

IL-2 修饰药物分子研发进展

黄丽晶^{1,2}, 马小涵^{1,2}, 李晨辉^{1,2}, 王红权^{1,2}

1 河北菲尼斯生物技术有限公司 河北省自身免疫药物研究重点实验室, 河北 石家庄 050035

2 河北菲尼斯生物技术有限公司 石家庄自身免疫药物技术创新中心, 河北 石家庄 050035

黄丽晶, 马小涵, 李晨辉, 王红权. IL-2 修饰药物分子研发进展. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3279-3290.

HUANG LJ, MA XH, LI CH, WANG HQ. Advances of IL-2 modification moleculars in drug development. Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3279-3290.

摘 要: 白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2) 是免疫系统的关键调控因子, 其在免疫刺激和免疫抑制过程中均发挥重要作用。作为第一个上市的肿瘤免疫疗法药物, IL-2 因疗效不足及严重不良反应导致其临床应用受到很大限制。通过对 IL-2 进行修饰, 可延长药物半衰期, 提高细胞特异性, 使之更加特异地作用于效应 T 细胞或调节性 T 细胞, 用于肿瘤或自身免疫病的治疗, 是目前免疫治疗领域的研发热点之一。其中聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 修饰 IL-2 分子与 PD-1 单抗联用, 在黑色素瘤治疗上显现出很好的潜力; 同时, 还有更多用于肿瘤和自身免疫病治疗的 IL-2 修饰分子也已进入临床研究阶段。相信将有 IL-2 修饰分子获得监管部门批准, 成为人类对抗免疫相关疾病的有力武器。

关键词: 免疫治疗; 蛋白修饰; 肿瘤; 自身免疫病; 白细胞介素 2; 程序性细胞死亡蛋白 1; PEG 修饰; T 细胞调节

Advances of modified IL-2 molecules in drug development

HUANG Lijing^{1,2}, MA Xiaohan^{1,2}, LI Chenhui^{1,2}, WANG Hongquan^{1,2}

1 Hebei Key Laboratory of Autoimmunity Disease Drug Research, Hebei Fitness Biotechnology Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, Hebei, China

2 Shijiazhuang Technology Innovation Centre of Autoimmune Disease Drug, Hebei Fitness Biotechnology Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, Hebei, China

Abstract: Interleukin-2 (IL-2) is one of the most important regulators in immune system, as it plays an

Received: September 13, 2021; **Accepted:** March 22, 2022; **Published online:** March 31, 2022

Supported by: Science and Technology Program of Hebei Province, China (20372406D)

Corresponding author: WANG Hongquan. E-mail: whongquan@263.net

基金项目: 河北省省级科技计划 (20372406D)

essential part both in immune activation and suppression. However, as the first immunotherapy drug approved for the treatment of cancer, IL-2 is limited in clinical application by the serious adverse reactions. The long-felt needs in clinical practice, including prolonged half-lives, T cell subset specificity, and toxicity reduction can be achieved by polyethylene glycol (PEG) modification, Fc fusing, or protein mutation of IL-2. NKTR-214, the most advanced IL-2 pathway-targeted agent in clinical development for oncology, shows exciting results in treatment of melanoma in combination with nivolumab. At the same time, many more other modified molecules against cancer and autoimmune diseases are being tested in clinical research, an exciting future lying ahead for IL-2 therapeutics.

Keywords: immunotherapy; protein modification; tumor; autoimmune disease; IL-2; PD-1; PEG modification; T cell regulation

1984年,一位33岁黑色素瘤转移的病例在接受IL-2治疗3个月后肿瘤消退,此后病人无瘤生存29年。IL-2由此成为人类历史上第一个有效的肿瘤免疫疗法。遗憾的是,在肿瘤治疗中,IL-2治疗的客观缓解率只有约5%–10%,同时伴随致命性血管渗漏综合征等严重不良反应^[1],大大限制了IL-2的临床应用。

随着对IL-2及其信号通路研究的深入,人们发现IL-2对免疫系统的作用具有两面性。高剂量IL-2通过结合效应T细胞表面的IL-2R $\beta\gamma_c$,刺激效应T细胞增殖,达到治疗肿瘤的作用;但IL-2同时会刺激Treg细胞增殖,从而产生对细胞毒T细胞的抑制作用,降低肿瘤治疗效果。尤其低剂量IL-2,可以通过Treg表面组成型表达的IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$,特异性刺激Treg增殖。目前,低剂量IL-2作为一种潜在的自身免疫病治疗方法,在多种自身免疫病的治疗中均处于临床研究阶段。

1 IL-2生物学功能及信号转导

IL-2是第一个被克隆的细胞因子,因其功能曾被称为“T细胞生长因子”^[2]。人IL-2成熟形式的分子量为15.5–16.0 kDa,主要由抗原活化的CD4⁺T细胞分泌,其他免疫细胞,如CD8⁺T细胞、自然杀伤(natural killer, NK)细胞以及活化的树突状细胞也可分泌IL-2分子。IL-2通过

