發明之免疫結合物的方法。

【0035】 特定言之，本發明涵蓋根據本發明的免疫結合物，其用作藥劑，及用於治療疾病。在一特定實施例中，該疾病為癌症。

【0036】 本發明亦涵蓋一種根據本發明之免疫結合物之用途，其用於製造用於治療疾病之藥劑。在一特定實施例中，該疾病為癌症。

【0037】 進一步提供一種治療個體之疾病之方法，其包含向該個體投與治療有效量之呈醫藥學上可接受之形式之包含根據本發明之免疫結合物的組合物。在一特定實施例中，該疾病為癌症。

【0038】 進一步提供一種刺激個體之免疫系統之方法，其包含向該個體投與有效量之呈醫藥學上可接受之形式之包含根據本發明之免疫結合物的組合物。

【圖式簡單說明】

【0039】 圖1A及圖1B.包含突變型IL-2多肽之IgG-IL-2免疫結合物型式的示意表示。(圖1A)兩臂抗CD8；(圖2A)單臂抗CD8。

【0040】 圖2.藉由流式細胞測量術來測定與抗FAP-IL2v (FAP-IL2v)同靜息PBMC內之CD8 T細胞之結合相比，兩臂抗CD8-IL2v (CD8-IL2v TA)及單臂抗CD8-IL2v (CD8-IL2v OA)與CD8 T細胞之結合。用經螢光標記之抗人類Fc特異性二級抗體偵測分子。使用PBMC之CD3及CD8染色來鑑別CD8 T細胞。

【0041】 圖3A、圖3B、圖3C及圖3D.藉由流式細胞測量術來測定在用CD8-IL2v TA、CD8-IL2v OA及FAP-IL2v處理靜息PBMC後，CD8 T細胞(圖3A)、CD4 T細胞(圖3C)、調節T細胞(圖3D)及NK細胞(圖3D)中之STAT5磷酸化。

【0042】 圖4A、圖4B及圖4C.藉由流式細胞測量術來測定用CD8-IL2v TA、CD8-IL2v OA及FAP-IL2v之PBMC中之NK細胞(圖4C)、CD4 T細胞(圖4B)及CD8 T細胞(圖4C)的增殖。

【0043】 圖5A、圖5B、圖5C及圖5D.藉由流式細胞測量術來測定在用CD8-IL2v TA、CD8-IL2v OKT8.v11 TA及FAP-IL2v處理靜息PBMC後，CD8 T細胞(圖5A)、NK細胞(圖5B)、CD4 T細胞(圖5C)及調節T細胞(圖5D)中之STAT5磷酸化。

【實施方式】

【0044】

定義

除非下文中另外定義，否則術語在本文中的使用如此項技術中一般所用。

【0045】 除非另外指示，否則如本文所用，術語「介白素-2」或「IL-2」係指來自任何脊椎動物來源，包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)及啮齒動物(例如小鼠及大鼠)之任何原生IL-2。該術語涵蓋未加工之IL-2以及由細胞中進行之加工產生的IL-2之任何形式。該術語亦涵蓋天然存在之IL-2變體，例如剪接變體或等位基因變體。例示性人類IL-2之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 13中。未加工之人類IL-2另外包含具有SEQ ID NO: 19之序列之N端20胺基酸信號肽，其不存在於成熟IL-2分子中。

【0046】 如本文所用，術語「IL-2突變體」或「突變型IL-2多肽」意欲涵蓋各種形式之IL-2分子的任何突變型，包括全長IL-2、截斷的IL-2形式及其中IL-2藉由融合或化學結合與另一分子連接的形式。「全長」當關於IL-2使用時，意欲意謂成熟、天然長度的IL-2分子。舉例而言，全長人類IL-2係指一種具有133個胺基酸的分子(參見例如SEQ ID NO: 13)。IL-2突變體之各種形式之特徵在於具有影響IL-2與CD25相互作用的至少一種胺基酸突變。此突變可能涉及通常位於該位置處之野生型胺基酸殘基的取代、缺失、截斷或修飾。較佳為藉由胺基酸取代獲得的突變體。除非另外指示，否則IL-2突變體在本文中可稱作突變型IL-2肽序列、突變型IL-2多肽、突變型IL-2蛋白或突變型IL-2類似物。

【0047】 各種形式之IL-2在本文中根據SEQ ID NO: 13中所顯示的序列標示。本文中可以使用不同名稱指示相同突變。舉例而言，位置42處之苯丙胺酸突變為丙胺酸可以用42A、A42、A₄₂、F42A或Phe42Ala表示。

【0048】 如本文所用，「人類IL-2分子」意謂包含與SEQ ID NO: 13

之人類IL-2序列至少約90%、至少約91%、至少約92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%或至少約96%一致之胺基酸序列的IL-2分子。特定言之，序列一致性為至少約95%，更特定言之至少約96%。在特定實施例中，人類IL-2分子為全長IL-2分子。

【0049】 如本文所用，術語「胺基酸突變」意欲涵蓋胺基酸取代、缺失、插入及修飾。可產生取代、缺失、插入及修飾之任何組合以獲得最終構築體，其限制條件為該最終構築體擁有所需特徵，例如與CD25結合減少。胺基酸序列缺失及插入包括胺基酸之胺基端及/或羧基端缺失及插入。末端缺失之一實例為缺失全長人類IL-2之位置1中之丙胺酸殘基。較佳胺基酸突變為胺基酸取代。出於改變例如IL-2多肽之結合特徵之目的，非保守胺基酸取代，亦即一個胺基酸用具有不同結構及/或化學特性之另一胺基酸置換為尤其較佳的。較佳胺基酸取代包括親水性胺基酸置換疏水性胺基酸。胺基酸取代包括經非天然存在之胺基酸置換或經二十種標準胺基酸之天然存在之胺基酸衍生物(例如4-羥基脯胺酸、3-甲基組胺酸、鳥胺酸、高絲胺酸、5-羥基離胺酸)置換。胺基酸突變可使用此項技術中熟知之遺傳學或化學方法產生。遺傳學方法可包括定點突變誘發、PCR、基因合成及其類似方法。經考慮，藉由除遺傳學工程改造之外的方法(諸如化學修飾)改變胺基酸側鏈基團的方法亦可為適用的。

【0050】 如本文所用，IL-2之「野生型」形式為IL-2之一種形式，其在其他方面與突變型IL-2多肽相同，但不同之處在於該野生型形式在突變型IL-2多肽之各胺基酸位置處具有野生型胺基酸。舉例而言，若IL-2突變體為全長IL-2 (亦即，IL-2不與任何其他分子融合或結合)，則此突變體之野生型形式為全長原生IL-2。若IL-2突變體為IL-2與IL-2下游所編碼的

另一多肽(例如抗體鏈)之間的融合物，則此IL-2突變體之野生型形式為具有野生型胺基酸序列的IL-2，其與相同的下游多肽融合。此外，若IL-2突變體為IL-2之截斷形式(IL-2之未截斷部分內的突變或經修飾序列)，則此IL-2突變體之野生型形式為具有野生型序列的類似截斷之IL-2。出於比較IL-2突變體之各種形式與IL-2之對應野生型形式之IL-2受體的結合親和力或生物活性之目的，術語野生型涵蓋相較於天然存在之原生IL-2包含不影響IL-2受體結合之一或多種胺基酸突變的IL-2形式，諸如對應於人類IL-2之殘基125之位置處的半胱胺酸經丙胺酸取代。在一些實施例中，用於本發明目的之野生型IL-2包含胺基酸取代C125A (參見SEQ ID NO: 20)。在根據本發明之某些實施例中，與突變型IL-2多肽比較之野生型IL-2多肽包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列。在其他實施例中，與突變型IL-2多肽比較之野生型IL-2多肽包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列。

【0051】 除非另外指示，否則如本文所用，術語「CD25」或「IL-2受體之 α -次單元」係指來自任何脊椎動物來源(包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類)及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠))之任何原生CD25。該術語涵蓋「全長」、未加工之CD25以及在細胞中加工而產生之CD25之任何形式。該術語亦涵蓋天然存在之CD25變體，例如剪接變體或等位基因變體。在某些實施例中，CD25為人類CD25。人類CD25之胺基酸序列發現於例如UniProt登錄號P01589 (型式185)中。

【0052】 如本文所用，術語「高親和力IL-2受體」係指由以下組成之IL-2受體之雜三聚形式：受體 γ -次單元(亦稱為共同細胞介素受體 γ -次單元、 γ_c 或CD132，參見UniProt登錄號P14784 (型式192))、受體 β -次單元(亦稱為CD122或p70，參見UniProt登錄號P31785 (型式197))及受體 α -次

單元(亦稱為CD25或p55，參見UniProt登錄號P01589 (型式185))。相比之下，術語「中等親和力IL-2受體」係指僅包括 γ -次單元及 β -次單元而無 α -次單元的IL-2受體(對於綜述，參見例如Olejniczak及Kasprzak, *Med Sci Monit* 14, RA179-189 (2008))。

【0053】 「親和力」係指分子(例如受體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如配體)之間的非共價相互作用力的總和。除非另外指明，否則如本文所用，「結合親和力」係指反映結合對成員(例如抗原結合部分與抗原，或受體與其配體)之間的1:1相互作用的固有結合親和力。分子X針對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(K_D)表示，該解離常數為解離速率常數與結合速率常數(分別為 k_{off} 及 k_{on})之比率。因此，等效親和力可包含不同速率常數，只要速率常數之比率保持相同即可。親和力可藉由此項技術中已知的沿用已久的方法量測，包括本文所描述之方法。一種用於量測親和力的特定方法為表面電漿子共振(SPR)。

【0054】 突變型或野生型IL-2多肽針對各種形式之IL-2受體的親和力可以根據WO 2012/107417中所闡述之方法，藉由表面電漿子共振(SPR)，使用標準儀器(諸如BIAcore儀(GE Healthcare))測定，且諸如受體次單元可以藉由重組表現獲得(參見例如Shanafelt等人, *Nature Biotechnol* 18, 1197-1202 (2000))。替代地，IL-2突變體針對不同形式之IL-2受體的結合親和力可使用已知表現一種或其他此類形式之受體的細胞株評價。量測結合親和力之特定說明性及例示性實施例描述於下文中。

【0055】 「調節T細胞」或「 T_{reg} 細胞」意謂一種特定類型的 $CD4^+$ T細胞，其可以抑制其他T細胞之反應。 T_{reg} 細胞之特徵在於表現IL-2受體之 α -次單元(CD25)及轉錄因子叉頭框P3 (FOXP3) (Sakaguchi, *Annu Rev*

Immunol 22, 531-62 (2004))且在誘導及維持針對抗原(包括腫瘤所表現的抗原)的周邊自身耐受性方面起關鍵作用。 T_{reg} 細胞需要IL-2來實現其功能及其抑制特徵之產生及誘導。

【0056】 如本文所用，術語「效應子細胞」係指介導IL-2細胞毒性作用之淋巴球群體。效應子細胞包括效應子T細胞，諸如CD8⁺細胞毒性T細胞、NK細胞、淋巴介質活化殺手(LAK)細胞及巨噬細胞/單核球。

【0057】 「特異性結合」意謂結合對於抗原而言具選擇性且可與非所需或非特異性相互作用區分。抗原與特定抗原(例如CD8)結合之能力可經由酶聯結免疫吸附分析(ELISA)或熟習此項技術者熟悉之其他技術，例如表面電漿子共振(SPR)技術(例如在BIAcore儀上分析) (Liljeblad等人, Glyco J 17, 323-329 (2000))及傳統結合分析(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))量測。在一個實施例中，抗體與無關蛋白質結合之程度小於該抗體與抗原之結合的約10%，如藉由例如SPR所量測。包含於本文中所描述之免疫結合物中之抗體與CD8特異性結合。

【0058】 如本文所用，術語「多肽」係指由單體(胺基酸)經醯胺鍵(亦稱為肽鍵)線性連接而構成之分子。術語「多肽」係指兩個或更多個胺基酸之任何鏈，且並非指產物之特定長度。因此，「多肽」之定義內包括肽、二肽、三肽、寡肽、「蛋白質」、「胺基酸鏈」或用於指兩個或更多個胺基酸之鏈的任何其他術語且可使用術語「多肽」替代此等術語中之任一者，或術語「多肽」可與此等術語中之任一者互換使用。術語「多肽」亦意指多肽之表現後修飾產物，包括(但不限於)醮基化、乙醮化、磷酸化、醮胺化、藉由已知保護/封端基團衍生化、蛋白質裂解或藉由非天然存在之胺基酸修飾。多肽可衍生自天然生物來源或藉由重組技術製得，但不一

定自指定的核酸序列轉譯而成。其可以任何方式產生，包括藉由化學合成。多肽可具有定義的三維結構，但其不必定具有此類結構。具有定義之三維結構的多肽稱為摺疊的，且不具有定義之三維結構而是可採用許多不同構形的多肽稱為未摺疊的。

【0059】 「經分離」之多肽或其變體或衍生物意指不處於其天然環境下的多肽。不需要特定的純化水準。舉例而言，經分離之多肽可自其原生或天然環境中移出。出於本發明之目的，宿主細胞中所表現之重組產生型多肽及蛋白質被視為經分離的，已藉由任何合適技術分離、分級分離或部分或實質上純化的原生或重組多肽亦視為經分離。

【0060】 相對於參考多肽序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對參考多肽序列與候選序列且必要時引入間隙以達成最大序列一致性百分比之後，且在不將任何保守取代視為序列一致性之一部分的情況下，候選序列中與參考多肽序列中之胺基酸殘基一致的胺基酸殘基之百分比。出於測定胺基酸序列一致性百分比之目的之比對可以此項技術中之技能範圍內的各種方式達成，例如使用公開可獲得的電腦軟體，諸如 **BLAST**、**BLAST-2**、**Clustal W**、**Megalign (DNASTAR)**軟體或**FASTA**程式包。熟習此項技術者可測定用於比對序列之適當參數，包括在所比較序列之全長內達成最大比對所需的任何演算法。然而，出於本文之目的，胺基酸序列一致性%值係使用**FASTA**套裝36.3.8c版或更近版中之**ggsearch**程式，用**BLOSUM50**比較矩陣來產生。**FASTA**套裝程式的作者為**W. R. Pearson** 及 **D. J. Lipman (1988)**, 「Improved Tools for Biological Sequence Analysis」, **PNAS 85:2444-2448** ; **W. R. Pearson (1996)** 「Effective protein sequence comparison」 **Meth. Enzymol. 266:227-**

258 ; 及 Pearson 等人 (1997) *Genomics* 46:24-36 , 且公開可獲自 http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml 。可替代地, 可使用在 http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi 可存取的公共伺服器來比較序列, 使用 *ggsearch* (全域蛋白質:蛋白質)程式及預設選項(BLOSUM50 ; 開端 : -10 ; ext : -2 ; Ktup = 2)以確保進行全域比對而非局域比對。胺基酸一致性百分比在輸出比對標題中給出。

【0061】 術語「聚核苷酸」係指經分離之核酸分子或構築體, 例如信使RNA (mRNA)、病毒源性RNA或質體DNA (pDNA)。聚核苷酸可包含習知磷酸二酯鍵或非習知鍵(例如醯胺鍵, 諸如肽核酸(PNA)中所發現)。術語「核酸分子」係指聚核苷酸中存在之任一或多個核酸區段, 例如DNA或RNA片段。

【0062】 「經分離」之核酸分子或聚核苷酸意欲為已自原生環境中移除之核酸分子、DNA或RNA。舉例而言, 出於本發明之目的, 編碼載體中所含之多肽的重組聚核苷酸視為經分離的。經分離之聚核苷酸之其他實例包括異源宿主細胞中所維持之重組聚核苷酸或溶液中經純化(部分或實質上)之聚核苷酸。經分離之聚核苷酸包括通常含有聚核苷酸分子之細胞中所含的聚核苷酸分子, 但聚核苷酸分子存在於染色體外或與其天然染色體位置不同之染色體位置處。經分離之RNA分子包括本發明之活體內或活體外RNA轉錄物, 以及正股及負股形式, 及雙股形式。本發明之經分離之聚核苷酸或核酸進一步包括合成方式產生的此類分子。另外, 聚核苷酸或核酸可為或可包括調節元件, 諸如啟動子、核糖體結合位點或轉錄終止子。

【0063】 「編碼[例如本發明之免疫結合物]之經分離之聚核苷酸(或

核酸)」係指編碼抗體重鏈及輕鏈及/或IL-2多肽(或其片段)的一或多種聚核苷酸分子，包括單一載體或單獨載體中的此類聚核苷酸分子，及存在於宿主細胞中之一或多個位置處的此類核酸分子。

【0064】 術語「表現卡匣」係指以重組或合成方式產生之聚核苷酸，其具有容許特定核酸在目標細胞中發生轉錄的一系列特定核酸元件。重組表現卡匣可併入至質體、染色體、粒線體DNA、質體DNA、病毒或核酸片段中。通常，表現載體之重組表現卡匣部分包括待轉錄之核酸序列及啟動子，以及其他序列。在某些實施例中，表現卡匣包含編碼本發明之免疫結合物或其片段的聚核苷酸序列。

【0065】 術語「載體」或「表現載體」係指用於引入特定基因且導引該特定基因之表現的DNA分子，該DNA分子在細胞中與該特定基因可操作地結合。該術語包括呈自我複製核酸結構之載體以及併入其已引入至之宿主細胞之基因體中的載體。本發明之表現載體包含表現卡匣。表現載體允許大量的穩定mRNA發生轉錄。一旦表現載體進入目標細胞內，則藉由細胞轉錄及/或轉譯機構產生由該基因編碼的核糖核酸分子或蛋白質。在一個實施例中，本發明之表現載體包含含有聚核苷酸序列的表現卡匣，該等聚核苷酸序列編碼本發明之免疫結合物或其片段。

【0066】 術語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及「宿主細胞培養物」可互換使用，且係指已引入外源核酸之細胞，包括此類細胞之後代。宿主細胞包括「轉化體」及「轉化細胞」，其包括初代轉化細胞及自其衍生之後代(不考慮繼代次數)。後代之核酸含量與親本細胞可能不完全相同，但可能含有突變。本文包括與針對最初轉化細胞所篩選或選擇的具有相同功能或生物活性之突變型後代。宿主細胞為可以用於產生本發明之免疫結合

物的任何類型之細胞系統。宿主細胞包括培養細胞，例如哺乳動物培養細胞，諸如HEK細胞、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髓瘤細胞、P3X63小鼠骨髓瘤細胞、PER細胞、PER.C6細胞或融合瘤細胞、酵母細胞、昆蟲細胞及植物細胞(僅舉數例)，且亦包括轉殖基因動物、轉殖基因植物或培養植物或動物組織內所含的細胞。

【0067】 本文中之術語「抗體」以最廣義意義使用且涵蓋各種抗體結構，包括(但不限於)單株抗體、一價抗體(例如單臂抗體)及抗體片段，只要其呈現所需抗原結合活性(亦即與CD8 ((諸如人類CD8、獼猴CD8及/或恆河猴CD8))結合)即可。

【0068】 如本文所用，術語「單株抗體」係指獲自實質上均質抗體群體的抗體，亦即該群體中所包含之個別抗體相同及/或結合相同抗原決定基，但可能存在變異抗體，例如含有天然存在之突變或在單株抗體製劑產生期間發生的突變以外，此類變體一般以少量存在。相比於典型地包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑，單株抗體製劑中之各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。因此，修飾語「單株」指示抗體之特徵係自實質上均質的抗體群體獲得，且不應視為需要藉由任何特定方法產生該抗體。舉例而言，根據本發明使用之單株抗體可藉由多種技術製得，包括(但不限於)融合瘤方法、重組DNA方法、噬菌體呈現方法及利用含有所有或部分人類免疫球蛋白基因座之轉殖基因動物的方法、本文所描述的製備單株抗體之此類方法及其他例示性方法。

【0069】 「經分離」之抗體為已與其天然環境之組分分離(亦即，不存在於其天然環境中)的抗體。不需要特定的純化水準。舉例而言，經分離之抗體可自其原生或天然環境中移出。出於本發明之目的，宿主細胞中

所表現之重組產生型抗體視為經分離的，已藉由任何適合技術分離、分級分離或部分或實質上純化的天然或重組抗體亦視為經分離的。因而，本發明之免疫結合物為經分離的。在一些實施例中，抗體純化至大於95%或99%之純度，如藉由例如電泳(例如SDS-PAGE、等電聚焦(IEF)、毛細電泳法)或層析(例如離子交換或逆相HPLC)方法所測定。關於用於評定抗體純度之方法的綜述，參見例如Flatman等人, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)。

【0070】 術語「全長抗體」、「完整抗體」及「完全抗體」在本文中可互換使用，其係指具有與原生抗體結構實質上類似之結構的抗體。

【0071】 「抗體片段」係指不同於完整抗體，包含完整抗體之結合完整抗體所結合之抗原之部分的分子。抗體片段之實例包括(但不限於)Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、雙功能抗體、線性抗體、單鏈抗體分子(例如scFv)及單域抗體。關於某些抗體片段之綜述，參見Holliger及Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136 (2005)。關於scFv片段之綜述，參見例如Plückthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷, Rosenberg及Moore編, Springer-Verlag, New York, 第269-315頁 (1994)；亦參見WO 93/16185；及美國專利第5,571,894號及第5,587,458號。關於包含救助受體結合抗原決定基殘基及具有增加之活體內半衰期之Fab及F(ab')₂片段的論述，參見美國專利第5,869,046號。雙功能抗體為其中兩個抗原結合位點可為二價或雙特異性之抗體片段。參見例如EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson等人, *Nat Med* 9, 129-134 (2003)；及Hollinger等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6444-6448 (1993)。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson等人, *Nat Med* 9, 129-

134 (2003)中。單域抗體為包含抗體之重鏈可變域之全部或一部分或輕鏈可變域之全部或一部分的抗體片段。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體(Domantis, Inc., Waltham, MA；參見例如美國專利第6,248,516 B1號)。抗體片段可藉由各種技術製得，包括(但不限於)蛋白分解消化完整抗體以及藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌(*E. coli*)或噬菌體)產生，如本文所描述。

【0072】 術語「免疫球蛋白分子」係指具有天然存在之抗體之結構的蛋白質。舉例而言，IgG類免疫球蛋白為約150,000道爾頓(dalton)之雜四聚體醣蛋白，其由兩條輕鏈及兩條重鏈經二硫鍵鍵結而構成。自N端至C端，各重鏈具有可變域(VH)，亦稱為可變重鏈域或重鏈可變區，之後為三個恆定域(CH1、CH2及CH3)，亦稱為重鏈恆定區。類似地，自N端至C端，各輕鏈具有可變域(VL)，亦稱為可變輕鏈域或輕鏈可變區，之後為恆定輕鏈域(CL)，亦稱為輕鏈恆定區。免疫球蛋白之重鏈可歸為五種類型之一，該五種類型稱為 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG)或 μ (IgM)，其中一些可進一步分成子類型，例如 γ_1 (IgG₁)、 γ_2 (IgG₂)、 γ_3 (IgG₃)、 γ_4 (IgG₄)、 α_1 (IgA₁)及 α_2 (IgA₂)。免疫球蛋白之輕鏈基於其恆定域之胺基酸序列可歸為兩種類型之一，該兩種類型稱為kappa (κ)及lambda (λ)。免疫球蛋白基本上由兩個Fab分子及一個Fc域經由免疫球蛋白鉸鏈區連接而組成。

【0073】 術語「抗原結合域」係指抗體中包含與抗原之一部分或全部特異性結合且與之互補的區域的部分。抗原結合域可由例如一或多個抗體可變域(亦稱為抗體可變區)提供。特定言之，抗原結合域包含抗體輕鏈可變域(VL)及抗體重鏈可變域(VH)。

【0074】術語「可變區」或「可變域」係指抗體重鏈或輕鏈中參與抗體與抗原之結合的域。原生抗體之重鏈及輕鏈(分別為VH及VL)可變域通常具有類似的結構，其中各域包含四個保守性構架區(FR)及三個高變區(HVR)。參看例如Kindt等人, Kuby Immunology, 第6版, W.H. Freeman and Co., 第91頁 (2007)。單個VH或VL域可能足以賦予抗原結合特異性。如本文關於可變區序列所用，「Kabat編號」係指Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版. 公共衛生處(Public Health Service), 美國國家衛生研究院(National Institutes of Health), Bethesda, MD (1991)所闡述之編號系統。

【0075】如本文所用，重鏈及輕鏈之所有恆定區及恆定域中的胺基酸位置均根據Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, 公共衛生處, 美國國家衛生研究院, Bethesda, MD (1991)中所描述之Kabat編號系統編號，在本文中稱為「根據Kabat編號」或「Kabat編號」。具體而言， κ 及 λ 同型之輕鏈恆定域CL使用Kabat編號系統(參見Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版之第647-660頁，公共衛生處，美國國家衛生研究院，Bethesda, MD (1991))且重鏈恆定域(CH1、鉸鏈、CH2及CH3)使用Kabat EU索引編號系統(參見第661-723頁)，在此情況下，在本文中藉由參考「根據Kabat EU索引編號」來進一步闡明。

【0076】如本文所用，術語「高變區」或「HVR」係指抗體可變域中之各區域，其序列高變(「互補決定區」或「CDR」)及/或形成結構上定義之環(「高變環」)及/或含有抗原接觸殘基(「抗原觸點」)。一般而言，抗體包含六個HVR；三個在VH (H1、H2、H3)中，且三個在VL

(L1、L2、L3)中。在本文中，例示性HVR包括：

(a)出現在胺基酸殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3)處之高變環(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987))；

(b)出現在胺基酸殘基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)及95-102 (H3)處之CDR (Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版. 公共衛生處, 美國國家衛生研究院, Bethesda, MD (1991))；

(c)出現在胺基酸殘基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2)及93-101 (H3)處之抗原觸點(MacCallum 等人 *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996))；及

(d) (a)、(b)及/或(c)之組合，包括HVR胺基酸殘基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3)及94-102 (H3)。

【0077】 除非另外指示，否則在本文中，根據Kabat等人之前述文獻對可變域中之HVR殘基及其他殘基(例如FR殘基)進行編號。

【0078】 「構架」或「FR」係指除高變區(HVR)殘基外的可變域殘基。可變域之FR一般由四個FR域組成：FR1、FR2、FR3及FR4。因此，HVR及FR序列一般在VH (或VL)中按以下次序出現：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0079】 「人類化」抗體係指包含來自非人類HVR之胺基酸殘基及來自人類FR之胺基酸殘基之嵌合抗體。在某些實施例中，人類化抗體將包含至少一個且通常兩個可變域之實質上所有，其中所有或實質上所有

HVR (例如CDR)均對應於非人類抗體之HVR，且所有或實質上所有FR均對應於人類抗體之FR。此類可變域在本文中稱為「人類化可變區」。人類化抗體視情況可包含來源於人類抗體之抗體恆定區的至少一部分。在一些實施例中，人類化抗體中之一些FR殘基經來自非人類抗體(例如HVR殘基所來源之抗體)之對應殘基取代以例如恢復或提高抗體特異性或親和力。抗體(例如非人類抗體)之「人類化形式」係指已經受人類化之抗體。本發明涵蓋之「人類化抗體」之其他形式為其中恆定區已經額外修飾或自初始抗體發生變化以產生根據本發明之特性(尤其在C1q結合及/或Fc受體(FcR)結合方面)之抗體。

【0080】 「人類抗體」為胺基酸序列對應於由人類或人類細胞產生或來源於利用人類抗體譜系或其他人類抗體編碼序列之非人類來源之抗體的胺基酸序列之抗體。人類抗體之此定義特別排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。在某些實施例中，人類抗體來源於非人類轉殖基因哺乳動物，例如小鼠、大鼠或兔。在某些實施例中，人類抗體來源於融合瘤細胞株。自人類抗體庫分離之抗體或抗體片段在本文中亦視為人類抗體或人類抗體片段。

【0081】 抗體或免疫球蛋白之「類別」係指其重鏈所具有之恆定域或恆定區的類型。存在五個主要類別之抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等抗體中之若干者可進一步分成子類(同型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同類別之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

【0082】 本文術語「Fc域」或「Fc區」用於定義含有恆定區之至少一部分的免疫球蛋白重鏈之C端區。該術語包括原生序列Fc區及變異Fc

區。雖然IgG重鏈之Fc區的邊界可能稍微變化，但人類IgG重鏈Fc區通常定義為自Cys226或自Pro230延伸至重鏈之羧基端。然而，宿主細胞所產生的抗體可能在重鏈之C端經歷一或多個(特定言之，一或兩個)胺基酸之轉譯後分裂。因此，宿主細胞藉由表現編碼全長重鏈之特定核酸分子而產生的抗體可包括該全長重鏈，或其可包括該全長重鏈的分裂型變體(在本文中亦稱為「分裂型變體重鏈」)。在重鏈之最末兩個C端胺基酸為甘胺酸(G446)及離胺酸(K447，根據Kabat EU索引編號)的情況下，情況可為如此。因此，Fc區之C末端離胺酸(Lys447)或C末端甘胺酸(Gly446)及離胺酸(K447)可能存在或可能不存在。若未另外指示，則包括Fc域(或如本文所定義之Fc域之次單元)之重鏈的胺基酸序列在本文中表示無C端甘胺酸-離胺酸二肽。在本發明之一個實施例中，本發明之免疫結合物中所包含的重鏈(該重鏈包括如本文說明的Fc域之次單元)包含額外C端甘胺酸-離胺酸二肽(G446及K447，根據Kabat EU索引編號)。在本發明的一個實施例中，本發明之免疫結合物中所包含之重鏈(包括如本文中所指定的Fc域之次單元)包含另一個C端甘胺酸殘基(G446，根據Kabat EU索引編號)。本發明之組合物，例如本文所描述之醫藥組合物，包含本發明之免疫結合物之群體。免疫結合物之群體可包含具有全長重鏈的分子及具有分裂型變體重鏈的分子。免疫結合物之群體可由具有全長重鏈之分子與具有分裂型變體重鏈之分子的混合物組成，其中至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的免疫結合物具有分裂型變體重鏈。在本發明的一個實施例中，包含本發明之免疫結合物群體之組合物包含包括如本文中指定之Fc域之次單元之重鏈的免疫結合物，所描述重鏈具有額外的C端甘胺酸-離胺酸二肽(G446及K447，根據Kabat EU索引編號)。在本發明的一個實

施例中，包含本發明之免疫結合物群體的組合物包含包括如本文中指定之Fc域次單元之重鏈的免疫結合物，所描述重鏈具有額外的C端甘胺酸殘基(G446，根據Kabat EU索引編號)。在本發明之一個實施例中，此類組合物包含免疫結合物群體，所描述群體包含：包含包括如本文中指定之Fc域之次單元之重鏈的分子；包含包括如本文指定之Fc域之次單元之重鏈的分子，所描述重鏈具有額外的C端甘胺酸殘基(G446，根據Kabat EU索引編號)；及包含包括如本文中指定之Fc域之次單元之重鏈的分子，所描述重鏈具有額外的C端甘胺酸-離胺酸二肽(G446及K447，根據Kabat EU索引編號)。除非本文另外說明，否則Fc區或恆定區中之胺基酸殘基之編號係根據EU編號系統，亦稱為EU索引，如Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版.。公共衛生處，美國國家衛生研究院，Bethesda, MD, 1991 (亦參見上述)中所描述。如本文所用，Fc域之「次單元」係指形成二聚Fc域之兩個多肽中之一者，亦即包含免疫球蛋白重鏈之C端恆定區的多肽，其能夠穩定的自結合。舉例而言，IgG Fc域之次單元包含IgG CH2及IgG CH3恆定域。

【0083】 「促進Fc域之第一及第二次單元之結合的修飾」為肽主鏈之操縱或Fc域次單元之轉譯後修飾，從而減少或阻止包含Fc域次單元之多肽與一致多肽結合形成均二聚體。如本文所用，促進結合之修飾特定言之包括對希望結合之兩個Fc域次單元(亦即，Fc域之第一及第二次單元)中之每一者所做的單獨修飾，其中該等修飾彼此互補，以便促進兩個Fc域次單元之結合。舉例而言，促進結合之修飾可改變Fc域次單元中之一或兩者的結構或電荷以便使其結合在空間上或在靜電上分別係有利的。因此，在包含第一Fc域次單元之多肽與包含第二Fc域次單元之多肽之間發生(雜)二

聚，其在與該等次單元(例如抗原結合部分)中之每一者融合的其他組分不相同的意義上可能不相同。在一些實施例中，促進結合之修飾包含Fc域中之胺基酸突變，尤其胺基酸取代。在一特定實施例中，促進結合之修飾包含Fc域之兩個次單元中之每一者中的單獨的胺基酸突變，尤其胺基酸取代。

【0084】 術語「效應子功能」當關於抗體使用時，係指可歸因於抗體之Fc區的彼等生物活性，其因抗體同型而異。抗體效應子功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)、Fc受體結合、抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)、抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)、細胞介素分泌、免疫複合物介導之抗原呈遞細胞吸收抗原、下調細胞表面受體(例如B細胞受體)及B細胞活化。

【0085】 抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)為促使免疫效應子細胞裂解塗有抗體之目標細胞的免疫機制。目標細胞為包含Fc區之抗體或其衍生物特異性結合(一般經由處於Fc區N端之蛋白質部分來結合)的細胞。如本文所用，術語「降低之ADCC」定義為在圍繞目標細胞之介質中，在既定的抗體濃度下，在指定時間內，藉由上文所定義之ADCC機制裂解之目標細胞的數目減少，及/或在圍繞目標細胞之介質中，在指定時間內藉由ADCC機制達成指定數目個目標細胞裂解所需的抗體濃度增加。ADCC降低係相對於由同類型宿主細胞使用相同的標準生產、純化、調配及儲存方法(熟習此項技術者已知)所產生、但尚未經工程改造之相同抗體介導的ADCC而言。舉例而言，Fc域中包含降低ADCC之胺基酸取代的抗體所介導之ADCC降低係相對於Fc域中無此胺基酸取代之相同抗體所介導的ADCC而言。適合於量測ADCC之分析為此項技術中熟知的(參見例如

PCT公開案第WO 2006/082515號或PCT公開案第WO 2012/130831號)。

【0086】 「活化Fc受體」為一種Fc受體，其與抗體之Fc域接合之後，引發刺激攜帶受體之細胞執行效應子功能的信號傳導事件。人類活化Fc受體包括FcγRIIIa (CD16a)、FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32)及FcαRI (CD89)。

【0087】 如本文所用，術語「工程改造(engineer/engineered/engineering)」視為包括任何肽主鏈操縱或天然存在或重組多肽或其片段之轉譯後修飾。工程改造包括胺基酸序列、醮基化模式或個別胺基酸之側鏈基團之修飾，以及此等方法之組合。

【0088】 「降低的結合」(例如與Fc受體或CD25的降低的結合)係指對應相互作用的親和力降低，如藉由例如SPR所量測。出於清楚起見，該術語亦包括親和力降低至零(或低於分析方法之偵測極限)，亦即完相互作用全去除。相反，「增強的結合」係指各別相互作用之結合親和力增強。

【0089】 如本文所用，術語「免疫結合物」係指包括至少一種IL-2分子及至少一種抗體的多肽分子。IL-2分子可藉由多種相互作用及如本文所描述之多種組態與抗體接合。在特定實施例中，IL-2分子與抗體經由肽連接子融合。根據本發明之特定免疫結合物基本上由一種IL-2分子及抗體藉由一或多個連接序列接合而組成。

【0090】 「融合」意謂組分(例如抗體及IL-2分子)藉由肽鍵直接連接連接或經由一或多個肽連接子連接。

【0091】 如本文所用，當存在大於一種的各類型部分時，關於Fc域次單元等的術語「第一」及「第二」係為了方便區分而使用。此等術語之使用並非旨在賦予免疫結合物之特定次序或取向，除非明確有如此陳述。

【0092】 藥劑之「有效量」係指在所投與之細胞或組織中產生生理變化所需的量。

【0093】 藥劑(例如醫藥組合物)之「治療有效量」係指在劑量及必需時間段下，有效達成所需治療性或預防性結果的量。舉例而言，治療有效量之藥劑可消除、減少、延遲、最小化或預防疾病之副作用。

【0094】 「個體(individual/ subject)」為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)馴養動物(例如牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如人類及非人類靈長類動物，諸如猴)、兔及啮齒動物(例如小鼠及大鼠)。特定言之，個體(individual/subject)為人類。

【0095】 術語「醫藥組合物」係指所呈形式允許其中所含活性成分之生物活性有效發揮的製劑，且其不含對調配物將投與之個體具有不可接受毒性之其他組分。

【0096】 「醫藥學上可接受之載劑」係指醫藥組合物中除活性成分之外的對個體無毒的成分。醫藥學上可接受之載劑包括(但不限於)緩衝劑、賦形劑、穩定劑或防腐劑。

【0097】 如本文所用，「治療(treatment)」(及其文法變化形式，諸如「治療(treat)」或「治療(treating)」)係指試圖改變所治療個體之疾病之自然過程的臨床介入且可出於預防或在臨床病理學過程期間進行。所需治療效果包括(但不限於)預防疾病發生或復發、緩解症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理性結果、預防癌轉移、降低疾病進展速率、改善或緩和疾病病況及緩解或改良預後。在一些實施例中，本發明之免疫結合物用於延遲疾病發展或減慢疾病進展。

【0098】

實施例之詳細描述

【0099】

突變型IL-2多肽

本發明之免疫結合物包含具有免疫療法有利特性之突變型IL-2多肽。特定言之，突變型IL-2多肽中排除了造成毒性、但不為IL-2功效必需的IL-2藥理學特性。此類突變型IL-2多肽詳細地描述於WO 2012/107417中，該文獻以全文引用之方式併入本文中。如上文所論述，不同形式的IL-2受體由不同次單元組成且對IL-2呈現不同親和力。由 β 及 γ 受體次單元組成之中等親和力IL-2受體表現於靜息效應子細胞上且足以供IL-2信號傳導。另外包含受體之 α -次單元之高親和力IL-2受體主要表現於調節T (T_{reg})細胞上以及活化效應子細胞上，其中其與IL-2的接合可以分別促進 T_{reg} 細胞介導的免疫抑制或活化誘導的細胞死亡(AICD)。因此，不希望受理論所束縛，IL-2對IL-2受體之 α -次單元之親和力降低或消除應降低IL-2誘導的藉由調節T細胞的效應子細胞功能下調及減小AICD過程產生腫瘤耐受性。另一方面，對中等親和力IL-2受體維持親和力應該保持IL-2誘導效應子細胞(如NK及T細胞)之增殖及活化。

【0100】 本發明之免疫結合物中所包含的突變型介白素-2 (IL-2)多肽包含至少一個胺基酸突變，該突變消除或降低突變型IL-2多肽對IL-2受體之 α -次單元的親和力且保持突變型IL-2多肽對中等親和力IL-2受體的親和力，各相較於野生型IL-2多肽。

【0101】 對CD25之親和力降低的人類IL-2 (hIL-2)之突變體可例如由胺基酸位置35、38、42、43、45或72處之胺基酸取代或其組合(相對於人類IL-2序列SEQ ID NO: 13編號)產生。例示性胺基酸取代包括K35E、

K35A、R38A、R38E、R38N、R38F、R38S、R38L、R38G、R38Y、R38W、F42L、F42A、F42G、F42S、F42T、F42Q、F42E、F42N、F42D、F42R、F42K、K43E、Y45A、Y45G、Y45S、Y45T、Y45Q、Y45E、Y45N、Y45D、Y45R、Y45K、L72G、L72A、L72S、L72T、L72Q、L72E、L72N、L72D、L72R及L72K。適用於本發明之免疫結合物中的特定IL-2突變體包含對應於人類IL-2之殘基42、45或72之胺基酸位置的胺基酸突變，或其組合。在一個實施例中，該胺基酸突變為選自以下之群組的胺基酸取代：F42A、F42G、F42S、F42T、F42Q、F42E、F42N、F42D、F42R、F42K、Y45A、Y45G、Y45S、Y45T、Y45Q、Y45E、Y45N、Y45D、Y45R、Y45K、L72G、L72A、L72S、L72T、L72Q、L72E、L72N、L72D、L72R及L72K，更特定言之，選自F42A、Y45A及L72G之群組的胺基酸取代。相較於IL-2突變體之野生型形式，此等突變體對中等親和力IL-2受體呈現實質上類似的結合親和力，且對IL-2受體之 α -次單元及高親和力IL-2受體的親和力實質上降低。

【0102】 適用突變體之其他特徵可以包括誘導帶有IL-2受體之T細胞及/或NK細胞增殖的能力、誘導帶有IL-2受體之T細胞及/或NK細胞中之IL-2信號傳導之能力、NK細胞產生干擾素(IFN)- γ 作為二級細胞介素的能力、誘導周邊血液單核細胞(PBMC)加工二級細胞介素(特定言之，IL-10及TNF- α)的能力降低、活化調節T細胞的能力降低、誘導T細胞發生細胞凋亡的能力降低，及活體內毒性分佈降低。

【0103】 適用於本發明的特定突變體IL-2多肽包含三種胺基酸突變，所描述胺基酸突變消除或降低突變型IL-2多肽對IL-2受體之 α -次單元的親和力，但保持突變型IL-2多肽對中等親和力IL-2受體的親和力。在一

個實施例中，該三個胺基酸突變位於對應於人類IL-2之殘基42、45及72的位置處。在一個實施例中，該三個胺基酸突變為胺基酸取代。在一個實施例中，該三個胺基酸突變為選自以下群組之胺基酸取代：F42A、F42G、F42S、F42T、F42Q、F42E、F42N、F42D、F42R、F42K、Y45A、Y45G、Y45S、Y45T、Y45Q、Y45E、Y45N、Y45D、Y45R、Y45K、L72G、L72A、L72S、L72T、L72Q、L72E、L72N、L72D、L72R及L72K。在一特定實施例中，該三個胺基酸突變為胺基酸取代F42A、Y45A及L72G (相對於SEQ ID NO: 13之人類IL-2序列編號)。

【0104】 在某些實施例中，該胺基酸突變使突變型IL-2多肽對IL-2受體之 α -次單元的親和力降低至少5倍，尤其至少10倍，更尤其至少25倍。在存在多於一個使突變型IL-2多肽對IL-2受體之 α -次單元之親和力降低之胺基酸突變的實施例中，此等胺基酸突變之組合可使突變型IL-2多肽對IL-2受體之 α -次單元的親和力降低至少30倍、至少50倍或甚至至少100倍。在一個實施例中，該胺基酸突變或胺基酸突變之組合消除突變型IL-2多肽對IL-2受體之 α -次單元的親和力，以使得表面電漿子共振偵測不到結合。

【0105】 當IL-2突變體對中等親和力IL-2受體之親和力呈現出高於對IL-2突變體之野生型形式之親和力的約70%時，達成對中等親和力受體之實質上類似的結合，亦即，保持突變型IL-2多肽對該受體的親和力。本發明之IL-2突變體可呈現高於此類親和力之約80%且甚至高於約90%。

【0106】 IL-2對IL-2受體之 α -次單元之親和力降低與IL-2之O-醣基化之消除的組合產生特性改良的IL-2蛋白質。舉例而言，當突變型IL-2多肽表現於哺乳動物細胞(諸如CHO或HEK細胞)中時，消除O-醣基化位點

會產生較均質的產物。

【0107】 因此，在某些實施例中，突變型IL-2多肽包含額外的胺基酸突變，該胺基酸突變消除對應於人類IL-2之殘基3之位置處的IL-2 O-醮基化位點。在一個實施例中，消除對應於人類IL-2之殘基3之位置處的IL-2 O-醮基化位點的該額外胺基酸突變為胺基酸取代。例示性胺基酸取代包括T3A、T3G、T3Q、T3E、T3N、T3D、T3R、T3K及T3P。在一特定實施例中，該額外胺基酸突變為胺基酸取代T3A。

【0108】 在某些實施例中，突變型IL-2多肽基本上為全長IL-2分子。在某些實施例中，突變型IL-2多肽為人類IL-2分子。在一個實施例中，突變型IL-2多肽包含具有至少一種胺基酸突變之SEQ ID NO: 13之序列，相較於包含不具有該突變之SEQ ID NO: 13的IL-2多肽，該至少一種胺基酸突變消除或降低突變型IL-2多肽對IL-2受體之 α -次單元的親和力，但保持突變型IL-2多肽對中等親和力IL-2受體的親和力。在另一實施例中，突變型IL-2多肽包含具有至少一種胺基酸突變之SEQ ID NO: 13之序列，相較於包含不具有該突變之SEQ ID NO: 13的IL-2多肽，該至少一種胺基酸突變消除或降低突變型IL-2多肽對IL-2受體之 α -次單元之親和力，但保持突變型IL-2多肽對中等親和力IL-2受體之親和力。

【0109】 在一特定實施例中，突變型IL-2多肽可引發選自由以下組成之群的一或多種細胞反應：活化T淋巴球增殖、活化T淋巴球分化、細胞毒性T細胞(CTL)活性、活化B細胞增殖、活化B細胞分化、自然殺手(NK)細胞增殖、NK細胞分化、活化T細胞或NK細胞分泌細胞介素，及NK/淋巴球活化殺手(LAK)抗腫瘤細胞毒性。

【0110】 在一個實施例中，相較於野生型IL-2多肽，突變型IL-2多

肽誘導調節T細胞中之IL-2信號傳遞的能力減小。在一個實施例中，相較於野生型IL-2多肽，突變型IL-2多肽誘導T細胞發生的活化誘導細胞死亡(AICD)較少。在一個實施例中，相較於野生型IL-2多肽，突變型IL-2多肽具有減小的活體內毒性分佈。在一個實施例中，相較於野生型IL-2多肽，突變型IL-2多肽具有延長的血清半衰期。

【0111】 適用於本發明之特定突變型IL-2多肽包含位於對應於人類IL-2之殘基3、42、45及72之位置處的四個胺基酸取代。特定胺基酸取代為T3A、F42A、Y45A及L72G。如WO 2012/107417中所示，該四重突變型IL-2多肽未呈現出可偵測的對CD25之結合、誘導T細胞發生細胞凋亡的能力減小、誘導T_{reg}細胞中之IL-2信號傳遞的能力減小，及活體內毒性分佈減少。然而，其保持活化效應子細胞中之IL-2信號傳遞、誘導效應子細胞增殖及NK細胞產生IFN- γ 作為二級細胞介素的能力。

【0112】 此外，該突變型IL-2多肽具有其他有利特性，諸如減小的表面疏水性、良好穩定性及良好表現量，如WO 2012/107417中所描述。出乎意料地，相較於野生型IL-2，該突變型IL-2多肽亦提供延長的血清半衰期。

【0113】 除IL-2與CD25或醣基化位點形成界面之IL-2區域中具有突變之外，適用於本發明的IL-2突變體亦可以在此等區域外部的胺基酸序列中具有一或多種突變。人類IL-2中之此類額外突變可提供額外優點，諸如表現或穩定性增強。舉例而言，位置125之半胱胺酸可經中性胺基酸置換，諸如絲胺酸、丙胺酸、蘇胺酸或纈胺酸，從而分別產生C125S IL-2、C125A IL-2、C125T IL-2或C125V IL-2，如美國專利第4,518,584號中所描述。如其中所描述，亦可使IL-2之N端丙胺酸殘基缺失，從而產生諸如

des-A1 C125S或des-A1 C125A等突變體。替代地或結合地，IL-2突變體可包括如下突變：其中野生型人類IL-2之位置104處通常存在的甲硫胺酸經中性胺基酸(諸如丙胺酸)置換(參見美國專利第5,206,344號)。所得突變體，例如des-A1 M104A IL-2、des-A1 M104A C125S IL-2、M104A IL-2、M104A C125A IL-2、des-A1 M104A C125A IL-2或M104A C125S IL-2 (此等及其他突變體可以發現於美國專利第5,116,943號及Weiger等人, Eur J Biochem 180, 295-300 (1989)中)，可聯合本發明之特定IL-2突變使用。

【0114】 因此，在某些實施例中，突變型IL-2多肽包含對應於人類IL-2之殘基125之位置處的額外胺基酸突變。在一個實施例中，該額外胺基酸突變為胺基酸取代C125A。

【0115】 熟習此項技術者將能夠判定哪些額外突變可以提供額外優點以用於本發明之目的。舉例而言，其應瞭解，IL-2序列中會降低或消除IL-2對中等親和力IL-2受體之親和力的胺基酸突變，諸如D20T、N88R或Q126D (參見例如US 2007/0036752)，可能不適用於納入根據本發明之突變型IL-2多肽中。

【0116】 在一個實施例中，相較於對應野生型IL-2序列，例如SEQ ID NO: 13之人類IL-2序列，突變型IL-2多肽包含不多於12個、不多於11個、不多於10個、不多於9個、不多於8個、不多於7個、不多於6個或不多於5個胺基酸突變。在一特定實施例中，相較於對應野生型IL-2序列，例如SEQ ID NO: 13之人類IL-2序列，突變型IL-2多肽包含不多於5個胺基酸突變。

【0117】 在一個實施例中，突變型IL-2多肽包含SEQ ID NO: 14之

序列。在一個實施例中，突變型IL-2多肽由SEQ ID NO: 14之序列組成。

【0118】

免疫結合物

如本文所描述之免疫結合物包含IL-2分子及抗體。此類免疫結合物藉由使例如將IL-2直接靶向腫瘤微環境而顯著增強IL-2療法之功效。根據本發明，免疫結合物中所包含之抗體可為完全抗體或免疫球蛋白，或具有生物功能(諸如抗原特異性結合親和力)之其一部分或變體。

【0119】 免疫結合物療法之一般益處顯而易見。舉例而言，免疫結合物中所包含之抗體識別腫瘤特異性抗原決定基且引起免疫結合物分子靶向腫瘤部位。因此，使用劑量比未結合的IL-2所需低得多的免疫結合物，可將高濃度之IL-2遞送至腫瘤微環境中，藉此引起本文中提及之多種免疫效應子細胞之活化及增殖。此外，由於IL-2以免疫結合物形式施用可使細胞介素本身劑量降低，因此IL-2之潛在的不合需要之副作用受到限制，且藉助於免疫結合物使IL-2靶向體內特定部位亦可減少全身暴露且因此減少副作用(與未結合的IL-2所得的副作用相比)。另外，免疫結合物之循環半衰期相較於未結合的IL-2延長促進免疫結合物之功效。然而，IL-2免疫結合物之此特徵可能再次加重IL-2分子之潛在副作用：因為IL-2免疫結合物在血流中之循環半衰期相對於未結合的IL-2顯著更長，融合蛋白分子中之IL-2或其他部分活化通常存在於血管中的組分之機率增加。對於含有與其他部分(諸如Fc或白蛋白)融合的IL-2的其他融合蛋白有相同擔憂，其使得IL-2在循環中之半衰期延長。因此，包含如本文及WO 2012/107417中所描述之突變型IL-2多肽的免疫結合物特別有利，其毒性相較於IL-2野生型形式減小。

【0120】 如上文所描述，使IL-2直接靶向免疫效應子細胞而非腫瘤細胞可有利於IL-2免疫療法。

【0121】 因此，本發明提供一種如上文所描述之突變型IL-2多肽及一種與CD8結合之抗體。在一個實施例中，突變型IL-2多肽與抗體形成融合蛋白，亦即突變型IL-2多肽與抗體共用肽鍵。在一些實施例中，抗體包含由第一及第二次單元構成的Fc域。在一特定實施例中，突變型IL-2多肽在其胺基端胺基酸處與Fc域之一次單元的羧基端胺基酸融合，視情況經由連接肽融合。在一些實施例中，抗體為全長抗體。在一些實施例中，抗體為免疫球蛋白分子，特定言之，IgG類免疫球蛋白分子，更特定言之，IgG₁子類免疫球蛋白分子。在一個此類實施例中，突變型IL-2多肽與免疫球蛋白重鏈之一共用胺基端肽鍵。在某些實施例中，抗體為抗體片段。在一些實施例中，抗體為Fab分子或scFv分子。在一個實施例中，抗體為Fab分子。在另一實施例中，抗體為scFv分子。免疫結合物亦可包含多於一種抗體。在免疫結合物中包含多於一種抗體，例如，第一抗體及第二抗體之情況下，各抗體可獨立地選自抗體及抗體片段之各種形式。舉例而言，第一抗體可為Fab分子且第二抗體可為scFv分子。在一特定實施例中，該第一抗體與該第二抗體中之每一者為scFv分子或該第一抗體與該第二抗體中之每一者為Fab分子。在一特定實施例中，該第一抗體與該第二抗體中之每一者為Fab分子。在一個實施例中，該第一抗體與該第二抗體中之每一者與CD8結合。

【0122】

免疫結合物型式

例示性免疫結合物型式描述於PCT公開案第WO 2011/020783號中，

該案以全文引用之方式併入本文中。此等免疫結合物包含至少兩種抗體。因此，在一個實施例中，根據本發明之免疫結合物包含如本文中所描述之突變型IL-2多肽及至少一種第一及第二抗體。在一特定實施例中，該第一及第二抗體係獨立地選自由Fv分子(特定言之，scFv分子)及Fab分子組成之群。在一特定實施例中，該突變型IL-2多肽與該第一抗體共用胺基或羧基端肽鍵，且該第二抗體與i)突變型IL-2多肽或ii)第一抗體共用胺基或羧基端肽鍵。在一特定實施例中，免疫結合物基本上由突變型IL-2多肽與第一及第二抗體，尤其Fab分子藉由一或多個連接序列連接而組成。此類型式之優點在於，其以高親和力與靶抗原(CD8)結合，但僅單體與IL-2受體結合，從而避免使免疫結合物靶向除目標位點外之其他位置處的攜帶有IL-2受體之免疫細胞。在一特定實施例中，突變型IL-2多肽與第一抗體，特定言之，第一Fab分子共用羧基端肽鍵，且進一步與第二抗體，特定言之，第二Fab分子共用胺基端肽鍵。在另一實施例中，第一抗體，特定言之，第一Fab分子與突變型IL-2多肽共用羧基端肽鍵，且進一步與第二抗體，特定言之，第二Fab分子共用胺基端肽鍵。在另一實施例中，第一抗體，特定言之，第一Fab分子與第一突變型IL-2多肽共用胺基端肽鍵，且進一步與第二抗體，特定言之，第二Fab分子共用羧基端肽。在一特定實施例中，突變型IL-2多肽與第一重鏈可變區共用羧基端肽鍵且另外與第二重鏈可變區共用胺基端肽鍵。在另一實施例中，突變型IL-2多肽與第一輕鏈可變區共用羧基端肽鍵且另外與第二輕鏈可變區共用胺基端肽鍵。在另一實施例中，第一重鏈或輕鏈可變區藉由羧基端肽鍵與突變型IL-2多肽接合且另外藉由胺基端肽鍵與第二重鏈或輕鏈可變區接合。在另一實施例中，第一重鏈或輕鏈可變區藉由胺基端肽鍵與突變型IL-2多肽接合且另外

藉由羧基端肽鍵與第二重鏈或輕鏈可變區接合。在一個實施例中，突變型IL-2多肽與第一Fab重鏈或輕鏈共用羧基端肽鍵且另外與第二Fab重鏈或輕鏈共用胺基端肽鍵。在另一實施例中，第一Fab重鏈或輕鏈與突變型IL-2多肽共用羧基端肽鍵且另外與第二Fab重鏈或輕鏈共用胺基端肽鍵。在其他實施例中，第一Fab重鏈或輕鏈與突變型IL-2多肽共用胺基端肽鍵且進一步與第二Fab重鏈或輕鏈共用羧基端肽鍵。在一個實施例中，免疫結合物包含突變型IL-2多肽，該多肽與一或多個scFv分子共用胺基端肽鍵且另外與一或多個scFv分子共用羧基端肽鍵。

【0123】 然而，尤其適用於根據本發明之免疫結合物之型式包含免疫球蛋白分子作為抗體。此類免疫結合物型式描述於WO 2012/146628中，其以全文引用之方式併入本文中。

【0124】 因此，在特定實施例中，免疫結合物包含如本文所描述之突變型IL-2多肽及與CD8結合之免疫球蛋白分子，特定言之IgG分子，更特定言之IgG₁分子。在一個實施例中，免疫結合物包含不多於一種突變型IL-2多肽。在一個實施例中，免疫球蛋白分子為人類免疫球蛋白分子。在一個實施例中，免疫球蛋白分子包含人類恆定區，例如人類CH1、CH2、CH3及/或CL域。在一個實施例中，免疫球蛋白包含人類Fc域，特定言之人類IgG₁ Fc域。在一個實施例中，突變型IL-2多肽與免疫球蛋白分子共用胺基或羧基端肽鍵。在一個實施例中，免疫結合物基本上由突變型IL-2多肽與免疫球蛋白分子(特定言之IgG分子，更特定言之IgG₁分子)藉由一或多個連接序列接合而組成。在一特定實施例中，突變型IL-2多肽在胺基端胺基酸處與免疫球蛋白重鏈之一的羧基端胺基酸融合，視情況經由連接肽融合。

【0125】 突變型IL-2多肽可直接或經由連接肽與抗體融合，該連接肽包含一或多個胺基酸，典型地約2至20個胺基酸。連接肽在此項技術中已知且描述於本文中。適合的非免疫原性連接肽包括例如 $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ 、 $(G_4S)_n$ 或 $G_4(SG_4)_n$ 連接肽。「n」一般為1至10，通常2至4之整數。在一個實施例中，連接肽具有至少5個胺基酸之長度；在一個實施例中，具有5至100個胺基酸之長度；在另一實施例中，具有10至50個胺基酸之長度。在一特定實施例中，連接肽具有15個胺基酸之長度。在一個實施例中，連接肽為 $(G_xS)_n$ 或 $(G_xS)_nG_m$ ，其中G=甘胺酸，S=絲胺酸，且 $(x=3, n=3, 4, 5$ 或 $6, 且m=0, 1, 2$ 或 $3)$ 或 $(x=4, n=2, 3, 4$ 或 5 且 $m=0, 1, 2$ 或 $3)$ ，在一個實施例中， $x=4$ 且 $n=2$ 或 3 ，在另一實施例中， $x=4$ 且 $n=3$ 。在一特定實施例中，連接肽為 $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 15)。在一個實施例中，連接肽具有(或由以下組成)SEQ ID NO: 15之胺基酸序列。

【0126】 在一特定實施例中，免疫結合物包含突變型IL-2分子及與CD8結合之免疫球蛋白分子，特定言之IgG₁子類免疫球蛋白分子，其中突變型IL-2分子在其胺基端胺基酸處與免疫球蛋白重鏈中之一者的羧基端胺基酸經由SEQ ID NO: 15之連接肽融合。

【0127】 在一特定實施例中，免疫結合物包含突變型IL-2分子及與CD8結合之抗體，其中該抗體包含由第一及第二次單元構成之Fc域，特定言之人類IgG₁ Fc域，且突變型IL-2分子在其胺基端胺基酸處與Fc域之次單元中之一者的羧基端胺基酸經由SEQ ID NO: 15之連接肽融合。

【0128】

CD8抗體

本發明之免疫結合物中包含之抗體與CD8 (特定言之人類CD8)結

合，且能夠將突變型IL-2多肽導向其中表現CD8之目標位點，特定言之例如與腫瘤相關聯之表現CD8的T細胞。

【0129】 可用於本發明之免疫結合物中之適合的CD8抗體描述於PCT公開案第WO 2019/033043 A2號中，該案以全文引用之方式併入本文中。

【0130】 本發明之免疫結合物可包含兩種或更多種抗體，該等抗體可與相同或不同抗原結合。然而，在特定實施例中，此等抗體中之每一者與CD8結合。在一個實施例中，本發明之免疫結合物中所包含之抗體為單特異性的。在一特定實施例中，免疫結合物包含單一的單特異性抗體，特定言之單特異性免疫球蛋白分子。

【0131】 抗體可為保持與CD8 (特定言之人類CD8)特異性結合之任何類型的抗體或其片段。抗體片段包括(但不限於) Fv分子、scFv分子、Fab分子及F(ab')₂分子。然而，在特定實施例中，抗體為全長抗體。在一些實施例中，抗體包含由第一及第二次單元構成的Fc域。在一些實施例中，抗體為免疫球蛋白，特定言之IgG類，更特定言之IgG₁子類免疫球蛋白。

【0132】 在一些實施例中，抗體為單株抗體。

【0133】

功能特徵

本文提供之抗CD8抗體具有以下特徵中之一或多者：(a)抗體不抑制或刺激CD8⁺ T細胞之活化；(b)抗體不誘導CD8⁺ T細胞增殖；(c)抗體不誘導IFN γ 產生；(d)抗體特異性結合人類CD8；(e)抗體特異性結合恆河猴CD8；(f)抗體特異性結合獼猴CD8；(g)抗體不結合CD4⁺細胞；(g)抗體不

結合CD3⁻細胞；及(h)抗體不自循環消耗CD8⁺ T細胞。此類特徵可使用熟知方法，例如PCT申請案WO 2019/033043 A2中所使用之方法來評定。

【0134】 抗CD8抗體為以足夠親和力及特異性與CD8結合之抗體。在某些實施例中，抗CD8抗體以約以下中之任一者之K_n結合人類CD8：1 μM、100 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.5 nM、0.1 nM、0.05 nM或0.001 nM (例如10⁻⁸ M或更小，例如10⁻⁸ M至10⁻¹³ M，例如10⁻⁹ M至10⁻¹³ M)，包括此等值之間的任何範圍。在某些實施例中，抗CD8抗體以約以下中之任一者之K_n結合恆河猴CD8：1 μM、100 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.5 nM、0.1 nM、0.05 nM或0.001 nM (例如10⁻⁸ M或更小，例如10⁻⁸ M至10⁻¹³ M，例如10⁻⁹ M至10⁻¹³ M)，包括此等值之間的任何範圍。在某些實施例中，抗CD8抗體以以下之K_n結合食蟹獼猴CD8：1 μM、100 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.5 nM、0.1 nM、0.05 nM或0.001 nM (例如10⁻⁸ M或更小，例如10⁻⁸ M至10⁻¹³ M，例如10⁻⁹ M至10⁻¹³ M)，包括此等值之間的任何範圍。

【0135】 在某些實施例中，抗CD8抗體以以下之K_n結合(a)人類CD8：約1 μM、100 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.5 nM、0.1 nM、0.05 nM或0.001 nM (例如10⁻⁸ M或更小，例如10⁻⁸ M至10⁻¹³ M，例如10⁻⁹ M至10⁻¹³ M)，包括此等值之間的任何範圍；以以下之K_n結合(b)恆河猴CD8：約1 μM、100 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.5 nM、1.1 nM、0.05 nM或0.001 nM (例如10⁻⁸ M或更小，例如10⁻⁸ M至10⁻¹³ M，例如10⁻⁹ M至10⁻¹³ M)，包括此等值之間的任何範圍；及以以下之K_n結合(c)食蟹獼猴

CD8：約1 μM 、100 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.5 nM、0.1 nM、0.05 nM或0.001 nM (例如 10^{-8} M或更小，例如 10^{-8} M至 10^{-13} M，例如 10^{-9} M至 10^{-13} M)，包括此等值之間的任何範圍。本文提供之抗CD8抗體針對人類CD8、恆河猴CD8及/或獼猴CD8之 K_n 可藉由此項技術中已知之任何方法來測定，包括(但不限於)例如ELISA、螢光活化細胞分選(FACS)分析、放射免疫沈澱(RIA)及表面電漿子共振(SPR)。在某些實施例中，本文提供之抗CD8抗體針對人類CD8、恆河猴CD8及/或獼猴CD8之 K_n 經由SPR測定。在某些實施例中，本文提供之抗CD8抗體針對人類CD8、恆河猴CD8及/或獼猴CD8之 K_n 經由FACS測定。

【0136】 在某些實施例中，本文提供之抗CD8抗體不結合(例如特異性結合)小鼠CD8。在某些實施例中，抗CD8抗體不結合(例如特異性結合)大鼠CD8。在某些實施例中，抗CD8抗體不結合(例如特異性結合)小鼠CD8或大鼠CD8，例如如經由SPR及/或FACS測定。

【0137】 在一些實施例中，抗體包含：(a)HCDR1，其包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列；HCDR2，其包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HCDR3，其包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列；LCDR1，其包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列；LCDR2，其包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列；及LCDR3，其包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列。

【0138】 在一些實施例中，抗體包含：(a)重鏈可變區(VH)，其包含含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HCDR1、含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HCDR2、含SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HCDR3；及(b)輕鏈可變區(VL)，其包含含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的LCDR1、含SEQ ID NO:5

之胺基酸序列的LCDR2及含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的LCDR3 在一些實施例中，重鏈及/或輕鏈可變區為人類化可變區。在一些實施例中，重鏈及/或輕鏈可變區包含人類構架區(FR)。

【0139】 在一些實施例中，抗體包含含與SEQ ID NO:7之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)。在一些實施例中，抗體包含含與SEQ ID NO:8之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)。在一些實施例中，抗體包含：(a)重鏈可變區(VH)，其包含與SEQ ID NO:7之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列；及(b)輕鏈可變區(VL)，其包含與SEQ ID NO:8之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列。

【0140】 在一特定實施例中，抗體包含：(a)包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)；及(b)包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)。

【0141】 在一些實施例中，抗體包含：HCDR1，其包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列；HCDR2，其包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HCDR3，其包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列；LCDR1，其包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列；LCDR2，其包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列；及LCDR3，其包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列。

【0142】 在一些實施例中，抗體包含：(a)重鏈可變區(VH)，其包含含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HCDR1、含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HCDR2、含SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HCDR3；及(b)輕鏈可變區

(VL)，其包含含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的LCDR1、含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的LCDR2及含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的LCDR3。在一些實施例中，重鏈及/或輕鏈可變區為人類化可變區。在一些實施例中，重鏈及/或輕鏈可變區包含人類構架區(FR)。

【0143】 在一些實施例中，抗體包含含與SEQ ID NO:7之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)。在一些實施例中，抗體包含含與SEQ ID NO:29之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)。在一些實施例中，抗體包含：(a)重鏈可變區(VH)，其包含與SEQ ID NO:7之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列；及(b)輕鏈可變區(VL)，其包含與SEQ ID NO:29之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列。

【0144】 在一特定實施例中，抗體包含：(a)包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)；及(b)包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)。

【0145】 在一些實施例中，抗體為人類化抗體。在一個實施例中，抗體為包含人類恆定區之免疫球蛋白分子，特定言之包含人類CH1、CH2、CH3及/或CL域之IgG類免疫球蛋白分子。人類恆定域之例示性序列載於SEQ ID NO: 22及23 (分別為人類 κ 及 λ CL域)及SEQ ID NO: 24 (人類IgG1重鏈恆定域CH1-CH2-CH3)中。在一些實施例中，抗體包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 23之胺基酸序列，特定言之SEQ ID NO: 24之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包

含含與SEQ ID NO: 24之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列的重鏈恆定區。特定言之，如本文所描述，重鏈恆定區可包含Fc域中之胺基酸突變。

【0146】

*Fc*域

在特定實施例中，根據本發明之免疫結合物中所包含之抗體包含由第一及第二次單元構成的Fc域。抗體之Fc域由包含免疫球蛋白分子之重鏈域的一對多肽鏈組成。舉例而言，免疫球蛋白G (IgG)分子之Fc域為二聚體，其中各次單元包含CH2及CH3 IgG重鏈恆定域。Fc域之兩個次單元彼此間能夠穩定結合。在一個實施例中，本發明之免疫結合物包含不多於一個Fc域。

【0147】 在一個實施例中，免疫結合物中所包含之抗體中之Fc域為IgG Fc域。在一特定實施例中，Fc域為IgG₁ Fc域。在另一實施例中，Fc域為IgG₄ Fc域。在一更具體實施例中，Fc域為包含位置S228 (Kabat EU索引編號)處之胺基酸取代(特定言之胺基酸取代S228P)的IgG₄ Fc域。此胺基酸取代減少活體內IgG₄抗體之Fab臂交換(參見Stubenrauch等人, Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010))。在另一特定實施例中，Fc域為人類Fc域。在一甚至更特定實施例中，Fc域為人類IgG₁ Fc域。人類IgG₁ Fc區之例示性序列載於SEQ ID NO: 21中。

【0148】

促進雜二聚之Fc域修飾

根據本發明之免疫結合物包含突變型IL-2多肽，特定言之與Fc域之兩個次單元中之一個或另一個融合之單一(不多於一個)突變型IL-2多肽，

因此Fc域之兩個次單元通常包含於兩條不同多肽鏈中。此等多肽之重組共表現及隨後二聚化引起兩種多肽出現若干種可能的組合。為了改良重組製造中之免疫結合物之產率及純度，因此將促進所需多肽之結合的修飾引入抗體之Fc域中係為有利的。

【0149】 因此，在特定實施例中，根據本發明之免疫結合物中所包含之抗體之Fc域包含促進Fc域之第一與第二次單元結合的修飾。人類IgG Fc域中之兩個次單元之間的最廣泛蛋白質-蛋白質相互作用的位點位於Fc域之CH3域中。因此，在一個實施例中，該修飾存在於Fc域之CH3域中。

【0150】 存在若干種修飾Fc域之CH3域以加強雜二聚之方法，其充分描述例如於 WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012058768、WO 2013157954、WO 2013096291中。通常，在所有此類方法中，Fc域之第一次單元之CH3域與Fc域之第二次單元之CH3域均以互補方式經工程改造，使得各CH3域(或包含其之重鏈)本身可不再發生均二聚，而是被迫與以互補方式經工程改造之另一CH3域雜二聚(以使得第一與第二CH3域發生雜二聚且兩個第一或兩個第二CH3域之間不形成均二聚體)。

【0151】 在一特定實施例中，促進Fc域之第一及第二次單元之結合的該修飾為所謂的「杵-臼(knob-into-hole)」修飾，其包含Fc域之兩個次單元中之一者中的「杵」修飾及Fc域之兩個次單元中之另一者中的「臼」修飾。

【0152】 杵-臼技術描述於例如US5,731,168；US7,695,936；Ridgway等人, Prot Eng 9, 617-621 (1996)及Carter, J Immunol Meth 248,

7-15 (2001)中。一般而言，方法包括在第一多肽之界面處引入隆凸(「杵」)及在第二多肽之界面處引入相應空腔(「臼」)，使得隆凸可定位於空腔中以便促進雜二聚體形成且阻礙均二聚體形成。藉由用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換第一多肽界面中之小胺基酸側鏈來構築隆凸。大小與隆凸相同或類似之補償性空腔係在第二多肽之界面中藉由用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈來產生。

【0153】 相應地，在一特定實施例中，在免疫結合物中所包含的抗體之Fc域之第一次單元的CH3域中，胺基酸殘基經具有較大側鏈體積的胺基酸殘基置換，從而在第一次單元之CH3域內產生可定位於第二次單元之CH3域內之空腔中的隆凸，且在Fc域之第二次單元的CH3域中，胺基酸殘基經具有較小側鏈體積的胺基酸殘基置換，從而在第二次單元之CH3域內產生供第一次單元之CH3域內之隆凸可定位於其中的空腔。

【0154】 較佳地，具有較大側鏈體積之該胺基酸殘基係選自由精胺酸(R)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)組成之群。

【0155】 較佳地，具有較小側鏈體積之該胺基酸殘基係選自由丙胺酸(A)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)、纈胺酸(V)組成之群。

【0156】 隆凸及空腔可藉由改變編碼多肽之核酸，例如藉由位點特异性突變誘發或藉由肽合成來製備。

【0157】 在一特定實施例中，在Fc域之第一次單元(「杵」次單元)之CH3域中，位置366處之蘇胺酸殘基經色胺酸殘基置換(T366W)，且在Fc域之第二次單元(「臼」次單元)之CH3域中，位置407處之酪胺酸殘基經纈胺酸殘基置換(Y407V)。在一個實施例中，在Fc域之第二次單元中，另外，位置366處之蘇胺酸殘基經絲胺酸殘基置換(T366S)且位置368處之

白胺酸殘基經丙胺酸殘基置換(L368A)(根據Kabat EU索引編號)。

【0158】 在又另一實施例中，在Fc域之第一次單元中，另外，位置354處之絲胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(S354C)，或位置356處之麩胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(E356C) (特定言之，位置354處之絲胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換)，且在Fc域之第二次單元中，另外，位置349處之酪胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(Y349C) (根據Kabat EU索引編號)。引入此兩個半胱胺酸殘基使得在Fc域之兩個次單元之間形成二硫橋鍵，從而進一步使二聚體穩定(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001))。

【0159】 在一特定實施例中，Fc域之第一次單元包含胺基酸取代S354C及T366W，且Fc域之第二次單元包含胺基酸取代Y349C、T366S、L368A及Y407V (根據Kabat EU索引編號)。

【0160】 在一些實施例中，Fc域之第二次單元另外包含胺基酸取代H435R及Y436F (根據Kabat EU索引編號)。

【0161】 在一特定實施例中，突變型IL-2多肽與Fc域之第一次單元(包含「杵」修飾)融合(視情況經由連接肽)。不希望受理論所束縛，突變型IL-2多肽與Fc域之含杵次單元的融合(進一步)使包含兩種突變型IL-2多肽之免疫結合物的產生降至最低(兩種含杵多肽發生空間位阻)。

【0162】 考慮用於加強雜二聚之CH3修飾之其他技術作為根據本發明之替代，且描述例如於WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012/058768、WO 2013/157954、WO 2013/096291中。

【0163】 在一個實施例中，替代地使用EP 1870459中所描述之雜二

聚方法。此方法係基於在Fc域之兩個次單元之間的CH3/CH3域界面中的特定胺基酸位置引入具有相反電荷的帶電胺基酸。針對免疫結合物中所包含之抗體之一個較佳實施例為存在於(Fc域之)兩個CH3域中之一者中的胺基酸突變R409D、K370E及存在於Fc域之CH3域中之另一者中的胺基酸突變D399K、E357K (根據Kabat EU索引編號)。

【0164】 在另一實施例中，本發明之免疫結合物中所包含之抗體包含：Fc域之第一次單元之CH3域中的胺基酸突變T366W；及Fc域之第二次單元之CH3域中的胺基酸突變T366S、L368A、Y407V；及Fc域之第一次單元之CH3域中的另外胺基酸突變R409D、K370E；及Fc域之第二次單元之CH3域中的胺基酸突變D399K、E357K (根據Kabat EU索引編號)。

【0165】 在另一實施例中，本發明之免疫結合物中所包含之抗體包含Fc域之第一次單元之CH3域中的胺基酸突變S354C、T366W，及Fc域之第二次單元之CH3域中的胺基酸突變Y349C、T366S、L368A、Y407V；或該抗體包含Fc域之第一次單元之CH3域中的胺基酸突變Y349C、T366W及Fc域之第二次單元之CH3域中的胺基酸突變S354C、T366S、L368A、Y407V，及Fc域之第一次單元之CH3域中的另外胺基酸突變R409D、K370E，及Fc域之第二次單元之CH3域中的胺基酸突變D399K、E357K (全部均根據Kabat EU索引編號)。

【0166】 在一個實施例中，替代地使用WO 2013/157953中所描述之雜二聚方法。在一個實施例中，第一CH3域包含胺基酸突變T366K，且第二CH3域包含胺基酸突變L351D (根據Kabat EU索引編號)。在又一實施例中，第一CH3域進一步包含胺基酸突變L351K。在又一實施例中，第二CH3域進一步包含選自Y349E、Y349D及L368E之胺基酸突變(較佳為

L368E) (根據Kabat EU索引編號)。

【0167】 在一個實施例中，替代地使用WO 2012/058768中所描述之雜二聚方法。在一個實施例中，第一CH3域包含胺基酸突變L351Y、Y407A，且第二CH3域包含胺基酸突變T366A、K409F。在又一實施例中，第二CH3域包含位置T411、D399、S400、F405、N390或K392處之另一胺基酸突變，例如選自以下之胺基酸突變：a) T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411E或T411W；b) D399R、D399W、D399Y或D399K；c) S400E、S400D、S400R或S400K；d) F405I、F405M、F405T、F405S、F405V或F405W；e) N390R、N390K或N390D；f) K392V、K392M、K392R、K392L、K392F或K392E (根據Kabat EU索引編號)。在又一實施例中，第一CH3域包含胺基酸突變L351Y、Y407A，且第二CH3域包含胺基酸突變T366V、K409F。在又一實施例中，第一CH3域包含胺基酸突變Y407A，且第二CH3域包含胺基酸突變T366A、K409F。在又一實施例中，第二CH3域進一步包含胺基酸突變K392E、T411E、D399R及S400R (根據Kabat EU索引編號)。

【0168】 在一個實施例中，替代地使用WO 2011/143545中所描述之雜二聚方法，例如在選自由368及409組成之群的位置處具有胺基酸修飾(根據Kabat EU索引編號)。

【0169】 在一個實施例中，替代地使用WO 2011/090762中所描述之雜二聚方法，其亦使用上文所描述之杵-臼技術。在一個實施例中，第一CH3域包含胺基酸突變T366W，且第二CH3域包含胺基酸突變Y407A。在一個實施例中，第一CH3域包含胺基酸突變T366Y，且第二CH3域包含胺基酸突變Y407T (根據Kabat EU索引編號)。

【0170】 在一個實施例中，免疫結合物中所包含之抗體或其Fc域屬於IgG₂子類，且替代地使用WO 2010/129304中所描述之雜二聚方法。

【0171】 在一替代實施例中，促進Fc域之第一與第二次單元結合之修飾包含介導靜電轉向效應之修飾，例如如PCT公開案WO 2009/089004中所描述。一般而言，此方法涉及用帶電胺基酸殘基置換兩個Fc域次單元之界面處之一或多個胺基酸殘基，使得均二聚體形成在靜電上不利的，但雜二聚在靜電上為有利的。在一個此類實施例中，第一CH3域包含用帶負電胺基酸(例如麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)，較佳為K392D或N392D)對K392或N392進行的胺基酸取代，且第二CH3域包含用帶正電胺基酸(例如離胺酸(K)或精胺酸(R)，較佳為D399K、E356K、D356K或E357K，且更佳為D399K及E356K)對D399、E356、D356或E357進行的胺基酸取代。在又一實施例中，第一CH3域進一步包含用帶負電胺基酸(例如麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)，較佳為K409D或R409D)對K409或R409進行的胺基酸取代。在又一實施例中，第一CH3域進一步或替代地包含用帶負電荷胺基酸(例如麩胺酸(E)或天冬胺酸(D))對K439及/或K370進行的胺基酸取代(所有均根據Kabat EU索引編號)。

【0172】 在又另一實施例中，替代地使用WO 2007/147901中所描述之雜二聚方法。在一個實施例中，第一CH3域包含胺基酸突變K253E、D282K及K322D，且第二CH3域包含胺基酸突變D239K、E240K及K292D(根據Kabat EU索引編號)。

【0173】 在再一實施例中，可替代地使用WO 2007/110205中所描述之雜二聚方法。

【0174】 在一個實施例中，Fc域之第一次單元包含胺基酸取代

K392D及K409D，且Fc域之第二次單元包含胺基酸取代D356K及D399K (根據Kabat EU索引編號)。

【0175】

*Fc*域修飾降低Fc受體結合及/或效應子功能

Fc域賦予免疫結合物有利藥物動力學特性，包括促成在目標組織中之良好積聚的長血清半衰期及有利的組織-血液分佈比率。然而，其可能同時引起免疫結合物對表現Fc受體之細胞而非較佳抗原攜帶細胞的非所需靶向。此外，Fc受體信號傳遞路徑之共活化可引起細胞介素釋放，其與IL-2多肽及免疫結合物之長半衰期組合，引起細胞介素受體過度活化且在全身性投藥後引起嚴重副作用。據此，與輸注反應相關的習知IgG-IL-2免疫結合物已有描述(參見例如King等人, J Clin Oncol 22, 4463-4473 (2004))。

【0176】 因此，在特定實施例中，相較於原生IgG₁ Fc域，根據本發明之免疫結合物中所包含之抗體之Fc域呈現對Fc受體降低的結合親和力及/或降低的效應子功能。在一個此類實施例中，Fc域(或包含該Fc域之抗體)呈現相較於原生IgG₁ Fc域(或包含原生IgG₁ Fc域之抗體)小於50%，較佳小於20%，更佳小於10%且最佳小於5%的對Fc受體的結合親和力，及/或相較於原生IgG₁ Fc域(或包含原生IgG₁ Fc域之抗體)小於50%，較佳小於20%，更佳小於10%且最佳小於5%的效應子功能。在一個實施例中，Fc域(或包含該Fc域之抗體)實質上不與Fc受體結合及/或誘導效應子功能。在一特定實施例中，Fc受體為Fc γ 受體。在一個實施例中，Fc受體為人類Fc受體。在一個實施例中，Fc受體為活化性Fc受體。在一特定實施例中，Fc受體為活化性人類Fc γ 受體，更具體而言人類Fc γ RIIIa、Fc γ RI或

Fc γ RIIa，最具體而言人類Fc γ RIIIa。在一個實施例中，效應子功能為選自CDC、ADCC、ADCP及細胞介素分泌之群的一或多者。在一特定實施例中，效應子功能為ADCC。在一個實施例中，相較於原生IgG₁ Fc域，Fc域對新生兒Fc受體(FcRn)呈現實質上類似的結合親和力。當Fc域(或包含該Fc域之抗體)呈現出比原生IgG₁ Fc域(或包含原生IgG₁ Fc域之抗體)高約70%，特定言之高約80%，更特定言之高90%的對FcRn之結合親和力時，達成對FcRn實質上類似的結合。

【0177】 在某些實施例中，Fc域經工程改造以相較於未經工程改造之Fc域，與Fc受體之結合親和力降低及/或效應子功能降低。在特定實施例中，免疫結合物中所包含之抗體之Fc域包含降低Fc域對Fc受體之結合親和力及/或效應子功能的一或多個胺基酸突變。典型地，Fc域之兩個次單元中之每一者中存在相同的一或多個胺基酸突變。在一個實施例中，胺基酸突變使Fc域對Fc受體的結合親和力降低。在一個實施例中，胺基酸突變使Fc域對Fc受體的結合親和力降低至少2倍、至少5倍或至少10倍。在其中存在大於一個使Fc域與Fc受體之結合親和力降低之胺基酸突變的實施例中，此等胺基酸突變之組合可使Fc域與Fc受體之結合親和力降低至少10倍、至少20倍或甚至至少50倍。在一個實施例中，包含經工程改造之Fc域之抗體呈現相較於包含未經工程改造之Fc域之抗體，小於20%，特定言之小於10%，更特定言之小於5%的與Fc受體之結合親和力。在一特定實施例中，Fc受體為Fc γ 受體。在一些實施例中，Fc受體為人類Fc受體。在一些實施例中，Fc受體為活化性Fc受體。在一特定實施例中，Fc受體為活化性人類Fc γ 受體，更具體而言人類Fc γ RIIIa、Fc γ RI或Fc γ RIIa，最具體而言人類Fc γ RIIIa。較佳地，降低與此等受體中之每一

者的結合。在一些實施例中，對補體組分的結合親和力，具體言之對C1q的結合親和力，亦降低。在一個實施例中，對新生兒Fc受體(FcRn)的結合親和力未降低。當Fc域(或包含該Fc域之抗體)呈現出比Fc域之未經工程改造之形式(或包含Fc域之該未經工程改造之形式的抗體)高約70%的對FcRn之結合親和力時，達成對FcRn實質上類似的結合，亦即保持Fc域對該受體之結合親和力。Fc域或本發明之免疫結合物中所包含之包含該Fc域之抗體可呈現大於約80%且甚至大於約90%之此類親和力。在某些實施例中，相較於未經工程改造之Fc域，免疫結合物中所包含之抗體的Fc域經工程改造而具有降低的效應子功能。降低的效應子功能可包括(但不限於)以下中之一或多者：補體依賴性細胞毒性(CDC)降低、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)降低、抗體依賴性細胞吞噬(ADCP)減少、細胞介素分泌減少、免疫複合物介導之抗原呈遞細胞攝入抗原減少、與NK細胞之結合減少、與巨噬細胞之結合減少、與單核細胞之結合減少、與多形核細胞之結合減少、誘導細胞凋亡之直接信號傳導減少、目標所結合抗體之交聯減少、樹突狀細胞成熟減少或T細胞激活減少。在一個實施例中，降低的效應子功能為選自以下之群的一或多者：CDC降低、ADCC降低、ADCP減少及細胞介素分泌減少。在一特定實施例中，降低的效應子功能為ADCC降低。在一個實施例中，ADCC降低為小於藉由未經工程改造之Fc域(或包含未經工程改造之Fc域的抗體)所誘導的ADCC的20%。

【0178】 在一個實施例中，使Fc域與Fc受體之結合親和力及/或效應子功能降低的胺基酸突變為胺基酸取代。在一個實施例中，Fc域包含位於選自以下之群之位置的胺基酸取代：E233、L234、L235、N297、P331及P329 (根據Kabat EU索引編號)。在一更特定實施例中，Fc域包含

處於選自以下之群之位置處的胺基酸取代：L234、L235及P329（根據Kabat EU索引編號）。在一些實施例中，Fc域包含胺基酸取代L234A及L235A（根據Kabat EU索引編號）。在一個此類實施例中，Fc域為IgG₁ Fc域，尤其人類IgG₁ Fc域。在一個實施例中，Fc域包含位置P329處之胺基酸取代。在一更特定實施例中，胺基酸取代為P329A或P329G，特定言之P329G（根據Kabat EU索引編號）。在一個實施例中，Fc域包含位置P329處之胺基酸取代及選自E233、L234、L235、N297及P331之位置處的另一胺基酸取代（根據Kabat EU索引編號）。在一更特定實施例中，另一胺基酸取代為E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S。在特定實施例中，Fc域包含位置P329、L234及L235處之胺基酸取代（根據Kabat EU索引編號）。在更特定實施例中，Fc域包含胺基酸突變L234A、L235A及P329G（「P329G LALA」、「PGLALA」或「LALAPG」）。具體言之，在特定實施例中，Fc域中之各次單元包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G（Kabat EU索引編號），亦即，在Fc域之第一及第二次單元中之每一者中，位置234處之白胺酸殘基經丙胺酸殘基置換（L234A），位置235處之白胺酸殘基經丙胺酸殘基置換（L235A）且位置329處之脯胺酸殘基經甘胺酸殘基置換（P329G）（根據Kabat EU索引編號）。在一個此類實施例中，Fc域為IgG₁ Fc域，尤其人類IgG₁ Fc域。「P329G LALA」胺基酸取代組合幾乎完全消除人類IgG₁ Fc域與Fc γ 受體（以及補體）之結合，如PCT公開案第WO 2012/130831號中所描述，該案以全文引用之方式併入本文中。WO 2012/130831亦描述製備此類突變型Fc域之方法及用於測定其特性（諸如Fc受體結合或效應子功能）之方法。

【0179】 相較於IgG₁抗體，IgG₄抗體呈現降低之Fc受體結合親和力

及降低之效應子功能。因此，在一些實施例中，本發明之免疫結合物中所包含之抗體之Fc域為IgG₄ Fc域，特定言之人類IgG₄ Fc域。在一個實施例中，IgG₄ Fc域包含位置S228處之胺基酸取代，特定言之胺基酸取代S228P (根據Kabat EU索引編號)。為了進一步降低其對Fc受體之結合親和力及/或其效應子功能，在一個實施例中，IgG₄ Fc域包含位置L235處之胺基酸取代，特定言之胺基酸取代L235E (根據Kabat EU索引編號)。在另一實施例中，IgG₄ Fc域包含位置P329處之胺基酸取代，具體言之胺基酸取代P329G (根據Kabat EU索引編號)。在一特定實施例中，IgG₄ Fc域包含位置S228、L235及P329處之胺基酸取代，具體言之胺基酸取代S228P、L235E及P329G (根據Kabat EU索引編號)。此類IgG₄ Fc域突變體及其Fc γ 受體結合特性描述於PCT公開案第WO 2012/130831號中，該案以全文引用之方式併入本文中。

【0180】 在一特定實施例中，相較於原生IgG₁ Fc域呈現與Fc受體之結合親和力降低及/或效應子功能降低的Fc域為包含胺基酸取代L234A、L235A及視情況存在之P329G的人類IgG₁ Fc域，或包含胺基酸取代S228P、L235E及視情況存在之P329G的人類IgG₄ Fc域(根據Kabat EU索引編號)。

【0181】 在某些實施例中，Fc域之N糖基化已消除。在一個此類實施例中，Fc域包含位置N297處之胺基酸突變，特定言之丙胺酸置換天冬醯胺的胺基酸取代(N297A)或天冬胺酸置換天冬醯胺的胺基酸取代(N297D) (根據Kabat EU索引編號)。

【0182】 除上文及PCT公開案第WO 2012/130831號中所描述之Fc域之外，Fc受體結合及/或效應子功能降低之Fc域亦包括具有Fc域殘基

238、265、269、270、297、327及329中之一或多者之取代的Fc域(美國專利第6,737,056號)(根據Kabat EU索引編號)。此類Fc突變體包括具有胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或兩者以上之取代的Fc突變體，包括殘基265及297取代為丙胺酸的所謂「DANA」Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。

【0183】 突變Fc域可使用此項技術中熟知之遺傳學或化學方法藉由胺基酸缺失、取代、插入或修飾來製備。遺傳學方法可包括編碼DNA序列之位點特異性突變誘發、PCR、基因合成及其類似方法。正確的核苷酸變化可藉由例如定序來驗證。

【0184】 與Fc受體之結合可容易地測定，例如藉由ELISA，或藉由表面電漿子共振(SPR)，使用標準儀器，諸如BIAcore儀(GE Healthcare)，且可諸如藉由重組表現來獲得Fc受體。替代地，Fc域或包含Fc域之抗體針對Fc受體之結合親和力可使用已知表現特定Fc受體之細胞株(諸如表現FcγIIIa受體之人類NK細胞)來評價。

【0185】 Fc域或包含Fc域之抗體的效應子功能可藉由此項技術中已知之方法量測。用於評定所關注分子之ADCC活性之活體外分析之實例描述於美國專利第5,500,362號；Hellstrom等人 Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)；及Hellstrom等人, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)；美國專利第5,821,337號；Bruggemann等人, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)中。替代地，可採用非放射性分析方法(參見例如用於流式細胞測量術之ACTI™非放射性細胞毒性分析(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI))。適用於此類分析之效應子細胞包

括外周血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。可替代地或另外，可在活體內，例如在動物模型中，諸如Clynes等人，Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)中所揭示之動物模型中評定所關注分子之ADCC活性。

【0186】 在一些實施例中，Fc域與補體組分(具體言之與C1q)的結合降低。因此，在其中Fc域經工程改造而具有降低的效應子功能的一些實施例中，該降低的效應子功能包括降低的CDC。可進行C1q結合分析以判定Fc域或包含Fc域之抗體是否能夠結合C1q且因此具有CDC活性。參見例如WO 2006/029879及WO 2005/100402中之C1q及C3c結合ELISA。為了評定補體活化，可進行CDC分析(參見例如Gazzano-Santoro等人，J Immunol Methods 202, 163 (1996)；Cragg等人，Blood 101, 1045-1052 (2003)；及Cragg及Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004))。

【0187】 亦可使用此項技術中已知之方法(參見例如Petkova, S.B.等人，*Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)；WO 2013/120929)進行FcRn結合及活體內清除/半衰期測定。

【0188】

本發明之特定態樣

在一個態樣中，本發明提供一種免疫結合物，其包含突變型IL-2多肽及與CD8結合之抗體，

其中該突變型IL-2多肽為人類IL-2分子，其包含胺基酸取代F42A、Y45A及L72G(相對於人類IL-2序列SEQ ID NO: 13編號)；及

其中該抗體包含：(a)重鏈可變區(VH)，其包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列；及(b)輕鏈可變區(VL)，其包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列。

【0189】 在一個態樣中，本發明提供一種免疫結合物，其包含突變型IL-2多肽及與CD8結合之抗體，

其中該突變型IL-2多肽為人類IL-2分子，其包含胺基酸取代T3A、F42A、Y45A、L72G及C125A（相對於人類IL-2序列SEQ ID NO: 13編號）；及

其中該抗體包含：(a)重鏈可變區(VH)，其包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列；及(b)輕鏈可變區(VL)，其包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列。

【0190】 在一個態樣中，本發明提供一種免疫結合物，其包含突變型IL-2多肽及與CD8結合之抗體，

其中該突變型IL-2多肽包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列；及

其中該抗體包含：(a)重鏈可變區(VH)，其包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列；及(b)輕鏈可變區(VL)，其包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列。

【0191】 在一個實施例中，根據本發明之任一上述態樣，抗體為IgG類免疫球蛋白，其包含由第一及第二次單元構成的人類IgG₁ Fc域，

其中在Fc域之第一次單元中，位置366處之蘇胺酸殘基經色胺酸殘基置換(T366W)，且在Fc域之第二次單元中，位置407處之酪胺酸殘基經纈胺酸殘基置換(Y407V)且視情況，位置366處之蘇胺酸殘基經絲胺酸殘基置換(T366S)且位置368處之白胺酸殘基經丙胺酸殘基置換(L368A)（根據Kabat EU索引編號），

且其中，Fc域中之各次單元進一步包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G (Kabat EU索引編號)。

【0192】 在此實施例中，該突變型IL-2多肽可在其胺基端胺基酸處與Fc域之第一次單元的羧基端胺基酸融合，經由SEQ ID NO: 15之連接肽

融合。

【0193】 在一個態樣中，本發明提供一種免疫結合物，其包含：多肽，其包含與SEQ ID NO:9之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列；多肽，其包含與SEQ ID NO:10之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列；及多肽，其包含與SEQ ID NO:11之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。

【0194】 在一較佳實施例中，本發明提供一種免疫結合物，其包含：多肽，其包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列；多肽，其包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列；及多肽，其包含SEQ ID NO:11之胺基酸序列。在一更佳實施例中，本發明提供一種免疫結合物，其包含：兩條多肽，其包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列；多肽，其包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列；及多肽，其包含SEQ ID NO:11之胺基酸序列。

【0195】 在一個態樣中，本發明提供一種免疫結合物，其包含：多肽，其包含與SEQ ID NO:9之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列；多肽，其包含與SEQ ID NO:10之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列；及多肽，其包含與SEQ ID NO:12之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。

【0196】 在一較佳實施例中，本發明提供一種免疫結合物，其包含：多肽，其包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列；多肽，其包含SEQ ID

NO:10之胺基酸序列；及多肽，其包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列。

【0197】 在另一態樣中，本發明提供一種免疫結合物，其包含突變型IL-2多肽及與CD8結合之抗體，其中該突變型IL-2多肽為包含胺基酸取代F42A、Y45A及L72G（相對於人類IL-2序列SEQ ID NO: 13編號）之人類IL-2分子；且其中該抗體包含：(a)重鏈可變區(VH)，其包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列；及(b)輕鏈可變區(VL)，其包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列。

【0198】 在一個態樣中，本發明提供一種免疫結合物，其包含突變型IL-2多肽及與CD8結合之抗體，其中該突變型IL-2多肽為包含胺基酸取代T3A、F42A、Y45A、L72G及C125A（相對於人類IL-2序列SEQ ID NO: 13編號）之人類IL-2分子；且其中該抗體包含：(a)重鏈可變區(VH)，其包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列；及(b)輕鏈可變區(VL)，其包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列。

【0199】 在一個態樣中，本發明提供一種免疫結合物，其包含突變型IL-2多肽及與CD8結合之抗體，其中該突變型IL-2多肽包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列；且其中該抗體包含：(a)重鏈可變區(VH)，其包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列；及(b)輕鏈可變區(VL)，其包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列。

【0200】 在一個實施例中，根據本發明之任一上述態樣，抗體為IgG類免疫球蛋白，其包含由第一及第二次單元構成的人類IgG₁ Fc域，

其中在Fc域之第一次單元中，位置366處之蘇胺酸殘基經色胺酸殘基置換(T366W)，且在Fc域之第二次單元中，位置407處之酪胺酸殘基經纈胺酸殘基置換(Y407V)且視情況位置366處之蘇胺酸殘基經絲胺酸殘基置

換(T366S)及位置368處之白胺酸殘基經丙胺酸殘基置換(L368A) (根據Kabat EU索引編號), 且其中Fc域之各次單元進一步包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G (Kabat EU索引編號)。

【0201】 在此實施例中, 該突變型IL-2多肽可在其胺基端胺基酸處與Fc域之第一次單元的羧基端胺基酸融合, 經由SEQ ID NO: 15之連接肽融合。

【0202】 在一個態樣中, 本發明提供一種免疫結合物, 其包含: 多肽, 其包含與SEQ ID NO:30之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列; 多肽, 其包含與SEQ ID NO:10之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列; 及多肽, 其包含與SEQ ID NO:11之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。

【0203】 在一較佳實施例中, 本發明提供一種免疫結合物, 其包含: 多肽, 其包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列; 多肽, 其包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列; 及多肽, 其包含SEQ ID NO:11之胺基酸序列。在一更佳實施例中, 本發明提供一種免疫結合物, 其包含: 兩條多肽, 其包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列; 多肽, 其包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列; 及多肽, 其包含SEQ ID NO:11之胺基酸序列。

【0204】 在一個態樣中, 本發明提供一種免疫結合物, 其包含: 多肽, 其包含與SEQ ID NO:30之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列; 多肽, 其包含與SEQ ID NO:10之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%一致的胺基酸序列；及多肽，其包含與SEQ ID NO:12之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的胺基酸序列。

【0205】 在一較佳實施例中，本發明提供一種免疫結合物，其包含：多肽，其包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列；多肽，其包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列；及多肽，其包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列。

【0206】

聚核苷酸

本發明進一步提供編碼如本文所描述之免疫結合物或其片段之經分離之聚核苷酸。在一些實施例中，該片段為抗原結合片段。

【0207】 編碼本發明之免疫結合物之聚核苷酸可作為編碼完整免疫結合物的單一聚核苷酸或作為共表現的多種(例如兩種或更多種)聚核苷酸表現。由共表現之聚核苷酸編碼之多肽可以經由例如二硫鍵或其他方式結合，以形成功能性免疫結合物。舉例而言，抗體之輕鏈部分可由來自包含抗體重鏈部分及突變型IL-2多肽之免疫結合物之部分的個別聚核苷酸編碼。當共表現時，重鏈多肽與輕鏈多肽結合而形成免疫結合物。在另一實施例中，包含兩種Fc域次單元之一及突變型IL-2多肽之免疫結合物的部分可由來自包含兩種Fc域次單元之另一者之免疫結合物之該部分的個別聚核苷酸編碼。當共表現時，Fc域次單元將結合以形成Fc域。

【0208】 在一些實施例中，經分離之聚核苷酸編碼如本文所描述之根據本發明之完整免疫結合物。在其他實施例中，經分離之聚核苷酸編碼如本文所描述之根據本發明之免疫結合物中所包含之多肽。

【0209】 在一個實施例中，本發明之經分離之聚核苷酸編碼免疫結

合物中所包含之抗體之重鏈(例如免疫球蛋白重鏈)及突變型IL-2多肽。在另一實施例中，本發明之經分離之聚核苷酸編碼免疫結合物中所包含之抗體之輕鏈。

【0210】 在某些實施例中，該聚核苷酸或核酸為DNA。在其他實施例中，本發明之聚核苷酸為RNA，例如呈信使RNA (mRNA)形式。本發明之RNA可為單股或雙股的。

【0211】

重組方法

適用於本發明之突變型IL-2多肽可使用此項技術中熟知之遺傳學或化學方法，藉由缺失、取代、插入或修飾來製備。遺傳學方法可包括編碼DNA序列之位點特異性突變誘發、PCR、基因合成及其類似方法。正確的核苷酸變化可藉由例如定序來驗證。就此而言，原生IL-2之核苷酸序列已由Taniguchi等人描述(Nature 302, 305-10 (1983))且編碼人類IL-2之核酸獲自公共保藏機構，諸如美國菌種保藏中心(American Type Culture Collection, Rockville MD)。原生人類IL-2之序列顯示於SEQ ID NO: 13中。取代或插入可能涉及天然以及非天然胺基酸殘基。胺基酸修飾包括熟知的化學修飾方法，諸如添加醣基化位點或碳水化合物連接及其類似方法。

【0212】 本發明之免疫結合物可例如藉由固態肽合成(例如梅里菲爾德固相合成(Merrifield solid phase synthesis))或重組產生獲得。為了重組產生，分離出編碼免疫結合物(片段)之一或多種聚核苷酸(例如如上文所描述)且插入一或多種載體中以便進一步選殖於宿主細胞中及/或在宿主細胞中表現。此類聚核苷酸可使用習知程序容易地分離及定序。在一個實

施例中，提供包含本發明之一或多種聚核苷酸的載體，較佳為表現載體。熟習此項技術者已熟知的方法可以用於構築含有免疫結合物(片段)之編碼序列以及適當轉錄/轉譯控制信號的表現載體。此等方法包括活體外重組DNA技術、合成技術及活體內重組/基因重組。參見例如Maniatis等人，**MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL**, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989)；及 Ausubel 等人，**CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY**, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989)中所描述之技術。表現載體可為質體、病毒之一部分，或可為核酸片段。表現載體包括表現卡匣，編碼免疫結合物(片段)的聚核苷酸(亦即編碼區)與啟動子及/或其他轉錄或轉譯控制元件以可操作結合方式選殖於該表現卡匣中。如本文所用，「編碼區」為由轉譯成胺基酸之密碼子組成的核酸之一部分。雖然「終止密碼子」(TAG、TGA或TAA)未轉譯成胺基酸，但可將其視為編碼區(若存在)之一部分，但任何側接序列(例如啟動子、核糖體結合位點、轉錄終止子、內含子、5'及3'非轉譯區及類似序列)不為編碼區之一部分。在單一聚核苷酸構築體中，例如在單一載體上，或在單獨聚核苷酸構築體中，例如在單獨(不同)載體上，可存在兩個或更多個編碼區。此外，任何載體可含有單一編碼區，或可包含兩個或更多個編碼區，例如本發明之載體可編碼一或多個多肽，其經由蛋白質裂解而轉譯後或共轉譯分離成最終蛋白質。另外，本發明之載體、聚核苷酸或核酸可編碼異源編碼區，該等異源編碼區與編碼本發明之免疫結合物或其變體或衍生物的聚核苷酸融合或不融合。異源編碼區包括(但不限於)專用元件或基元，諸如分泌性信號肽或異源功能域。可操作結合為當基因產物(例如多肽)之編碼區與一或多個調控

序列以使得基因產物之表現置於調控序列之影響或控制下的方式結合時。若誘導啟動子功能導致編碼所要基因產物之mRNA轉錄且若兩個DNA片段之間連接的性質不干擾表現調控序列導引基因產物表現的能力或不干擾DNA模板轉錄的能力，則兩個DNA片段(諸如多肽編碼區及與其結合的啟動子)為「可操作地結合」。因此，若啟動子能夠影響該核酸之轉錄，則啟動子區域與編碼多肽之核酸可操作地結合。啟動子可為僅導引預定細胞中之DNA實質性轉錄之細胞特異性啟動子。除啟動子以外的其他轉錄控制元件(例如增強子、操縱子、抑制子及轉錄終止信號)可與引導細胞特異性轉錄之聚核苷酸可操作地結合。適合的啟動子及其他轉錄控制區揭示於本文中。多個轉錄控制區已為熟習此項技術者所知。此等區域包括(但不限於)在脊椎動物細胞中起作用的轉錄控制區，諸如(但不限於)啟動子及增強子區段，其來自巨細胞病毒(例如即刻早期啟動子，連同內含子-A)、猿猴病毒40(例如早期啟動子)及反轉錄病毒(諸如勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus))。其他轉錄控制區包括來源於脊椎動物基因(諸如肌動蛋白、熱休克蛋白、牛生長激素及兔 β -血球蛋白)之彼等區，以及能夠控制真核細胞中之基因表現的其他序列。其他適合的轉錄控制區包括組織特異性啟動子及增強子以及誘導性啟動子(例如啟動子誘導性四環素(tetracyclin))。類似地，多種轉譯控制元件已為一般技術者所知。此等元件包括(但不限於)核糖體結合位點、轉譯起始及終止密碼子，以及來源於病毒系統的元件(特定言之，內部核糖體進入位點或IRES，亦稱為CITE序列)。表現卡匣亦可包括其他特徵，諸如複製起點，及/或染色體整合元件，諸如反轉錄病毒長末端重複序列(LTR)，或腺相關聯病毒(AAV)反向末端重複序列(ITR)。

【0213】 本發明之聚核苷酸及核酸編碼區可能與編碼分泌性肽或信號肽的其他編碼區連接，從而導引由本發明之聚核苷酸編碼的多肽之分泌。根據信號假設，哺乳動物細胞所分泌之蛋白質具有信號肽或分泌性前導序列，一旦生長蛋白質鏈跨越粗糙內質網之輸出已起始，該信號肽或分泌性前導序列自成熟蛋白質裂解下。一般熟習此項技術者認識到，脊椎動物細胞分泌的多肽通常具有與多肽之N端融合的信號肽，該信號肽自所轉譯之多肽裂解以產生呈分泌或「成熟」形式的多肽。舉例而言，人類IL-2經由位於多肽N端之20個胺基酸信號序列轉譯，該信號序列隨後裂解而產生成熟的133個胺基酸人類IL-2。在某些實施例中，使用原生信號肽，例如IL-2信號肽或免疫球蛋白重鏈或輕鏈信號肽，或彼序列之保持導引與其可操作地連接之多肽分泌之能力的功能衍生物。可替代地，可使用異源哺乳動物信號肽，或其功能衍生物。舉例而言，野生型前導序列可經人類組織纖維蛋白溶酶原活化因子(TPA)或小鼠 β -葡糖醛酸酶之前導序列取代。

【0214】 在編碼免疫結合物(片段)之聚核苷酸內或在該聚核苷酸之末端處，可包括編碼可用以幫助後續純化(例如組胺酸標籤)或有助於標記免疫結合物之短蛋白質序列的DNA。

【0215】 在又一實施例中，提供一種宿主細胞，其包含本發明之一或多種聚核苷酸。在某些實施例中，提供一種宿主細胞，其包含本發明之一或多種載體。聚核苷酸及載體可單獨或組合地併有本文分別與聚核苷酸及載體相關描述之任一特徵。在一個此類實施例中，宿主細胞包含一或多種載體(例如已經該等載體轉化或轉染)，該等載體包含編碼本發明之免疫結合物之一或多種聚核苷酸。如本文所用，術語「宿主細胞」係指任何種類的細胞系統，其可經工程改造以產生本發明之免疫結合物或其片段。適

合於複製及支持免疫結合物表現的宿主細胞在此項技術中已熟知。此類細胞在適當時可經特定表現載體轉染或轉導，且可以培養含有大量載體之細胞以用於接種大型醱酵槽，從而獲得足量的免疫結合物用於臨床應用。適合的宿主細胞包括原核微生物，諸如大腸桿菌，或各種真核生物細胞，諸如中國倉鼠卵巢細胞(CHO)、昆蟲細胞或其類似物。舉例而言，可在細菌中產生多肽，尤其在不需糖基化時。表現之後，可自可溶性部分中之細菌細胞漿中分離出多肽且可對該多肽進一步純化。除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為適用於編碼多肽之載體的選殖或表現宿主，包括糖基化路徑已經「人類化」，從而產生具有部分或完全人類糖基化型態之多肽的真菌及酵母菌株。參見Gerngross, *Nat Biotech* 22, 1409-1414 (2004)，及Li等人, *Nat Biotech* 24, 210-215 (2006)。適用於表現(糖基化)多肽的宿主細胞亦來源於多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包含植物細胞及昆蟲細胞。已鑑別出眾多可與昆蟲細胞結合使用，尤其用於轉染草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞之桿狀病毒株。植物細胞培養物亦可用作宿主。參見例如美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號(描述在轉殖基因植物中產生抗體的PLANTIBODIES™技術)。脊椎動物細胞亦可用作宿主。舉例而言，適於在懸浮液中生長之哺乳動物細胞株可為適用的。適用哺乳動物宿主細胞株之其他實例為經SV40轉化的猴腎CV1細胞株(COS-7)；人類胚腎細胞株(293或293T細胞，如例如Graham等人, *J Gen Virol* 36, 59 (1977)中所描述)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠塞特利氏細胞(mouse sertoli cells) (TM4細胞，如例如Mather, *Biol Reprod* 23, 243-251 (1980)中所描述)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-

76)；人類子宮頸癌細胞(HELA)；犬腎細胞(MDCK)；水牛鼠肝細胞(BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤細胞(MMT 060562)；TRI細胞(如例如Mather等人, *Annals N. Y. Acad Sci* 383, 44-68 (1982)中所描述)；MRC 5細胞及FS4細胞。其他適用之哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括dhfr⁻ CHO細胞(Urlaub等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 4216 (1980))；及骨髓瘤細胞株，諸如YO、NS0、P3X63及Sp2/0。關於適用於蛋白質產生之某些哺乳動物宿主細胞株之綜述，參見例如Yazaki及Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷(B.K.C. Lo編, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268頁 (2003)。宿主細胞包括經培養細胞，例如經培養之哺乳動物細胞、酵母細胞、昆蟲細胞、細菌細胞及植物細胞(僅舉數例)，且亦包括轉殖基因動物、轉殖基因植物或經培養之植物或動物組織中所包含的細胞。在一個實施例中，宿主細胞為真核細胞，較佳為哺乳動物細胞，諸如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、人胎腎(HEK)細胞或淋巴細胞(例如YO、NS0、Sp20細胞)。

【0216】 在此等系統中表現外源基因之標準技術為此項技術中已知的。表現與抗體之重鏈或輕鏈融合之突變型IL-2多肽的細胞可以經工程改造，以便亦表現其他抗體鏈，使得經表現的突變型IL-2融合產物為具有重鏈與輕鏈的抗體。

【0217】 在一個實施例中，提供一種製備根據本發明之免疫結合物的方法，其中該方法包含在適於表現免疫結合物的條件下培養如本文所提供之包含一或多種編碼免疫結合物之聚核苷酸的宿主細胞，及視情況自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收免疫結合物。

【0218】 在本發明之免疫結合物中，突變型IL-2多肽可與抗體遺傳

地融合，或可與抗體化學地結合。可設計IL-2多肽與抗體之基因融合，使得IL-2序列直接與多肽融合或經由連接子序列間接融合。連接子之組成及長度可根據此項技術中熟知之方法判定且可測試其功效。本文中描述了特定連接肽。亦可包括額外序列以併入裂解位點，以在必要時分離融合體之個別組分，該等額外序列例如肽鏈內切酶識別序列。另外，亦可使用此項技術中熟知的多肽合成方法(例如梅里菲爾德固相合成)，以化學方式合成IL-2融合蛋白。可使用熟知的化學結合方法，以化學方式使突變型IL-2多肽與其他分子(例如抗體)結合。出於此目的，可使用雙官能交聯劑，諸如此項技術中熟知的同官能及雜官能交聯劑。使用的交聯劑類型視與IL-2偶聯的分子性質而定且可容易地由熟習此項技術者鑑別。替代地或另外，希望結合的突變型IL-2及/或分子可以化學方式衍生化，使得兩者可以此項技術中亦熟知的個別反應結合。

【0219】 本發明之免疫結合物包含抗體。產生抗體之方法為此項技術中熟知的(參見例如Harlow及Lane, 「Antibodies, a laboratory manual」, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。非天然存在之抗體可使用固相肽合成法來構築，可以重組方式產生(例如，如美國專利第4,186,567號中所描述)或可藉由例如篩選包含可變重鏈及可變輕鏈之組合庫來獲得(參見例如McCafferty之美國專利第5,969,108號)。免疫結合物、抗體及其產生方法亦詳細地描述於例如PCT公開案第WO 2011/020783號、第WO 2012/107417號及第WO 2012/146628中，該等案中之各者以全文引用之方式併入本文中。

【0220】 在本發明之免疫結合物中可使用任何動物物種之抗體。適用於本發明之非限制性抗體可為鼠類、靈長類或人類來源。若免疫結合物

旨在用於人類用途，則可以使用嵌合形式之抗體，其中抗體恆定區來自人類。呈人類化或完全人類形式之抗體亦可根據此項技術中熟知之方法製備(參見例如Winter之美國專利第5,565,332號)。人類化可藉由多種方法來達成，包括(但不限於)：(a)將非人類(例如供體抗體) CDR移植至人類(例如受體抗體)構架區及恆定區上，保留或不保留關鍵構架殘基(例如對於保留良好抗原結合親和力或抗體功能而言具有重要作用之彼等殘基)；(b)僅將非人類特異性決定區(SDR或a-CDR；對於抗體-抗原相互作用而言具有關鍵作用之殘基)移植至人類構架區及恆定區上；或(c)移植整個非人類可變域，但藉由表面殘基置換而用人類類似區段對其進行「遮掩」。人類化抗體及其製備方法評述於例如Almagro及Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)中，且進一步描述於例如Riechmann等人, *Nature* 332:323-329 (1988)；Queen等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989)；美國專利第5,821,337號、第7,527,791號、第6,982,321號及第7,087,409號；Kashmiri等人, *Methods* 36:25-34 (2005) (描述特異性決定區(SDR)移植)；Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (描述「表面再塑」)；Dall'Acqua等人, *Methods* 36:43-60 (2005) (描述「FR改組」)；及Osbourn等人, *Methods* 36:61-68 (2005)及Klimka等人, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (描述FR改組之「導引選擇」方法)。可用於人類化之人類構架區包括(但不限於)：使用「最佳擬合(best-fit)」法選擇之構架區(參見例如Sims等人, *J. Immunol.* 151:2296 (1993))；來源於具有輕鏈或重鏈可變區之特定子組之人類抗體的共同序列之構架區(參見例如Carter等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)；及Presta等人, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993))；人類成熟(體細胞突變)構架區或人類

生殖系構架區(參見例如Almagro及Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008))；及來源於篩選FR庫之構架區(參見例如Baca等人, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997)及Rosok等人, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996))。

【0221】 可使用此項技術中已知之各種技術來產生人類抗體。人類抗體大體上描述於van Dijk及van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001)及Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008)中。人類抗體可藉由向已經改造可回應於抗原挑戰而產生完整人類抗體或具有人類可變區之完整抗體的轉殖基因動物投與免疫原來製備。此類動物通常含有人類免疫球蛋白基因座的全部或一部分，其置換內源性免疫球蛋白基因座，或存在於染色體外或隨機整合至動物染色體中。在此類轉殖基因小鼠中，內源性免疫球蛋白基因座一般已失活。關於自轉殖基因動物獲得人類抗體之方法的綜述，參見Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。亦參見例如描述XENOMOUSE™技術之美國專利第6,075,181號及第6,150,584號；描述HUMAB®技術之美國專利第5,770,429號；描述美K-M MOUSE®技術之國專利第7,041,870號；及描述VELOCIMOUSE®技術之美國專利申請公開案第US 2007/0061900號。可進一步修飾由此類動物產生之完整抗體之人類可變區，例如藉由與不同人類恆定區組合。

【0222】 人類抗體亦可藉由基於融合瘤之方法製備得。已描述用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株。(參見例如Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984)；Brodeur等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第51-63頁 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及Boerner等人, *J. Immunol.*, 147: 86

(1991))。經由人類B細胞融合瘤技術產生之人類抗體亦描述於Li等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)中。其他方法包括例如美國專利第7,189,826號(描述自融合瘤細胞株產生單株人類IgM抗體)及Ni, *Xiandai Mianyixue* 26(4):265-268 (2006) (描述人類-人類融合瘤)中所描述之彼等方法。人類融合瘤技術(三源融合瘤技術(Trioma technology))亦描述於 Vollmers 及 Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005), 及 Vollmers 及 Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)中。

【0223】 人類抗體亦可藉由自人類抗體庫分離而產生，如本文所描述。

【0224】 適用於本發明之抗體可藉由自組合庫中篩選出具有所需一或多種活性之抗體來分離出。用於篩選組合庫之方法評述於例如Lerner等人之*Nature Reviews* 16:498-508 (2016)中。舉例而言，此項技術中已知用於產生噬菌體呈現庫及篩選此類庫中之具有所需結合特徵之抗體的多種方法。此類方法評述於例如Frenzel等人之*mAbs* 8:1177-1194 (2016)；Bazan 等人之*Human Vaccines and Immunotherapeutics* 8:1817-1828 (2012) 及 Zhao 等人之*Critical Reviews in Biotechnology* 36:276-289 (2016)以及Hoogenboom等人之*Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人編, Human Press, Totowa, NJ, 2001)及Marks及Bradbury之*Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo 編, Human Press, Totowa, NJ, 2003)中。

【0225】 在某些噬菌體呈現方法中，VH及VL基因之譜系分別藉由聚合酶鏈式反應(PCR)選殖且在噬菌體文庫中隨機重組，接著可如Winter

等人之*Annual Review of Immunology* 12: 433-455 (1994)中所描述，篩選抗原結合噬菌體。噬菌體典型地呈現呈單鏈Fv (scFv)片段或Fab片段形式之抗體片段。來自經免疫之來源之庫提供對免疫原之高親和力抗體而無需構築融合瘤。替代地，可選殖(例如自人類)原生譜系以提供對廣泛範圍之非自體抗原以及自體抗原之單一抗體來源而無需任何免疫接種，如Griffiths等人之*EMBO Journal* 12: 725-734 (1993)中所描述。最終，原生庫亦可以合成方式藉由自幹細胞選殖未經重排之V基因區段，且使用含有隨機序列以編碼高度可變CDR3區及實現活體外重排之PCR引子來製得，如由Hoogenboom及Winter之*Journal of Molecular Biology* 227: 381-388 (1992)中所描述。描述人類抗體噬菌體庫之專利公開案包括例如美國專利第5,750,373號、第7,985,840號、第7,785,903號及第8,679,490號，以及美國專利公開案第2005/0079574號、第2007/0117126號、第2007/0237764號及第2007/0292936號。此項技術中已知用於針對具有一或多種所需活性之抗體篩選組合庫的方法之其他實例包括核糖體及mRNA呈現，以及用於細菌、哺乳動物細胞、昆蟲細胞或酵母細胞上之抗體呈現及選擇的方法。用於酵母表面呈現之方法評述於例如Scholler等人之*Methods in Molecular Biology* 503:135-56 (2012)及Cherf等人之*Methods in Molecular biology* 1319:155-175 (2015)以及Zhao等人之*Methods in Molecular Biology* 889:73-84 (2012)中。用於核糖體呈現之方法描述於例如He等人之*Nucleic Acids Research* 25:5132-5134 (1997)及Hanes等人之*PNAS* 94:4937-4942 (1997)。

【0226】 可能需要對本發明之免疫結合物作進一步化學修飾。舉例而言，藉由與實質上直鏈聚合物(諸如聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇(PPG))

結合可改良免疫原性及短半衰期之問題(參見例如WO 87/00056)。

【0227】 如本文所描述製備之免疫結合物可藉由此項技術中已知的技術(諸如高效液相層析、離子交換層析、凝膠電泳、親和力層析、尺寸排阻層析及其類似技術)純化。用於純化特定蛋白質之實際條件部分地視諸如淨電荷、疏水性、親水性等因素而定，且對於熟習此項技術者而言為顯而易見的。對於親和層析純化而言，可使用免疫結合物所結合之抗體、配體、受體或抗原。舉例而言，可使用特異性結合突變型IL-2多肽的抗體。對於親和層析而言，可使用具有蛋白質A或蛋白質G之基質純化本發明之免疫結合物。舉例而言，可以基本上如實例中所描述，使用依序進行的蛋白質A或G親和層析及尺寸排阻層析來分離免疫結合物。免疫結合物之純度可以藉由多種熟知分析方法中之任一種來測定，包括凝膠電泳、高壓液相層析及其類似方法。

【0228】

組合物、調配物及投藥途徑

在另一態樣中，本發明提供包含如本文中所描述之免疫結合物的醫藥組合物，例如供任一種下述治療方法使用。在一個實施例中，醫藥組合物包含本文提供之任一種免疫結合物及醫藥學上可接受之載劑。在另一實施例中，醫藥組合物包含本文提供之任一種免疫結合物及至少一種額外治療劑，例如如下文所描述。

【0229】 另外提供一種產生呈適於活體內投與形式之本發明之免疫結合物的方法，該方法包含(a)獲得根據本發明之免疫結合物，及(b)用至少一種醫藥學上可接受之載劑調配該免疫結合物，其中免疫結合物製劑係針對活體內投與而調配。

【0230】 本發明之醫藥組合物包含溶解或分散於醫藥學上可接受之載劑中之治療有效量的免疫結合物。片語「醫藥學上或藥理學上可接受」係指分子實體及組合物在所用劑量及濃度下對於接受者而言一般為無毒性的，亦即當適當時向動物(諸如人類)投與時，不會產生有害的過敏反應或其他不良反應。熟習此項技術者依據本發明將得知含有免疫結合物及視情況存在之額外活性成分的醫藥組合物之製備，如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Printing Company, 1990所例示，該文獻以引用之方式併入本文中。此外，關於動物(例如人類)投藥，應瞭解，製劑應滿足FDA生物學標準局(FDA Office of Biological Standards)或其他國家之對應機關所要求的無菌性、發熱性、總體安全及純度標準。較佳組合物為凍乾調配物或水溶液。如本文所用，術語「醫藥學上可接受之載劑」包括如熟習此項技術者將已知的任何及所有溶劑、緩衝劑、分散介質、包衣、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗細菌劑、抗真菌劑)、等張劑、吸收延遲劑、鹽、抗氧化劑、蛋白質、藥物、藥物穩定劑、聚合物、凝膠、黏合劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、調味劑、染料及其類似材料及其組合(參見例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Printing Company, 1990, 第1289-1329頁，其以引用之方式併入本文中)。除非任何習知載劑與活性成分不相容，否則考慮其在治療或醫藥組合物中之用途。

【0231】 本發明之免疫結合物(及任何其他治療劑)可藉由任何適合之方式，包括非經腸、肺內及鼻內且必要時針對局部治療，病灶內投與來投與。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投與。部分地視投藥之短期或長期性而定，給藥可藉由任何適合之途徑(例如藉由

注射，諸如靜脈內或皮下注射)來進行。

【0232】非經腸組合物包括為藉由注射(例如皮下、皮內、病灶內、靜脈內、動脈內、肌肉內、鞘內或腹膜內注射)投藥所設計的彼等組合物。對於注射而言，本發明之免疫結合物可以在水溶液中，較佳在生理學上相容之緩衝液(諸如漢克氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理鹽水緩衝液)中調配。溶液可含有調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。替代地，免疫結合物可呈粉末形式，其在使用之前用適合媒劑(例如無菌無熱原質水)復原。必要時，藉由將所需量之本發明之免疫結合物與下文列舉之多種其他成分一起併入適當溶劑中來製備無菌可注射溶液。無菌性可容易藉由例如無菌過濾膜過濾來實現。一般而言，分散液係藉由將各種經滅菌之活性成分併入含有基本分散介質及/或其他成分的無菌媒劑中來製備。在無菌粉末用於製備無菌可注射溶液、懸浮液或乳液之情況下，較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥技術，其利用預先無菌過濾之液體介質產生活性成分與任何其他所需成分之粉末。必要時，液體介質宜經緩衝，且在與足夠生理鹽水或葡萄糖一起注射之前首先用液體稀釋劑產生等張性。該組合物在製造及儲存條件下必須為穩定的，且必須避免諸如細菌及真菌之微生物的污染作用。應瞭解，內毒素污染應最低限度地保持在安全水準，例如低於0.5 ng/mg蛋白質。適合的醫藥學上可接受之載劑包括(但不限於)：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苯甲基銨；氯化六羥季銨；苯紫氯銨(benzalkonium chloride)；苜索氯銨(benzethonium chloride)；苯酚、丁醇或苯甲醇；對羥苯甲酸烷基酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環

己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽抗衡離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子性界面活性劑，諸如聚乙二醇(PEG)。水性注射懸浮液可含有增加懸浮液黏度之化合物，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇、聚葡萄糖或其類似物。視情況，懸浮液亦可含有適合的穩定劑或增加化合物溶解性之藥劑以允許製備高度濃縮之溶液。另外，活性化合物之懸浮液可視需要製備成油性注射懸浮液。適合的親脂性溶劑或媒劑包括脂肪油，諸如芝麻油；或合成脂肪酸酯，諸如油酸乙酯或三酸甘油酯；或脂質體。

【0233】 活性成分可包覆於微膠囊中，例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合法所製備之微膠囊，例如分別為羧甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊；包覆於膠態藥物遞送系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)中或巨乳液中。此類技術揭示於 Remington's Pharmaceutical Sciences (第 18 版, Mack Printing Company, 1990)中。可以製備持續釋放型製劑。持續釋放型製劑之適合實例包括含有多肽之固體疏水性聚合物之半滲透基質，該等基質呈成形物品形式，例如膜或微膠囊。在特定實施例中，可藉由在組合物中使用延遲吸收之藥劑，諸如單硬脂酸鋁、明膠或其組合來延長可注射組合物之吸收。

【0234】 除先前描述之組合物以外，免疫結合物亦可調配成儲槽式

製劑。此類長效調配物可藉由植入(例如皮下或肌肉內植入)或藉由肌肉內注射來投與。因此，舉例而言，免疫結合物可用適合的聚合物或疏水性材料調配(例如在可接受之油中調配成乳液)或用離子交換樹脂調配，或調配成微溶衍生物，例如微溶鹽。

【0235】 包含本發明之免疫結合物的醫藥組合物可藉助於習知混合、溶解、乳化、囊封、包覆或凍乾製程製造。醫藥組合物可使用生理學上可接受之有利於將蛋白質處理成可在醫藥學上使用之製劑的一或多種載劑、稀釋劑、賦形劑或助劑，以習知方式調配。適當之調配物視所選擇之投藥途徑而定。

【0236】 免疫結合物可調配成呈游離酸或鹼、中性或鹽形式的組合物。醫藥學上可接受之鹽為實質上保留游離酸或鹼之生物活性的鹽。此等鹽包括酸加成鹽，例如與蛋白質組合物之游離胺基形成的鹽，或與無機酸(諸如鹽酸或磷酸)或有機酸(諸如乙酸、草酸、酒石酸或杏仁酸)形成的鹽。與自由羧基形成的鹽亦可衍生自無機鹼，諸如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣或氫氧化鐵；或有機鹼，諸如異丙胺、三甲胺、組胺酸或普魯卡因(procaine)。相較於對應游離鹼形式，醫藥鹽傾向於更溶於水性及其他質子溶劑中。

【0237】

治療方法及組合物

本文提供之任一種免疫結合物可用於治療方法中。本發明之免疫結合物可用作免疫治療劑，例如治療癌症的免疫治療劑。

【0238】 為了用於治療方法中，本發明之免疫結合物將以符合良好醫學實踐的方式調配、給藥及投與。在此情形下，考慮因素包括所治療之

特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症之病因、藥劑遞送位點、投藥方法、投藥時程及從醫者已知之其他因素。

【0239】 本發明之免疫結合物可以尤其適用於治療其中刺激宿主免疫系統有益的疾病狀態，特定而言，其中需要增強的細胞免疫反應的病狀。此等疾病狀態可以包括其中宿主免疫反應不足或缺乏的疾病狀態。可投與本發明之免疫結合物的疾病狀態包含例如其中細胞免疫反應將為特定免疫之關鍵機制的腫瘤或感染。本發明之免疫結合物可以本身或以任何適合的醫藥組合物投與。

【0240】 在一個態樣中，提供用作藥劑之本發明之免疫結合物。在其他態樣中，提供用於治療疾病之本發明之免疫結合物。在某些實施例中，提供治療方法用的本發明之免疫結合物。在一個實施例中，本發明提供用於治療有需要之個體之疾病之如本文所描述的免疫結合物。在某些實施例中，本發明提供治療患有疾病之個體之方法中使用的免疫結合物，其包含向該個體投與治療有效量之免疫結合物。在某些實施例中，待治療之疾病為增生性病症。在一特定實施例中，疾病為癌症。在某些實施例中，該方法進一步包含向個體投與治療有效量之至少一種額外治療劑，例如若待治療之疾病為癌症，則投與抗癌劑。在其他實施例中，本發明提供用於刺激免疫系統的免疫結合物。在某些實施例中，本發明提供刺激個體之免疫系統之方法中使用的免疫結合物，該方法包含向個體投與有效量之刺激免疫系統的免疫結合物。根據任一上述實施例之「個體」為哺乳動物，較佳為人類。根據任一上述實施例之「免疫系統之刺激」可包括以下中之任一者或多者：免疫功能的整體提高、T細胞功能的提高、B細胞功能的提高、淋巴球功能的恢復、IL-2受體表現的增強、T細胞反應的增強、自然

殺手細胞活性或淋巴介質活化的殺手(LAK)細胞活性的增強，及其類似者。

【0241】 在另一態樣中，本發明提供一種本發明之免疫結合物之用途，其用於製造或製備藥劑。在一個實施例中，該藥劑係用於治療有需要之個體的疾病。在一個實施例中，藥物係用於治療疾病之方法中，該方法包含向患有疾病之個體投與治療有效量之藥物。在某些實施例中，待治療之疾病為增生性病症。在一特定實施例中，疾病為癌症。在一個實施例中，該方法進一步包含向個體投與治療有效量之至少一種額外治療劑，例如若待治療之疾病為癌症，則投與抗癌劑。在另一個實施例中，該藥劑係用於刺激免疫系統。在另一實施例中，該藥劑係用於刺激個體之免疫系統的方法中，該方法包含向個體投與有效量之刺激免疫系統的藥劑。根據任一上述實施例之「個體」可為哺乳動物，較佳為人類。根據任一上述實施例之「免疫系統之刺激」可包括以下中之任一者或多者：免疫功能的整體提高、T細胞功能的提高、B細胞功能的提高、淋巴球功能的恢復、IL-2受體表現的增強、T細胞反應的增強、自然殺手細胞活性或淋巴介質活化的殺手(LAK)細胞活性的增強，及其類似者。

【0242】 在另一態樣中，本發明提供一種治療個體疾病之方法。在一個實施例中，該方法包含向患有此類疾病之個體投與治療有效量之本發明之免疫結合物。在一個實施例中，向該個體投與包含本發明之免疫結合物之組合物，該組合物呈醫藥學上可接受之形式。在某些實施例中，待治療之疾病為增生性病症。在一特定實施例中，疾病為癌症。在某些實施例中，該方法進一步包含向個體投與治療有效量之至少一種額外治療劑，例如若待治療之疾病為癌症，則投與抗癌劑。在另一態樣中，本發明提供一

種刺激個體免疫系統的方法，其包含向個體投與有效量之刺激免疫系統的免疫結合物。根據任一上述實施例之「個體」可為哺乳動物，較佳為人類。根據任一上述實施例之「免疫系統之刺激」可包括以下中之任一者或多者：免疫功能的整體提高、T細胞功能的提高、B細胞功能的提高、淋巴球功能的恢復、IL-2受體表現的增強、T細胞反應的增強、自然殺手細胞活性或淋巴介質活化的殺手(LAK)細胞活性的增強，及其類似者。

【0243】 在某些實施例中，所治療之疾病為增生性病變，特定言之癌症。癌症之非限制性實例包括膀胱癌、腦癌、頭頸癌、胰臟癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、子宮癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、食道癌、結腸癌、結腸直腸癌、直腸癌、胃癌、前列腺癌、血液癌、皮膚癌、鱗狀細胞癌、骨癌及腎臟癌。可使用本發明之免疫結合物治療的其他細胞增生性病變包括(但不限於)位於以下中之贅瘤：腹部、骨骼、乳房、消化系統、肝臟、胰臟、腹膜、內分泌腺體(腎上腺、副甲狀腺、垂體、睪丸、卵巢、胸腺、甲狀腺)、眼、頭頸部、神經系統(中樞及周邊)、淋巴系統、骨盆、皮膚、軟組織、脾臟、胸部區域及泌尿生殖系統。亦包括癌前病狀或病變及癌症轉移。在某些實施例中，癌症係選自由以下組成之群：腎癌、皮膚癌、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、腦癌、頭頸癌、前列腺癌及膀胱癌。熟習此項技術者容易認識到，在許多情況下，免疫結合物可能不會提供治癒，而僅僅可能提供部分益處。在一些實施例中，具有一些益處之生理學變化亦視為治療上有益的。因此，在一些實施例中，提供生理學變化之免疫結合物的量視為「有效量」或「治療有效量」。需要治療之個體(subject)、患者或個體(individual)通常為哺乳動物，更特定言之人類。

【0244】 在一些實施例中，向細胞投與有效量之本發明之免疫結合

物。在其他實施例中，向個體投與治療有效量之本發明之免疫結合物以用於治療疾病。

【0245】 為了預防或治療疾病，本發明之免疫結合物(當單獨或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)的適當劑量視以下而定：待治療之疾病類型、投藥途徑、患者體重、分子類型(例如包含或不包含Fc域)、疾病嚴重程度及過程、免疫結合物是為了預防目的還是為了治療目的而投與、預先或並行治療干預、患者臨床史及對免疫結合物的反應，及主治醫師之判斷。負責投藥的從業者將在任何情況下判定組合物中活性成分之濃度及適用於個別個體的劑量。本文中考慮各種給藥時程，包括(但不限於)單次投藥或在不同時間點的多次投藥、快速投藥及脈衝式輸注。

【0246】 免疫結合物宜一次性或經一系列治療向患者投與。視疾病類型及嚴重程度而定，約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至15 mg/kg (例如0.1 mg/kg -10 mg/kg)之免疫結合物可為向患者投與的初始候選劑量，不論藉由例如一或多次分開投與或藉由連續輸注。視上文所提及之因素而定，一個典型的日劑量可在約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至100 mg/kg 之範圍內或更高。對於歷經數日或更長時間之重複投藥，視病狀而定，治療通常將持續至疾病症狀之所需抑制發生為止。免疫結合物之一種例示性劑量將在約0.005 mg/kg 至約10 mg/kg 之範圍內。在其他非限制性實例中，劑量亦可包含每次投與約1微克/公斤/體重、約5微克/公斤/體重、約10微克/公斤/體重、約50微克/公斤/體重、約100微克/公斤/體重、約200微克/公斤/體重、約350微克/公斤/體重、約500微克/公斤/體重、約1毫克/公斤/體重、約5毫克/公斤/體重、約10毫克/公斤/體重、約50毫克/公斤/體重、約100毫克/公斤/體重、約200毫克/公斤/體重、約350毫克/公斤/體重、約500毫克/公斤/體重至約1000 毫克/公

斤/體重或更大，及可在其中導出之任何範圍。在本文所列數值之可導出範圍之非限制性實例中，基於上述數值，可投與的範圍為約5毫克/公斤/體重至約100毫克/公斤/體重、約5毫克/公斤/體重至約500毫克/公斤/體重等。因此，可向患者投與約0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、5.0 mg/kg或10 mg/kg (或其任何組合)中之一或多個劑量。此類劑量可以間歇性地投與，例如每週或每三週(例如使得患者接受約兩次至約二十次或例如約六次劑量的免疫結合物)。可投與初始較高起始劑量，接著可投與一或多個較低劑量。然而，其他給藥方案可為適用的。此療法之進展易於藉由習知技術及分析來監測。

【0247】 本發明之免疫結合物通常將以有效達成預定目的的量使用。為了用於治療或預防疾病病狀，本發明之免疫結合物或其醫藥組合物係以治療有效量投與或施用。治療有效量之判定完全在熟習此項技術者之能力範圍內，尤其根據本文所提供之詳細揭示內容。

【0248】 關於全身性投藥，可首先根據活體外分析(諸如細胞培養分析)估計治療有效劑量。可接著在動物模型中調配劑量以達成循環濃度範圍，包括如在細胞培養物中所測定之 IC_{50} 。此類資訊可用於更準確地判定適用於人類之劑量。

【0249】 亦可使用此項技術中熟知的技術根據活體內資料(例如動物模型)估計初始劑量。一般熟習此項技術者容易基於動物資料而使向人類投藥最佳化。

【0250】 劑量及時間間隔可個別地調整以提供足以維持治療效果之免疫結合物血漿含量。常見的患者注射投藥劑量在約0.1至50毫克/公斤/天，通常約0.5至1毫克/公斤/天範圍內。治療有效血漿含量可藉由每日投

與多次劑量來達成。血漿含量可藉由例如HPLC量測。

【0251】 在局部投藥或選擇性吸收之情況下，免疫結合物之局部有效濃度可能與血漿濃度無關。熟習此項技術者能夠使治療有效局部劑量最佳化而無需進行過度實驗。

【0252】 本文所描述之免疫結合物的治療有效劑量一般將提供治療益處而不引起實質毒性。可藉由標準醫藥學程序測定免疫結合物在細胞培養物或實驗動物中之毒性及治療功效。可使用細胞培養分析及動物研究來測定LD₅₀ (50%群體致死劑量)及ED₅₀ (50%群體治療有效劑量)。毒性與治療效果之間的劑量比率為治療指數，其可表述為比率LD₅₀/ED₅₀。呈現大治療指數之免疫結合物為較佳的。在一個實施例中，根據本發明之免疫結合物呈現高治療指數。自細胞培養分析及動物研究獲得之資料可用於調配適用於人類的劑量範圍。劑量較佳在循環濃度範圍內，其包括毒性極小或無毒性之ED₅₀。劑量可視多種因素而在此範圍內變化，該等因素例如所用劑型、所用投藥途徑、個體之病狀及其類似因素。確切配方、投藥途徑及劑量可由個別醫師考慮患者病狀而選擇。(參見例如Fingl等人, 1975之The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第1章, 第1頁, 該文獻以全文引用之方式併入本文中)。

【0253】 經本發明之免疫結合物治療之患者的主治醫師知道如何及何時終止、中斷或調整因毒性、器官功能障礙及其類似者所致的投藥。反之，主治醫師亦已知在臨床反應不充足(排除毒性)時將治療調節至較高水準。管理所關注病症時所投與之劑量的量值將隨待治療之病狀的嚴重程度、投藥途徑及其類似因素而變化。病狀之嚴重程度可例如部分地藉由標準預後評價方法來加以評價。此外，劑量及可能的給藥頻率亦將根據個別

患者之年齡、體重及反應而改變。

【0254】 相對於包含野生型IL-2之免疫結合物所用的最大治療劑量，可以增加包含如本文所描述之突變型IL-2多肽之免疫結合物的最大治療劑量。

【0255】

其他藥劑及療法

根據本發明之免疫結合物可與一或多種其他治療藥劑組合投與。舉例而言，本發明之免疫結合物可與至少一種額外治療劑共投與。術語「治療劑」涵蓋投與以治療需要此類治療之個體之症狀或疾病的任何藥劑。此類額外治療劑可包含適於治療特定適應症的任何活性成分，較佳為具有互補活性、彼此間無不利影響的彼等活性成分。在某些實施例中，其他治療劑為免疫調節劑、細胞抑制劑、細胞黏附抑制劑、細胞毒性劑、細胞凋亡活化劑或增強細胞對細胞凋亡誘導劑之敏感性的藥劑。在一特定實施例中，額外治療劑為抗癌劑，例如微管中斷劑、抗代謝物、拓樸異構酶抑制劑、DNA嵌入劑、烷化劑、激素療法、激酶抑制劑、受體拮抗劑、腫瘤細胞凋亡活化劑或抗血管生成劑。

【0256】 此類其他藥劑宜以可有效達成預定目的之量組合存在。此類其他藥劑之有效量視所用免疫結合物之量、病症或治療之類型及如上文所描述之其他因素而定。免疫結合物一般以與如本文中所描述的相同的劑量及投藥途徑使用，或以本文中所描述劑量之1至99%，或以任何劑量及憑經驗/臨床上判定為適當的任何途徑使用。

【0257】 上文提及之此類組合療法涵蓋組合投藥(其中相同或單獨的組合物中包括兩種或更多種治療劑)，且單獨的投藥(在此情況下，投與本

發明之免疫結合物)可以發生於額外治療劑及/或佐劑投與之前、同時及/或之後。本發明之免疫結合物亦可與輻射療法組合使用。

【0258】

製品

在本發明之另一態樣中，提供一種含有適用於治療、預防及/或診斷上文所描述之病症之材料的製品。製品包含容器及容器上或容器隨附之標記或藥品說明書。適合的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可由多種材料(諸如玻璃或塑膠)形成。容器容納單獨或與有效治療、預防及/或診斷病狀之另一組合物組合之組合物，且可具有無菌接取口(例如容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中之至少一種活性劑為本發明之免疫結合物。標記或藥品說明書指示組合物用於治療所選病狀。此外，製品可包含：(a)其中含有組合物之第一容器，其中該組合物包含本發明之免疫結合物；及(b)其中含有組合物之第二容器，其中該組合物包含另一細胞毒性劑或其他治療劑。本發明之此實施例中之製品可進一步包含指示組合物可用於治療特定病狀之藥品說明書。可替代地或另外，該製品可進一步包含第二(或第三)容器，其包含醫藥學上可接受之緩衝劑，諸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。其可進一步包括就商業及使用者觀點而言所期望之其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

【0259】

胺基酸序列

	胺基酸序列	SEQ ID NO
HCDR1_抗CD8	DTYIH	1
HCDR2_抗CD8	RIDPANDNTLYASKFQG	2
HCDR3_抗CD8	GYGYVFDH	3
LCDR1_抗CD8	RTSRISQYLA	4
LCDR2_抗CD8	SGSTLQS	5
LCDR3_抗CD8	QQHNENPLT	6
VH_抗CD8	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIKDTYIHW VRQAPGQGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQGRATITAD TSTSTAYLELSSLRSEDVAVYYCGRGYGYVFDHWG QGTLVTVSS	7
VL_抗CD8	DVQITQSPSSLSASVGDRVTITCRTSRISQYLAWYQE KPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTSS LQPEDFATYYCQQHNENPLTFGQGTKVEIK	8
鏈A：LC (CD8-IL2v OA/TA)	DVQITQSPSSLSASVGDRVTITCRTSRISQYLAWYQE KPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTSS LQPEDFATYYCQQHNENPLTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	9
鏈H：白 (CD8-IL2v OA/TA)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNIKDTYIHW VRQAPGQGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQGRATITAD TSTSTAYLELSSLRSEDVAVYYCGRGYGYVFDHWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSL CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	10

鏈 K : 杵 (CD8-IL2v TA)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDTYIHW VRQAPGQGLEWIGRIDPANDNTLYASKFQGRATITAD TSTSTAYLELSSLRSEDVAVYYCGRGYGYVFDHWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGSAPASSSTKKTQL QLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLT	11
鏈 K : 杵 (CD8-IL2v OA)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGSAPASSSTKKTQL QLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLT	12
人類IL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLT RMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	13
人類 IL-2 (T3A、F42A、 Y45Y、L72G、 C125A)	APASSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLT RMLTAKFAMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	14
連接子	GGGGSGGGGGSGGGGS	15
人類IL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLT RMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	16
人類 IL-2 (T3A、F42A、 Y45Y、L72G、 C125A)	APASSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLT RMLTAKFAMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	17
連接子	GGGGSGGGGGSGGGGS	18
hIL-2信號肽	MYRMQLLSICIALSLALVTNS	19

人類 IL-2 (C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT RMLTFKIFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	20
人類IgG1 Fc域	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSP	21
人類κ CL域	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	22
人類λ CL域	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTP EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	23
人類IgG1重鏈恆 定區 (CH1-CH2- CH3)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	24
muFAP HC-Fc (DD)-muIL2v	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNYWG QGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCL VKGYPPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYT SSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC GCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVV AISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQINSTR SVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAGAPIEKTISK TKGRPKAPQVYTIPTPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPE DITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVYSDL NVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPG GGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTSSSTAEAAQQQQQQ QQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTA KFALPKQATELKDLQCLEDLGPLRHVLDGTQSKSFQ LEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFECQFDDESATVV DFLRRWIAFAQSIISTSPQ	25

muFAP HC-Fc (KK)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGFVGGFNYWG QGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCL VKGYPPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTSL SSVTVPSSWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC GCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCCVV AISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFR SVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFVAPIEKTISK TKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCMITNFFPE DITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSKL NVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPG K	26
muFAP LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQ QKPGQAPRLINVGSRRTGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKRADAAP TVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKID GSRQNGVLNSWTDQDSKDYSLSSSTLTITKDEYE RHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	27
LCDR3 抗 CD8 - Okt8.v11	QQVNEFPPT	28
VL_ 抗 CD8- Okt8.v11	DVQITQSPSSLSASVGDRVTITCRSRSISQYLAWYQE KPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDFATYYCQQVNEFPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTITLTKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	29
鏈A : LC (CD8- (Okt8.v11)IL2v OA/TA)	DVQITQSPSSLSASVGDRVTITCRSRSISQYLAWYQE KPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDFATYYCQQVNEFPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTITLTKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	30

【0260】

實例

以下為本發明之方法及組合物之實例。應理解，考慮到上文所提供之一般描述，可實踐各種其他實施例。

【0261】

實例1

【0262】

實例1.1 靶向人類CD8之抗CD8-IL2v TA結合物及抗CD8-IL2v OA結

合物之產生

縮寫「TA」在本文中表示「兩臂」。縮寫「OA」在本文中表示「單臂」。術語「抗CD8-IL2v TA」及「CD8-IL2v TA」在本文中可互換使用。術語「抗CD8-IL2v OA」及「CD8-IL2v OA」在本文中可互換使用。

【0263】 全部基因之表現均在人類CMV啟動子-內含子A-5'UTR卡匣之控制下。BGH聚腺苷酸化信號位於基因之下游。為了用於HEK293 EBNA細胞中，載體含有用於穩定游離型維持質體之oriP元件。

【0264】

實例1.2 在HEK293 EBNA細胞中產生IgG樣蛋白質

藉由瞬時轉染HEK293 EBNA細胞來產生IgG-IL2分子。對於抗CD8-IL2v TA而言，該等細胞用對應表現載體以1:1:2比率(「載體重鏈(VH-CH1-CH2-CH3)」：「載體重鏈(VH-CH1-CH2-CH3-IL2v)」：「載體輕鏈(VL-CL)」)轉染。對於抗CD8-IL2v OA而言，該等細胞用對應表現載體以1:1:1比率(「載體重鏈(VH-CH1-CH2-CH3)」：「載體重鏈(CH2-CH3-IL2v)」：「載體輕鏈(VL-CL)」)轉染。將細胞離心，且培養基經預溫熱CD CHO培養基(Thermo Fisher, 目錄號10743029)置換。在CD CHO培養基中混合表現載體，添加PEI (Polyethylenimine, Polysciences, Inc, 目錄號23966-1)，將溶液渦旋且在室溫下培育10分鐘。隨後，將細胞(2百萬個/毫升)與載體/PEI溶液混合，轉移至燒瓶中且在具有5% CO₂氛圍的振盪培育箱中在37°C下培育3小時。在培育後，添加具有補充劑(總體積之80%)之Excell培養基(W. Zhou及A. Kantardjieff, Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing, 數位物件識別碼：10.1007/978-3-642-54050-9;

2014)。轉染後的第一天，添加補充劑(饋料，總體積之12%)。7天後，藉由離心及隨後過濾(0.2 μm 過濾器)收穫細胞上清液，且藉由如下文所指示之標準方法自所收穫之上清液純化蛋白質。

【0265】

實例1.3 IgG樣蛋白質之純化

參考標準方案，自經過濾之細胞培養物上清液純化蛋白質。簡言之，藉由蛋白質A親和層析(平衡緩衝液：20 mM檸檬酸鈉，20 mM磷酸鈉，pH 7.5；溶離緩衝液：20 mM檸檬酸鈉，100 mM NaCl，100 mM甘胺酸，pH 3.0)自細胞培養物上清液純化含有Fc之蛋白質。在pH 3.0下達成溶離，隨後立即pH中和樣本。藉由離心(Millipore Amicon® ULTRA-15 (技術編號：UFC903096))濃縮蛋白質，且在20 mM組胺酸、140 mM氯化鈉(pH 6.0)中藉由尺寸排阻層析將聚集之蛋白質與單體蛋白質分開。

【0266】

實例1.4 IgG樣蛋白質之分析

藉由使用根據Pace,等人, Protein Science, 1995, 4, 2411-1423，基於胺基酸序列計算之質量消光係數量測280 nm下之吸收來測定經純化蛋白質之濃度。蛋白質之純度及分子量在存在及不存在還原劑之情況下使用LabChipGXII (Perkin Elmer)藉由CE-SDS分析。聚集物含量之測定在25°C下使用分析型尺寸排阻管柱(TSKgel G3000 SW XL或UP-SW3000)，在操作緩衝液(分別為25 mM K_2HPO_4 ，125 mM NaCl，200 mM L-精胺酸單鹽酸鹽，pH 6.7或200 mM KH_2PO_4 ，250 mM KCl pH 6.2)中平衡，藉由HPLC層析進行。

【0267】 以相當且良好的質量純化兩種IgG-IL2v構築體，其中藉由

尺寸排阻層析來測定之單體含量高於98%。主峰之百分比(藉由CE-SDS來測定)高於92%。純化後之產量(以mg為單位之所純化的量除以以L為單位之所產生上清液的體積)為2.1 mg/L (抗CD8-IL2v TA)及7.8 mg/L (抗CD8-IL2v OA)。

【0268】 抗CD8-IL2v TA由以下組成(格式：A2HK)：具有SEQ ID NO:9之胺基酸序列的兩條多肽、具有SEQ ID NO:10之胺基酸序列的一條多肽及具有SEQ ID NO:11之胺基酸序列的一條多肽。抗CD8-IL2v OA由以下組成(格式：AHK)：具有SEQ ID NO:9之胺基酸序列的一條多肽、具有SEQ ID NO:10之胺基酸序列的一條多肽及具有SEQ ID NO:12之胺基酸序列的一條多肽。

【0269】 抗CD8(OKT8.v11)-IL2v TA由以下組成(格式：A2HK)：具有SEQ ID NO:30之胺基酸序列的兩條多肽、具有SEQ ID NO:10之胺基酸序列的一條多肽及具有SEQ ID NO:11之胺基酸序列的一條多肽。術語「抗CD8(OKT8.v11)-IL2v TA」、「抗CD8-IL2v OKT8.v11 TA」及「CD8-IL2v OKT8.v11 TA」在本文中可互換使用。抗CD8(OKT8.v11)-IL2v OA由以下組成(格式：AHK)：具有SEQ ID NO:30之胺基酸序列的一條多肽、具有SEQ ID NO:10之胺基酸序列的一條多肽及具有SEQ ID NO:12之胺基酸序列的一條多肽。術語「抗CD8(OKT8.v11)-IL2v OA」、「抗CD8-IL2v OKT8.v11 OA」及「CD8-IL2v OKT8.v11 OA」在本文中可互換使用。

【0270】 此實例中製備之結合物在以下實例中進一步使用。

【0271】

實例2

【0272】**抗CD8-IL2v TA及抗CD8-IL2v OA與CD8 T細胞之結合**

對自健康供體新鮮分離之PBMC進行計數，且將其轉移至圓底96孔盤中(每孔100'000個細胞)。細胞用FACS緩衝液(PBS，2% FBS，5 mM EDTA，0.025% NaN₃)洗滌且在4°C下用30 µl含指示分子之FACS緩衝液染色30 min。細胞用FACS緩衝液洗滌兩次以移除未結合的分子。接著，將20 µl經稀釋之FITC抗人類Fc特異性二級抗體(1:50稀釋，109-096-098，Jackson ImmunoResearch)與CD3 PE抗體(344806，BioLegend)及用於偵測CD8 T細胞之CD8 APC-Cy7抗體(557834，BD Bioscience)一起添加至細胞。在4°C下30 min培育之後，未結合之抗體藉由用FACS緩衝液洗滌兩次來移除。最終，將細胞再懸浮於FACS緩衝液中且使用對CD3⁺CD8⁺細胞(CD8 T細胞)進行閘控之BD Fortessa進行量測。

【0273】 評價抗CD8-IL2v TA及抗CD8-IL2v OA分子之與FAP-IL2v (如例如揭示於WO2012107417A1中，其以引用之方式併入；FAP-IL2v包含根據SEQ ID NO: 25、26及27之多肽)相比，與PBMC內之CD8 T細胞結合的能力。如圖2中所示，抗CD8-IL2v TA顯示極強的與CD8 T細胞之結合，抗CD8-IL2v OA與CD8 T細胞之結合較弱但仍比FAP-IL2v強許多。此與以下事實一致：抗CD8-IL2v OA可僅單價地與CD8結合，而抗CD8-IL2v TA可二價地與CD8結合，從而使得後者針對CD8之親和性更高。如FAP-IL2v所見，IL2v對於與CD8 T細胞之結合之貢獻僅為極少的，因為靜息CD8 T細胞之IL2Rβ/γ表現相較於CD8表現很低(圖2)。

【0274】**實例3**

【0275】

在用抗CD8-IL2v TA及抗CD8-IL2v OA處理後免疫細胞之STAT5磷酸化

將自健康供體新鮮分離之PBMC接種於圓底96孔盤之溫培養基(RPMI1640, 10% FCS, 2 mM麩醯胺酸)(200'000個細胞/孔)中。培養盤以300 g離心10 min且移除上清液。將細胞再懸浮於100 μ l含有IL2v結合物之培養基中且在37°C下刺激20 min。為了保持磷酸化狀態，細胞在37°C下用等量的預溫熱Cytotfix緩衝液(554655, BD Bioscience)刺激10 min之後立即固定。隨後，培養盤以300 g離心10 min且移除上清液。為了達成細胞內染色，使細胞在200 μ l Phosflow Perm緩衝液III (558050, BD Bioscience)中，在4°C下滲透30 min。接著，細胞用150 μ l冷FACS緩衝液洗滌兩次且拆分至兩個圓底96孔盤中且在冰箱中各用20 μ l抗體混合物I或II染色60 min。抗體混合物I用於將CD4 T細胞及調節T細胞中之pSTAT5染色，且抗體混合物II用於將CD8 T細胞及NK細胞中之pSTAT5染色。隨後，細胞用FACS緩衝液洗滌兩次且再懸浮於每孔200 μ l含有2% PFA的FACS緩衝液中。使用對CD8 T細胞(CD3⁺CD8⁺)、NK細胞(CD3⁻CD56⁺、CD4 T細胞(CD4⁺)及Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺)進行閘控之BD Fortessa流式細胞儀來進行分析。

表1. FACS抗體混合物I (CD4 T細胞及調節T細胞)

抗體	體積/樣本
CD4 PE/Cy7, 純系SK3, 小鼠IgG1, κ (557852, BD Bioscience)	0.5微升/孔
CD25 APC, 純系M-A251, 小鼠IgG1, κ (356110, BioLegend)	0.5微升/孔
PE小鼠抗人類FoxP3純系259D/C7 (560046, BD Bioscience)	1微升/孔
A488 pSTAT5 (pY694), 純系47, 小鼠IgG1 (562075, BD Bioscience)	0.5微升/孔

表2. FACS抗體混合物II (CD8 T細胞及NK細胞)

抗體	體積/樣本
CD3 PE/Cy7, 純系UCHT1, 小鼠IgG1, κ (300420, BioLegend)	0.5微升/孔
CD56 APC, 純系HCD56, 小鼠IgG1, κ (318310, BioLegend)	0.5微升/孔
CD8 PE, 純系HIT8a, 小鼠IgG1 (555635, BD Bioscience)	0.5微升/孔
A488 pSTAT5 (pY694), 純系47, 小鼠IgG1 (BD Bioscience)	0.5微升/孔

【0276】 將抗CD8-IL2v TA及抗CD8-IL2v OA誘導STAT5磷酸化之功能活性與PBMC內之不同免疫細胞子集上之FAP-IL2v的功能活性進行比較。STAT5磷酸化用作IL2受體(IL2R)活化之標記。如圖3中所示，在CD4 T細胞及調節T細胞(Treg)上，所有三種所測試分子在誘導STAT5磷酸化方面具有相同活性。在CD8 T細胞上，抗CD8-IL2v TA及抗CD8-IL2v OA在誘導STAT5磷酸化方面具有高得多的效能，其中抗CD8-IL2v TA比抗CD8-IL2v OA略微更強效。在NK細胞上，抗CD8-IL2v TA及抗CD8-IL2v OA比FAP-IL2v強一些，可能係因為呈CD8陽性之一部分NK細胞。此等資料指示，將IL2v靶向CD8 T細胞可經由IL2v強烈增強IL2R之活化，且此效果僅順式介導，因為CD8陰性T細胞上之IL2R之活化不增加(圖3)。

【0277】

實例4

【0278】

在用CD8-IL2v及CD8-IL2v OA處理後免疫細胞之增殖

自健康供體新鮮分離之PBMC用CFSE (5(6)-羧基螢光素二乙酸酯N-丁二醯亞胺基酯, 21888, Sigma-Aldrich)標記。用PBS短暫地洗滌3000萬個PBMC一次。同時，CFSE儲備溶液(2 mM於DMSO中)以1:20稀釋於PBS中。將PBMC再懸浮於30 ml預溫熱之PBS中，添加30 μl CFSE溶液且立即混合細胞。對於最佳標記而言，在37°C下培育細胞15 min。接著，添

加10 ml預溫熱培養基(RPMI1640, 10% FCS, 1% 麩醯胺酸)以中止標記反應。細胞以400 g短暫離心10 min 且再懸浮於20 ml新鮮培養基中 且在37°C下再培育30 min。最終, 細胞用培養基洗滌一次且以每毫升1百萬個細胞再懸浮於新鮮培養基中。將經標記之PBMC接種於圓底96孔盤中(100'000個細胞每孔)且用指示分子處理5天。在培育之後, 細胞用FACS緩衝液洗滌一次, 且在4°C下用CD3 APC-Cy7 (557834, BD Bioscience)、CD8 APC (純系SK1, 344722, BioLegend)、CD4 PE (300508, BioLegend)及CD56 BV421 (318328, BioLegend)於FACS緩衝液中之20 µl混合物染色30 min。隨後, 在用含1% PFA之FACS緩衝液將PBMC固定且用BD Fortessa量測螢光之前, PBMC用FACS緩衝液洗滌兩次。藉由量測CD8 T細胞(CD3⁺CD8⁺)、CD4 T細胞(CD3⁺CD4⁺)及NK細胞(CD3⁻CD56⁺)之CFSE稀釋液來測定增殖。

【0279】 測試CD8-IL2v及CD8-IL2v OA與FAP-IL2v相比之誘導CD8 T細胞、CD4 T細胞及NK細胞之增殖的能力。如圖4中所示, CD8-IL2v TA及CD8-IL2v OA具有與FAP-IL2v類似的誘導CD4 T細胞及NK細胞之增殖的活性。相比之下, 在CD8 T細胞上, 兩種分子在誘導增殖方面比FAP-IL2v更強效許多, 此係歸因於經由CD8將分子直接靶向此等細胞。CD8-IL2v TA更強效約1300倍, 且CD8-IL2v OA更強效約200倍。此與在CD8 T細胞上之結合及STAT5磷酸化方面所觀測到之差異一致。

【0280】

實例5

【0281】

在用CD8-IL2v TA及CD8-IL2v OKT8.v11 TA處理後免疫細胞之STAT5

磷酸化

將自健康供體新鮮分離之PBMC接種於圓底96孔盤之溫培養基(RPMI1640, 10% FCS, 2 mM麩醯胺酸) (200'000個細胞/孔)中。培養盤以300 g離心10 min且移除上清液。將細胞再懸浮於100 μ l含有IL2v分子之培養基中且在37°C下刺激20 min。為了保持磷酸化狀態,細胞在37°C下用等量的預溫熱Cytotfix緩衝液(554655, BD Bioscience)刺激10 min之後立即固定。隨後,培養盤以300 g離心10 min且移除上清液。為了達成細胞內染色,使細胞在200 μ l Phosflow Perm緩衝液III (558050, BD Bioscience)中,在4°C下滲透30 min。接著,細胞用150 μ l冷FACS緩衝液洗滌兩次且拆分至兩個圓底96孔盤中且在冰箱中各用20 μ l抗體混合物I或II染色60 min。抗體混合物I用於將CD4 T細胞及調節T細胞中之pSTAT5染色,且抗體混合物II用於將CD8 T細胞及NK細胞中之pSTAT5染色。隨後,細胞用FACS緩衝液洗滌兩次且再懸浮於每孔200 μ l含有2% PFA的FACS緩衝液中。使用對CD8 T細胞(CD3⁺CD8⁺)、NK細胞(CD3⁻CD56⁺、CD4 T細胞(CD4⁺)及Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺)進行閘控之BD Fortessa流式細胞儀來進行分析。

表3. FACS抗體混合物I (CD4 T細胞及調節T細胞)

抗體	體積/樣本
CD4 PE/Cy7, 純系SK3, 小鼠IgG1, κ (557852, BD Bioscience)	0.5微升/孔
CD25 APC, 純系M-A251, 小鼠IgG1, κ (356110, BioLegend)	0.5微升/孔
PE小鼠抗人類FoxP3純系259D/C7 (560046, BD Bioscience)	1微升/孔
A488 pSTAT5 (pY694), 純系 47, 小鼠 IgG1 (562075, BD Bioscience)	0.5微升/孔

表4. FACS抗體混合物II (CD8 T細胞及NK細胞)

抗體	體積/樣本
CD3 PE/Cy7, 純系UCHT1, 小鼠IgG1, κ (300420, BioLegend)	0.5微升/孔
CD56 APC, 純系HCD56, 小鼠IgG1, κ (318310, BioLegend)	0.5微升/孔
CD8 PE, 純系HIT8a, 小鼠IgG1 (555635, BD Bioscience)	0.5微升/孔
A488 pSTAT5 (pY694), 純系47, 小鼠IgG1 (BD Bioscience)	0.5微升/孔

【0282】 將CD8-IL2v TA及CD8-IL2v OKT8.v11 TA誘導STAT5磷酸化之功能活性與PBMC內之不同免疫細胞子集上之FAP-IL2v的功能活性進行比較。STAT5磷酸化用作IL2受體(IL2R)活化之標記。在CD4 T細胞及調節T細胞(Treg)上, 所有三種所測試分子在誘導STAT5磷酸化方面均顯示相同活性。在CD8 T細胞上, CD8-IL2v TA及CD8-IL2v OKT8.v11 TA顯示在誘導STAT5磷酸化方面高得多的效能, 但在CD8-IL2v TA與CD8-IL2v OKT8.v11 TA之間在活化方面不存在差異。在NK細胞上, CD8-IL2v TA及CD8-IL2v OKT8.v11 TA比FAP-IL2v強一些, 可能係因為呈CD8陽性之一部分NK細胞。此等資料指示, 將IL2v靶向CD8 T細胞可經由IL2v強烈增強IL2R之活化, 且此效果僅順式介導, 因為CD8陰性T細胞上之IL2R之活化不增加(圖5)。

* * *

【0283】 儘管出於清楚理解之目的, 已藉助於說明及實例相當詳細地描述前述之本發明, 但描述及實例不應解釋為限制本發明之範疇。本文中所引用之所有專利及科學文獻之揭示內容均以全文引用之方式明確併入本文中。

<400> 3

Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His
1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 4

Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 5

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 6

Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 7

<211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 7

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 8

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 9

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 9

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 10
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 10

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

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

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 595

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 11

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290

295

300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro
450 455 460

Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
465 470 475 480

Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro
485 490 495

Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala
 500 505 510

Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu
 515 520 525

Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro
 530 535 540

Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly
 545 550 555 560

Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile
 565 570 575

Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser
 580 585 590

Thr Leu Thr
 595

<210> 12
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 12

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
225 230 235 240

Ser Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu

245

250

255

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
 260 265 270

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro
 275 280 285

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 290 295 300

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 305 310 315 320

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 325 330 335

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 340 345 350

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
 355 360 365

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 370

<210> 13

<211> 133

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 14
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 16

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

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20

25

30

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 17

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 17

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

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

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys

35

40

45

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 19

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Val Thr Asn Ser
 20

<210> 20

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 21

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 21

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

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

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

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

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

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

Pro
225

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 22

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 23

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 23

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 24
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 24

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
 325

<210> 25
 <211> 604
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 25

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys
 130 135 140

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

Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp

180

185

190

Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys
210 215 220

Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
225 230 235 240

Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
245 250 255

Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe
260 265 270

Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His
290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala
305 310 315 320

Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg
325 330 335

Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met
340 345 350

Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro
355 360 365

Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn
370 375 380

Tyr Asp Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val
385 390 395 400

Tyr Ser Asp Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr
405 410 415

Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu
420 425 430

Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Ser Ser
450 455 460

Ser Thr Ala Glu Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
465 470 475 480

Gln His Leu Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser Arg
485 490 495

Met Glu Asn Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Ala Lys
500 505 510

Phe Ala Leu Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu
515 520 525

Glu Asp Glu Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Gly Thr Gln Ser
530 535 540

Lys Ser Phe Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg
545 550 555 560

Val Thr Val Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln
565 570 575

Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile

580

585

590

Ala Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln
 595 600

<210> 26
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys

130

135

140

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

Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
180 185 190

Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys
210 215 220

Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
225 230 235 240

Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
245 250 255

Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe
260 265 270

Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His
290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala
305 310 315 320

Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg
325 330 335

Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Lys Gln Met
 340 345 350

Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro
 355 360 365

Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn
 370 375 380

Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val
 385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr
 405 410 415

Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu
 420 425 430

Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 27

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 27

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala
100 105 110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
115 120 125

Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
130 135 140

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
145 150 155 160

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 28

Gln Gln Val Asn Glu Phe Pro Pro Thr

1 5

<210> 29

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 29

Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Asn Glu Phe Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 30

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 30

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Asn Glu Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種免疫結合物，其包含突變型介白素-2 (IL-2)多肽及與CD8結合之抗體，其中該IL-2多肽為包含胺基酸取代F42A、Y45A及L72G (相對於人類IL-2序列SEQ ID NO: 13編號)之突變型IL-2多肽。

【請求項2】

如請求項1之免疫結合物，

其中該突變型IL-2多肽為人類IL-2分子，其包含胺基酸取代F42A、Y45A及L72G (相對於人類IL-2序列SEQ ID NO: 13編號)；及

其中該抗體包含：(a)重鏈可變區(VH)，其包含含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列的重鏈互補決定區(HCDR) 1、含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的HCDR 2、含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的HCDR 3；及(b)輕鏈可變區(VL)，其包含含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的輕鏈互補決定區(LCDR) 1、含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列的LCDR 2及含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 28之胺基酸序列的LCDR 3。

【請求項3】

如請求項1或2之免疫結合物，其中該IL-2多肽為突變型IL-2多肽，

其中該突變型IL-2多肽為人類IL-2分子，其包含胺基酸取代F42A、Y45A及L72G (相對於人類IL-2序列SEQ ID NO: 13編號)；及

其中該抗體包含：(a)重鏈可變區(VH)，其包含與SEQ ID NO: 7之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列；及(b)輕鏈可變區(VL)，其包含與SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 29之胺基酸序列至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序

列。

【請求項4】

如請求項1或2之免疫結合物，其中該突變型IL-2多肽進一步包含胺基酸取代T3A及/或胺基酸取代C125A。

【請求項5】

如請求項1或2之免疫結合物，其中該突變型IL-2多肽包含SEQ ID NO: 14之序列。

【請求項6】

如請求項1或2之免疫結合物，其中該免疫結合物包含不多於一種突變型IL-2多肽。

【請求項7】

如請求項1或2之免疫結合物，其中該抗體包含由第一次單元及第二次單元構成的Fc域。

【請求項8】

如請求項7之免疫結合物，其中該Fc域為IgG類，尤其IgG₁子類Fc域。

【請求項9】

如請求項7之免疫結合物，其中該Fc域為人類Fc域。

【請求項10】

如請求項1或2之免疫結合物，其中該抗體為IgG類，尤其IgG₁子類免疫球蛋白。

【請求項11】

如請求項7之免疫結合物，其中該Fc域包含修飾，該修飾促進該Fc域

之第一次單元與第二次單元之結合。

【請求項12】

如請求項7之免疫結合物，其中在該Fc域之第一次單元之CH3域中，胺基酸殘基經具有較大側鏈體積的胺基酸殘基置換，藉此在該第一次單元之CH3域內產生可定位於該第二次單元之CH3域內之空腔中的隆凸，且在該Fc域之第二次單元之CH3域中，胺基酸殘基經具有較小側鏈體積的胺基酸殘基置換，藉此在該第二次單元之CH3域內產生可供該第一次單元之CH3域內之該隆凸可定位於其中的空腔。

【請求項13】

如請求項9之免疫結合物，其中在該Fc域之第一次單元中，位置366處之蘇胺酸殘基經色胺酸殘基置換(T366W)，且在該Fc域之第二次單元中，位置407處的酪胺酸殘基經纈胺酸殘基置換(Y407V)，且視情況位置366處之蘇胺酸殘基經絲胺酸殘基置換(T366S)且位置368處之白胺酸殘基經丙胺酸殘基置換(L368A) (根據Kabat EU索引編號)。

【請求項14】

如請求項13之免疫結合物，其中在該Fc域之第一次單元中，另外，位置354處之絲胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(S354C)或位置356處之麩胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(E356C)，且在該Fc域之第二次單元中，另外，位置349處之酪胺酸殘基經半胱胺酸殘基置換(Y349C) (根據Kabat EU索引編號)。

【請求項15】

如請求項9之免疫結合物，其中該突變型IL-2多肽在其胺基端胺基酸處與該Fc域之一個次單元，特定言之該Fc域之第一次單元的羧基端胺基

酸融合，視情況經由連接肽融合。

【請求項16】

如請求項15之免疫結合物，其中該連接肽具有SEQ ID NO: 15之胺基酸序列。

【請求項17】

如請求項9之免疫結合物，其中該Fc域包含一或多種胺基酸取代，該取代減少與Fc受體(特定言之Fc γ 受體)的結合，及/或效應子功能(特定言之抗體依賴性細胞介導之細胞毒性)(ADCC)。

【請求項18】

如請求項17之免疫結合物，其中該一或多種胺基酸取代係在選自以下之群的一或多個位置處：L234、L235及P329 (Kabat EU索引編號)。

【請求項19】

如請求項9之免疫結合物，其中該Fc域中之各次單元包含胺基酸取代L234A、L235A及P329G (Kabat EU索引編號)。

【請求項20】

如請求項1或2之免疫結合物，其包含：包含與SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 30之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列之多肽；包含與SEQ ID NO: 10之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列之多肽；及包含與SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 12之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列之多肽。

【請求項21】

如請求項1或2之免疫結合物，其包含：包含SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之多肽；包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之多肽；及包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之多肽。

【請求項22】

如請求項1或2之免疫結合物，其包含：包含SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之多肽；包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之多肽；及包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之多肽。

【請求項23】

如請求項1或2之免疫結合物，其基本上由突變型IL-2多肽及IgG₁免疫球蛋白分子藉由連接子序列接合而組成。

【請求項24】

一或多種經分離之聚核苷酸，其編碼如請求項1至23中任一項之免疫結合物。

【請求項25】

一或多種載體，特定言之表現載體，其包含如請求項24之聚核苷酸。

【請求項26】

一種宿主細胞，其包含如請求項24之聚核苷酸或如請求項25之載體。

【請求項27】

一種產生免疫結合物之方法，該免疫結合物包含突變型IL-2多肽及與CD8結合之抗體，該方法包含(a)在適合於表現該免疫結合物之條件下培養如請求項26之宿主細胞，及視情況(b)回收該免疫結合物。

【請求項28】

一種免疫結合物，其包含突變型IL-2多肽及與CD8結合之抗體，該免疫結合物藉由如請求項27之方法產生。

【請求項29】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至23或28中任一項之免疫結合物及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項30】

如請求項1或2之免疫結合物，其用作藥劑。

【請求項31】

如請求項1或2之免疫結合物，其用於治療疾病。

【請求項32】

如請求項31之免疫結合物，其中該疾病為癌症。

【請求項33】

一種如請求項1至23或28中任一項之免疫結合物，其用於製造用於治療疾病之藥劑。

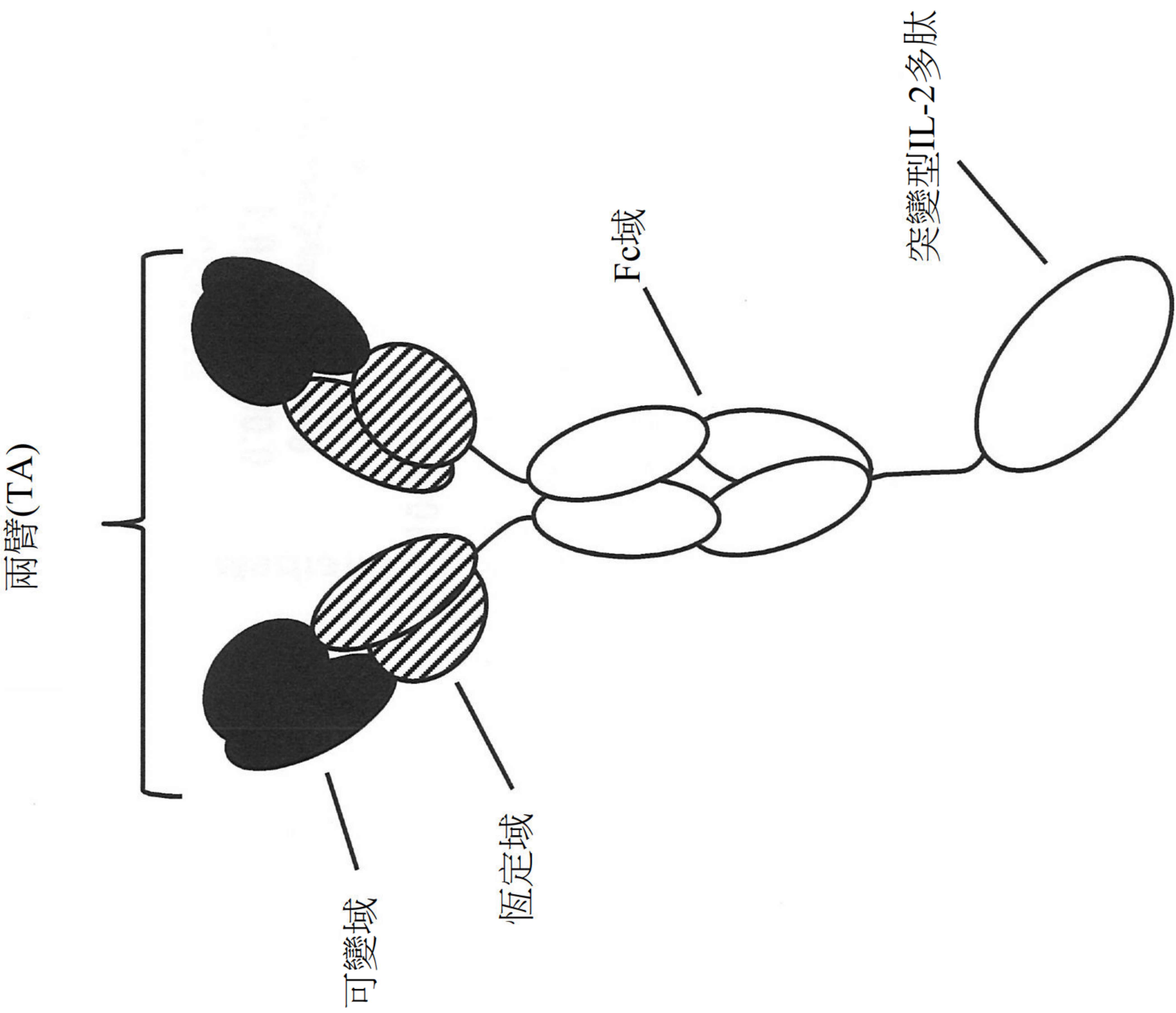
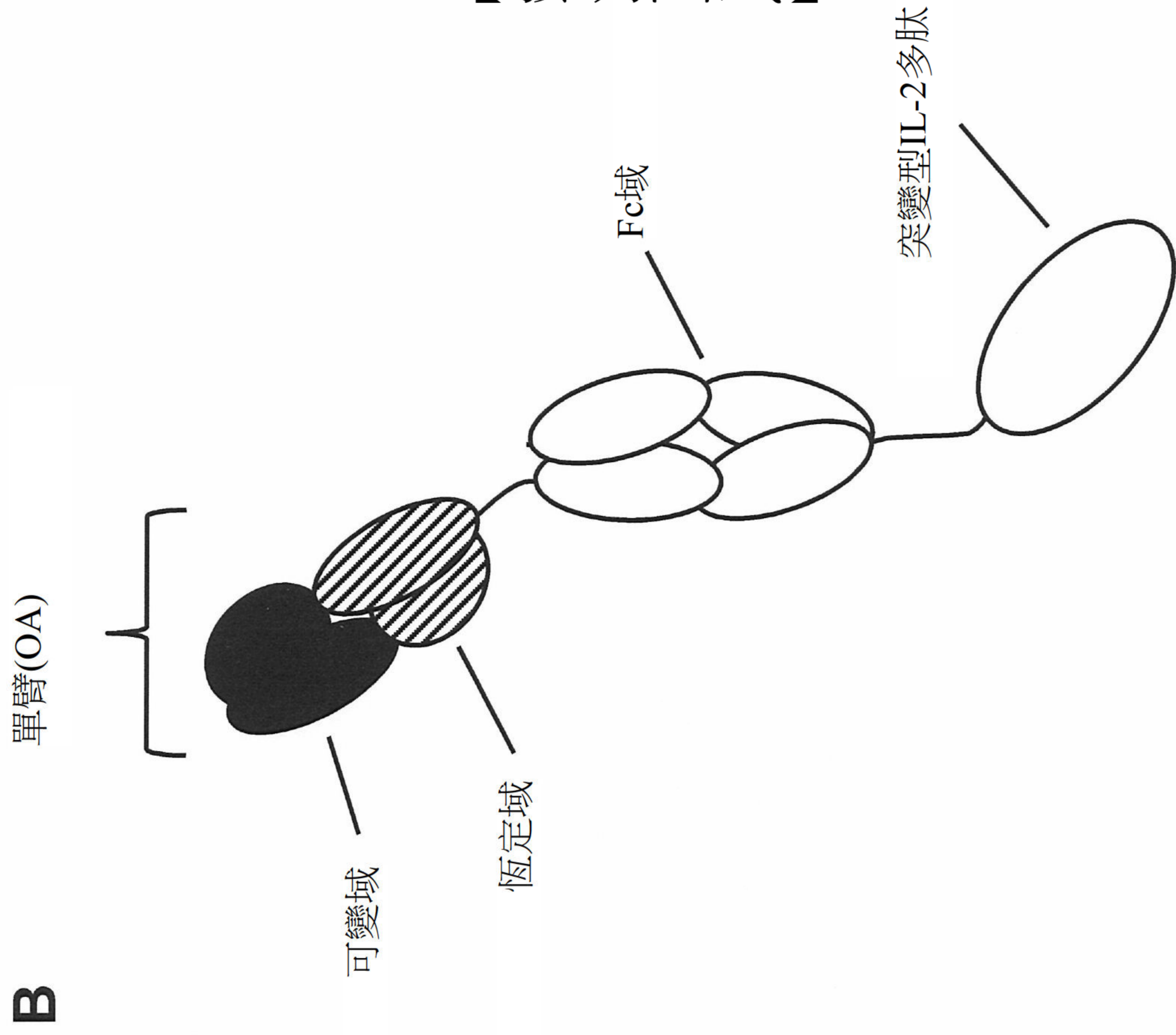
【請求項34】

如請求項33之用途，其中該疾病為癌症。

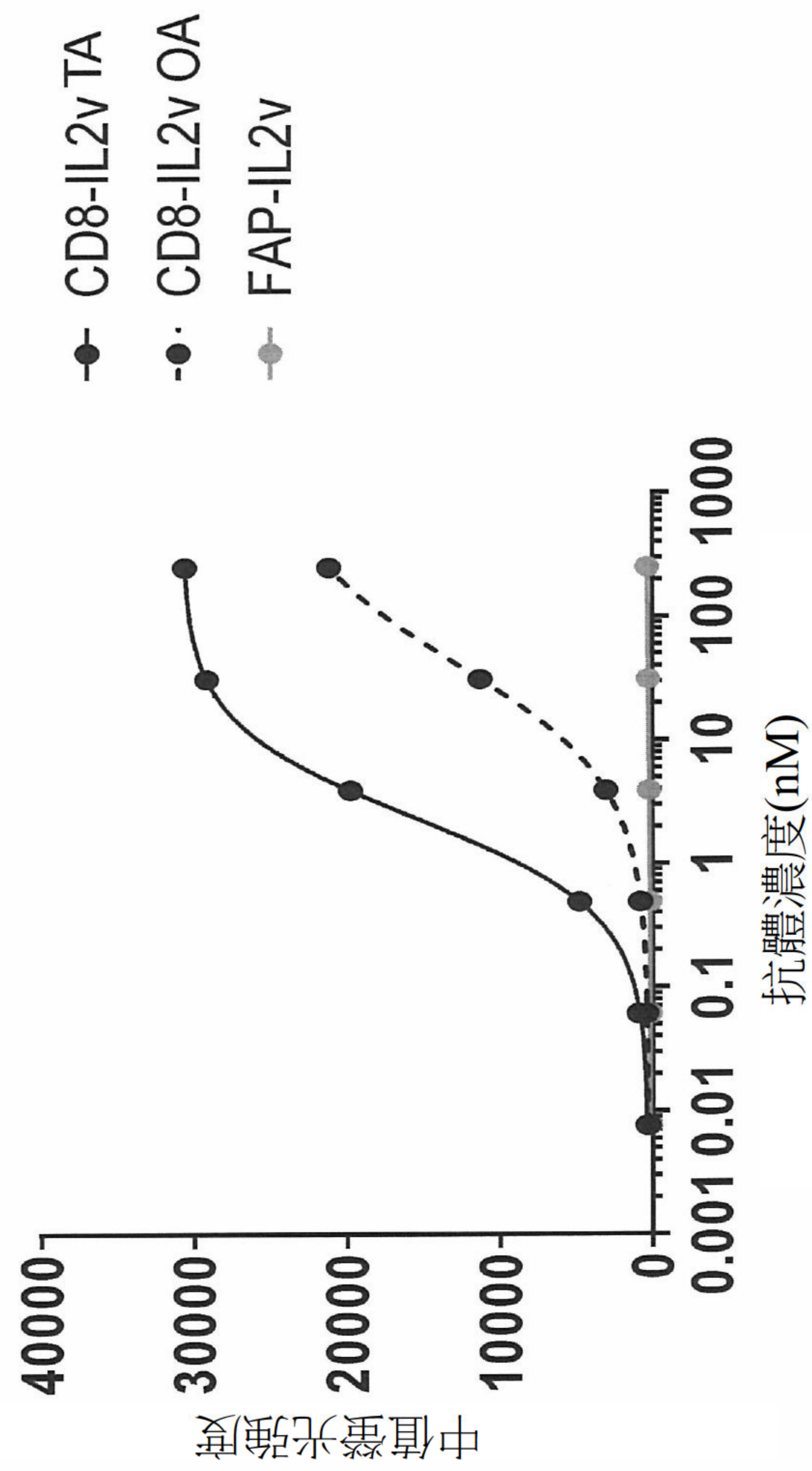
【請求項35】

一種如請求項1至23或28中任一項之免疫結合物之用途，其用於製造用於刺激個體之免疫系統之藥劑。

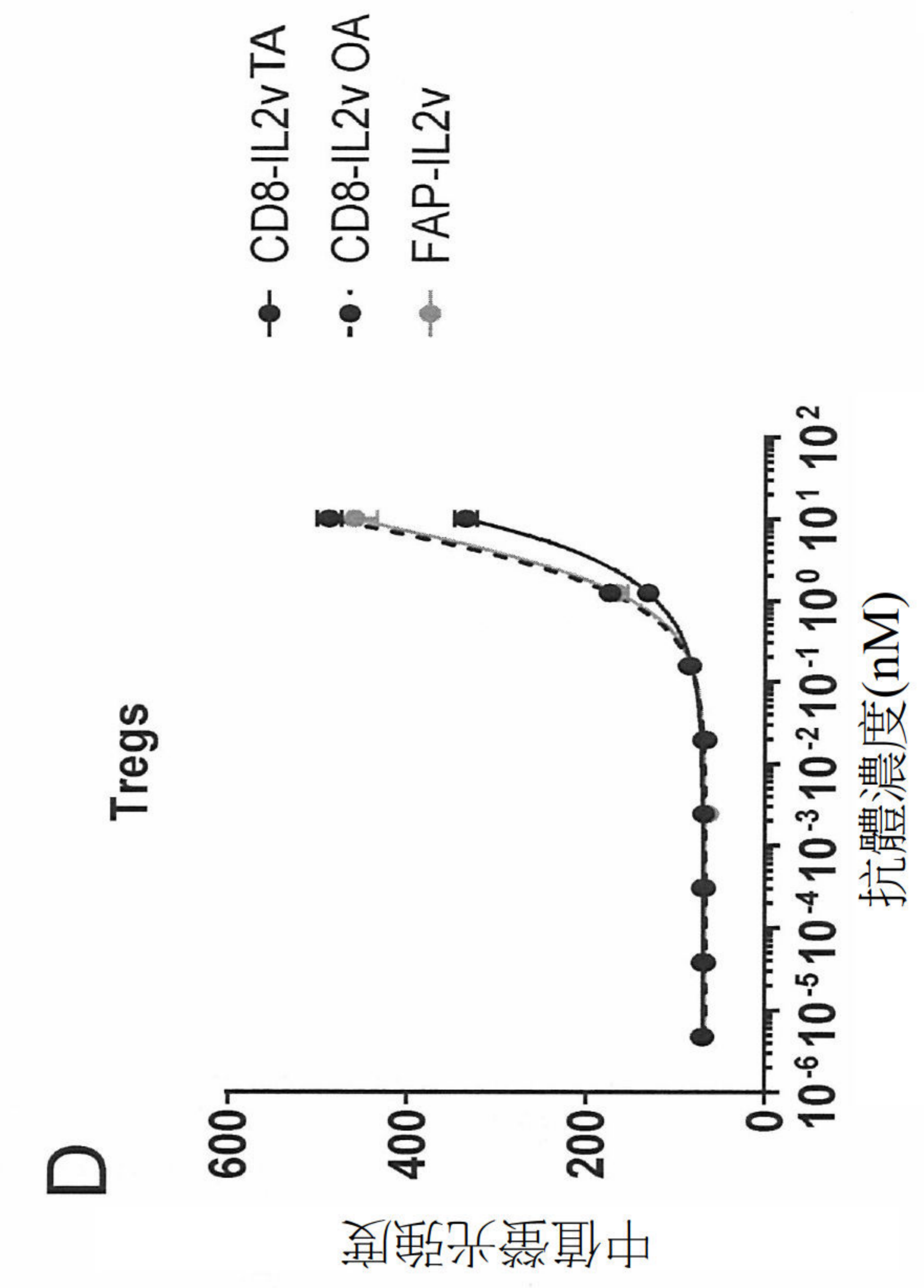
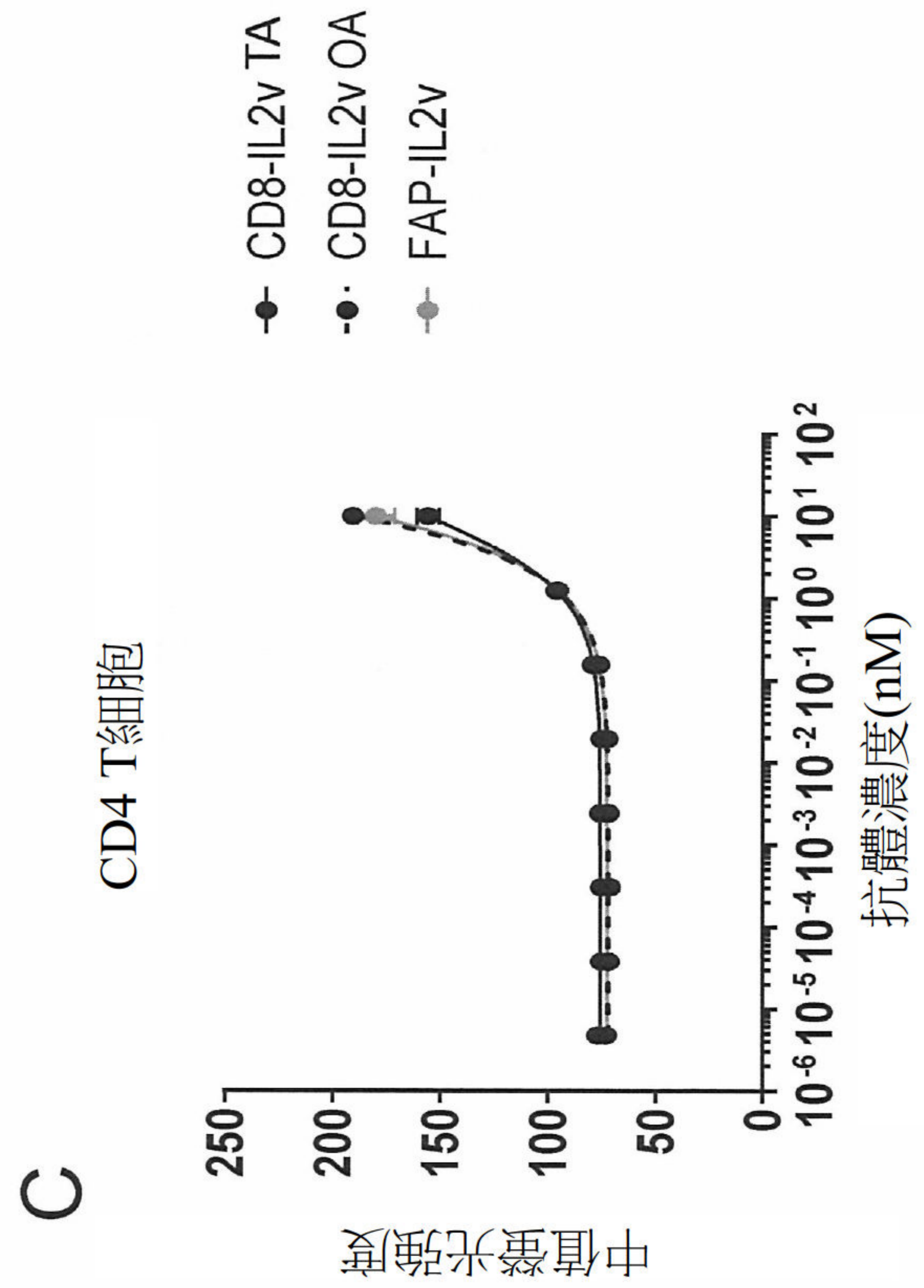
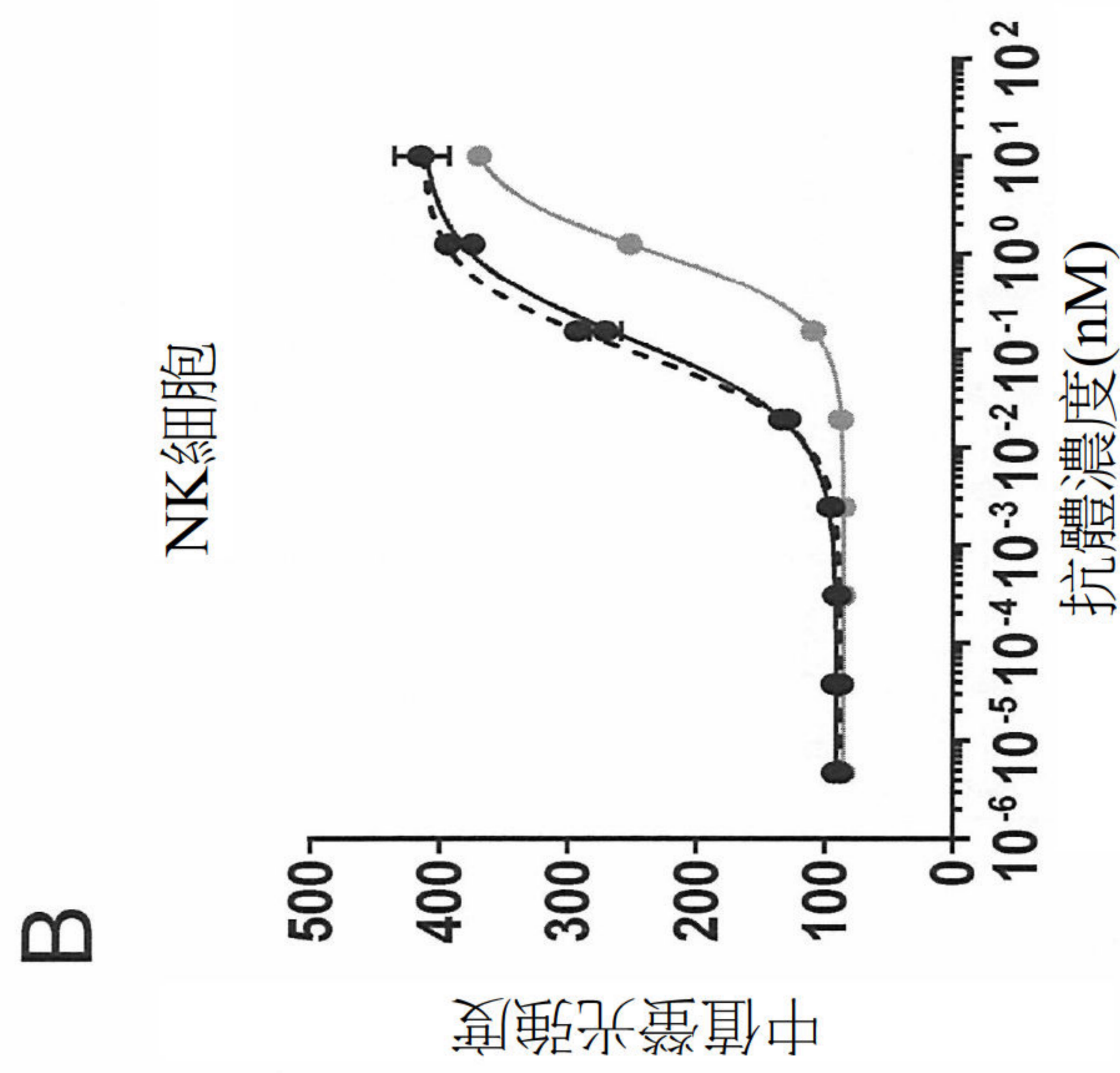
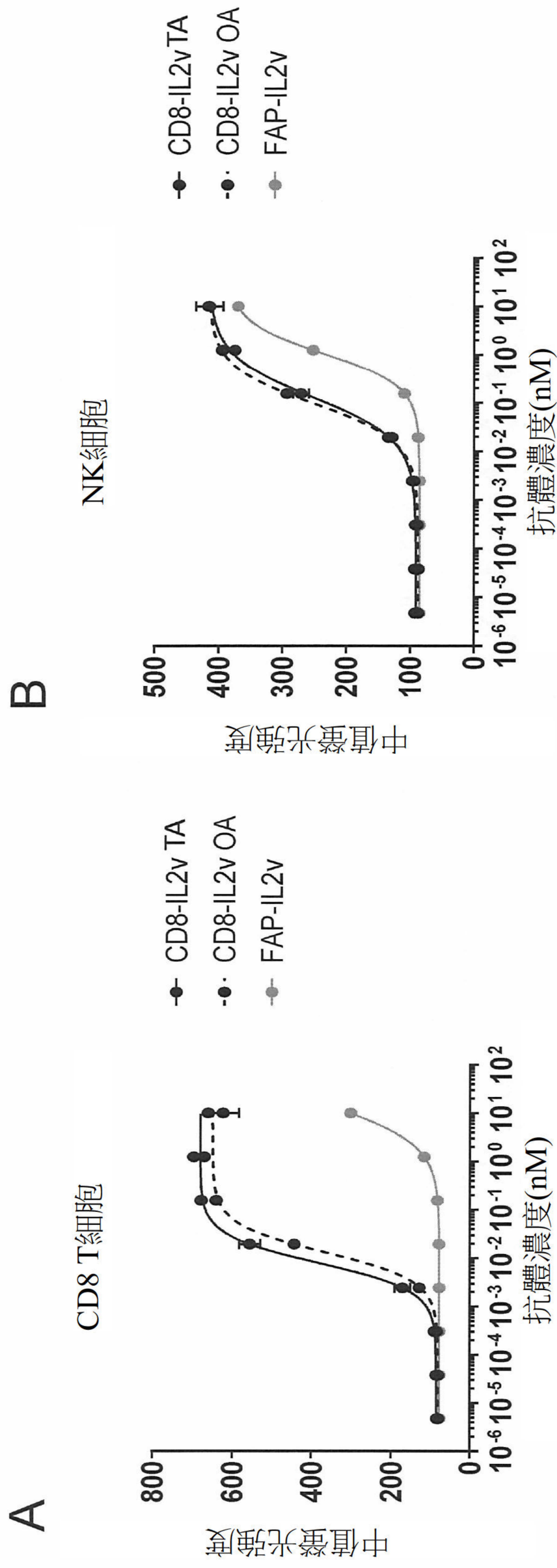
【發明圖式】



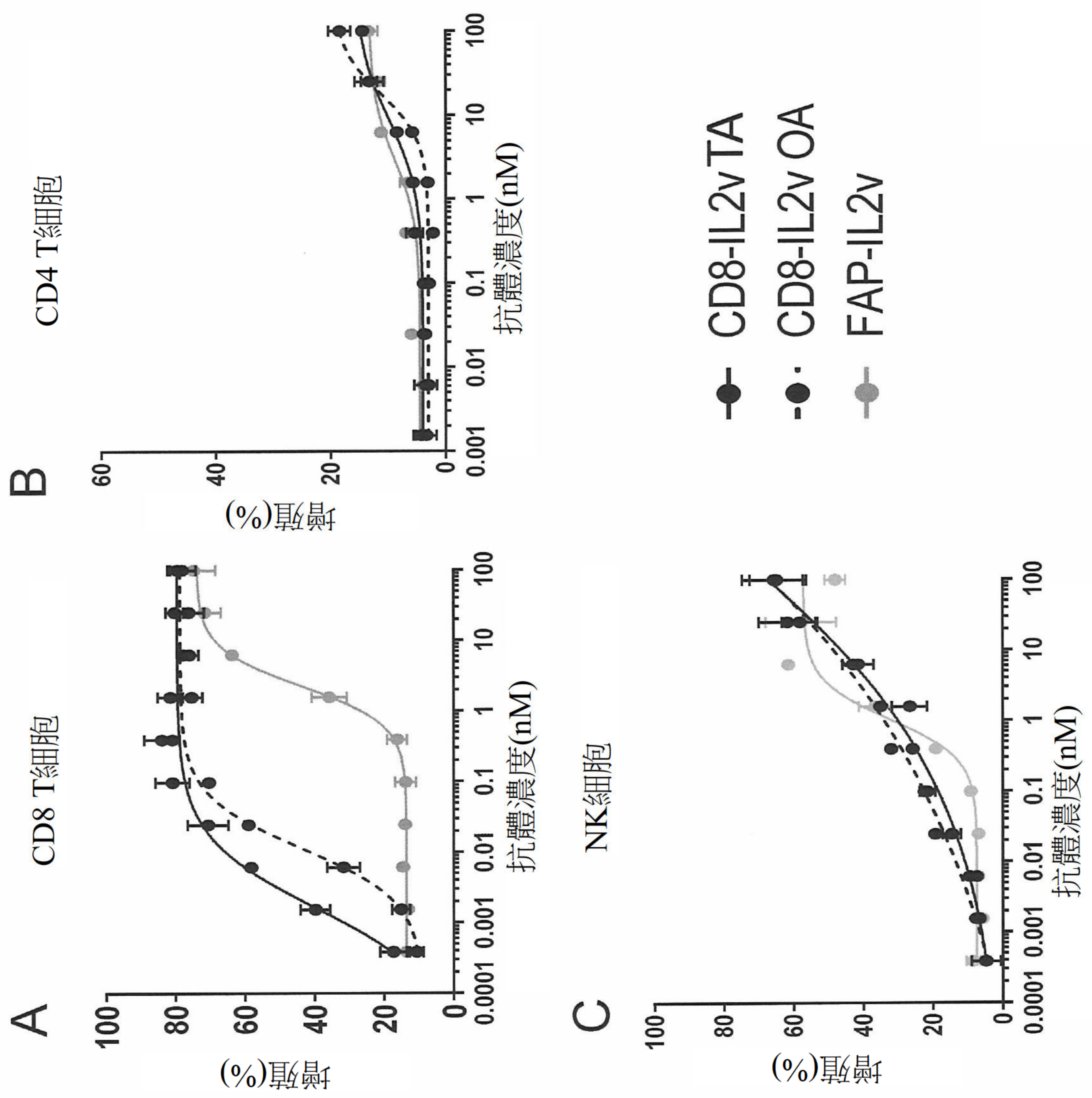
【圖1】



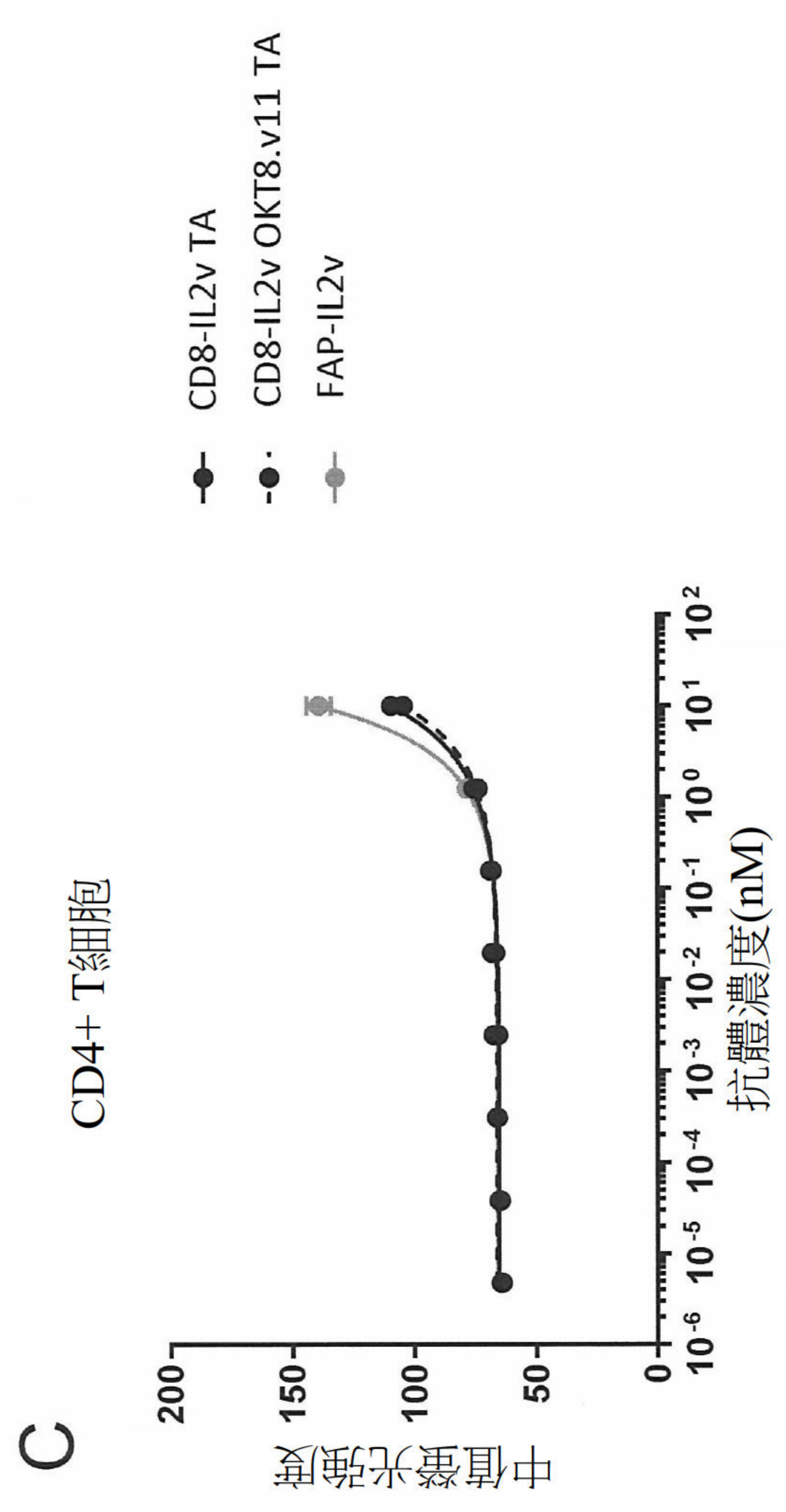
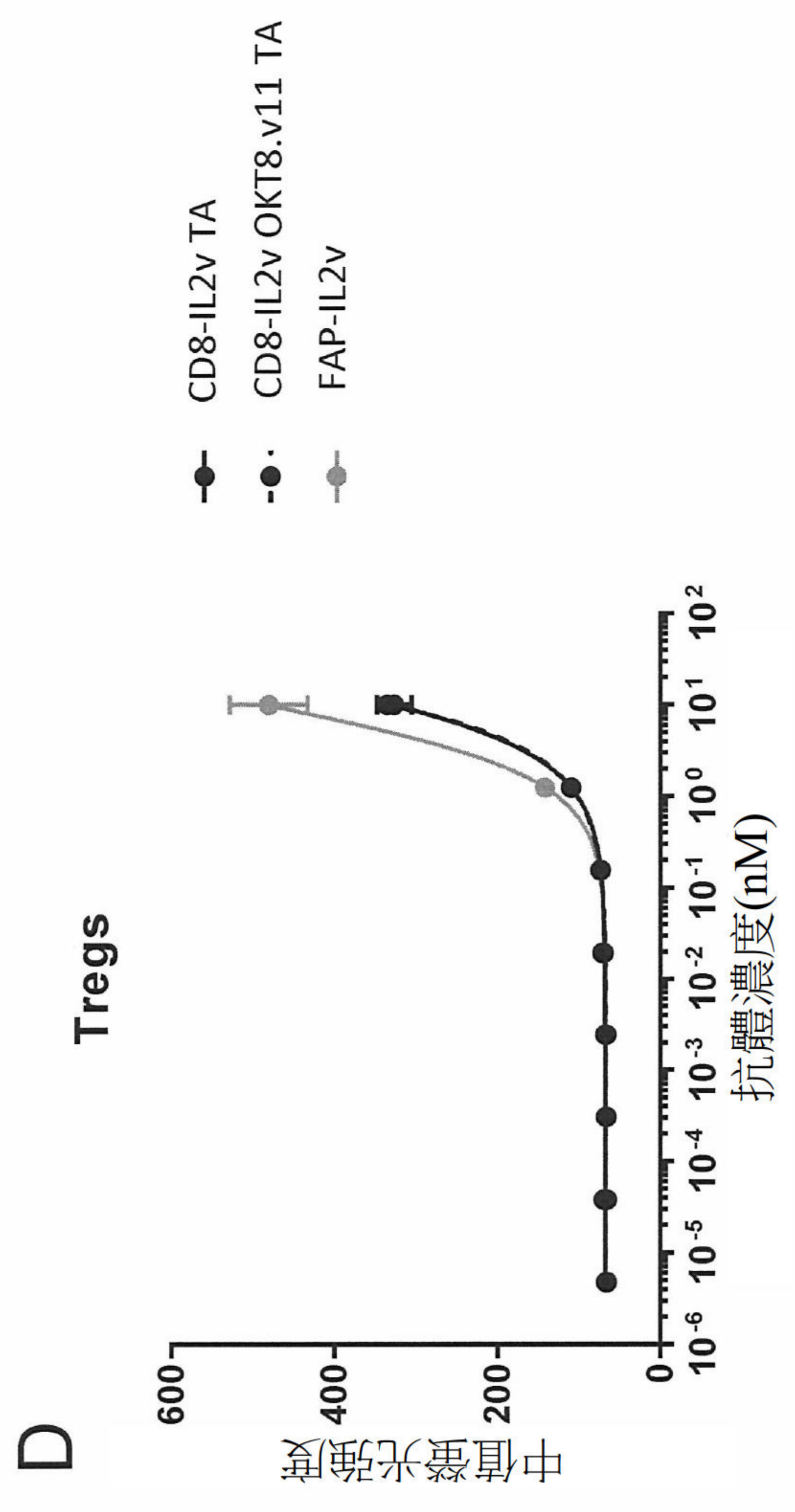
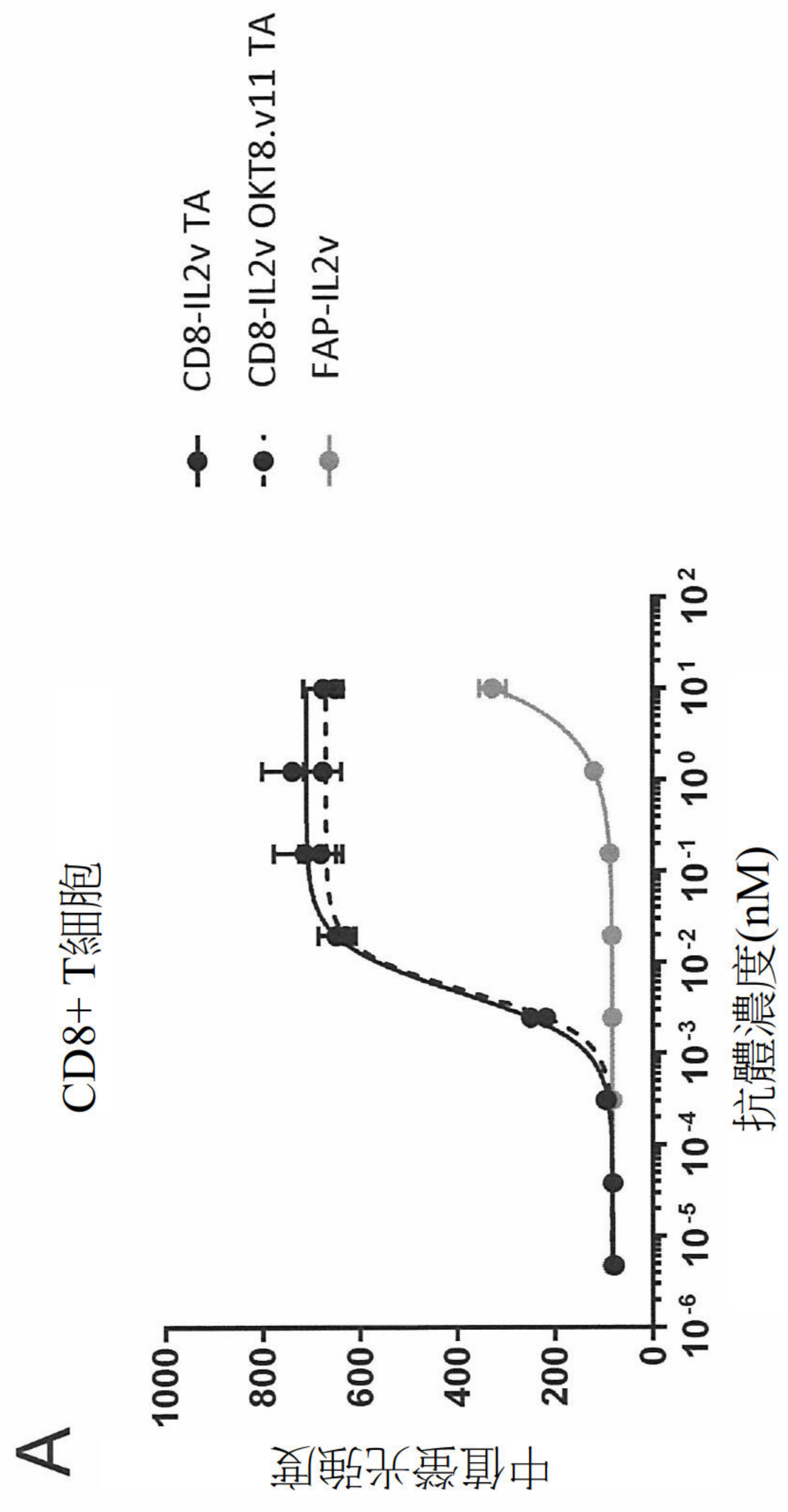
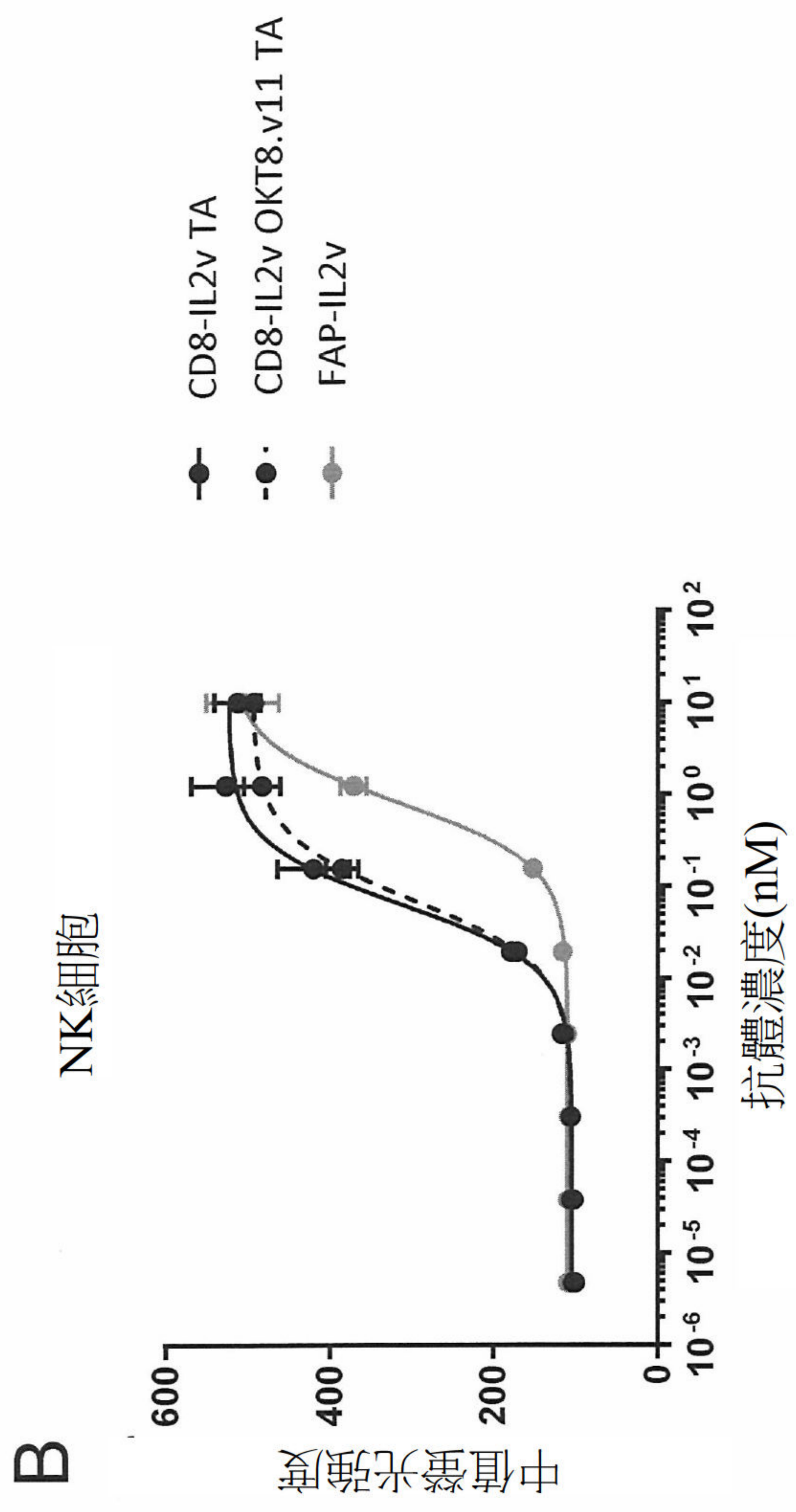
【圖2】



【圖3】



【圖4】



【圖5】