细胞表面的IL-2受体(IL-2Rs)发挥作用,IL-2Rs包括单体、二聚体和三聚体3种不同形式。IL-2Rs单体即IL-2R α (CD25),其与IL-2亲和力最弱($K_d=10^{-8}$ mol/L),IL-2与IL-2R α 的结合不启动信号转导^[3],膜结合或游离的IL-2 α 可能发挥IL-2的清除剂或诱饵受体的作用;二聚体IL-2Rs由IL-2R β (CD122)和IL-2R γ_c (CD132)组成,IL-2R $\beta\gamma_c$ 与IL-2的亲和力中等($K_d\approx 10^{-9}$ mol/L);三聚体IL-2Rs由IL-2R α 、IL-2R β 和IL-2R γ_c 组成,与IL-2的亲和力最强($K_d\approx 10^{-11}$ mol/L)。IL-2对免疫系统作用的两面性主要是通过不同细胞类型上所表达的不同受体介导的,如图1所示,IL-2与IL-2R $\beta\gamma_c$ 或IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ 结合后,启动信号转导。其信号转导过程主要通过3条通路完成:(1) Janus kinase (JAK)/STAT; (2) phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT; (3) MAPK信号通路。

2 工程化IL-2的开发

IL-2在疾病治疗中的两面性,为IL-2的临床应用和分子设计打开了新的思路,IL-2再次成为肿瘤免疫和自身免疫病治疗的热门分子。但IL-2作为一种药物分子,体内半衰期只有13–85 min,需要每天或隔天给药,患者依从性差;另外,IL-2分子对免疫系统刺激具有两面

性, 高剂量 IL-2 刺激免疫反应, 治疗肿瘤, 但同时不可避免地会诱导 Treg 的升高, 削弱药效, 其对血管内皮细胞 IL-2R $\beta\gamma_c$ 的过度刺激还会引发毛细血管渗漏等严重不良反应, 低剂量 IL-2 虽然安全性相对较好, 但也需控制剂量, 防止对效应 T 细胞的激活。因此, 如何通过对 IL-2 进行工程化改造, 最大化治疗效果, 规避不良反应, 成为了目前免疫治疗领域的研发热点之一。

IL-2 体内半衰期短主要是因为其分子量小,

在体内很容易被肾小球滤过作用清除。目前主要通过 PEG 修饰以及融合蛋白 (HAS、抗体 Fc、抗体融合等) 表达等方法提高分子的分子量, 减少肾小球滤过作用, 延长半衰期。对 IL-2 不良反应的控制主要通过 PEG 修饰带来的空间位阻效应和关键互作位点突变等方式, 改变分子的受体偏好性来实现。偏向 IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ 选择性刺激 Treg 细胞, 用来治疗自身免疫病, 偏向 IL-2R $\beta\gamma_c$ 选择性刺激效应 T 细胞用来治疗肿瘤。

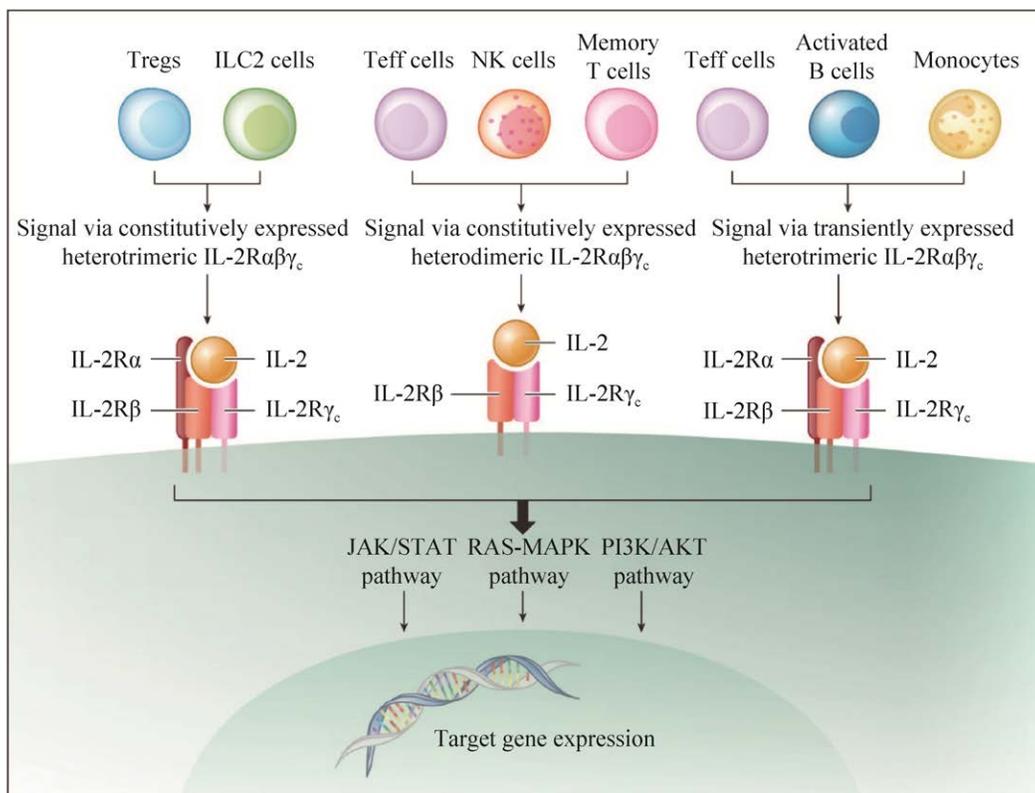


图 1 IL-2 信号转导通路^[4]

Figure 1 IL-2 signaling pathway^[4]. The duality effects of the IL-2 on the immune system is mediated by the spatiotemporal specificity of IL-2R expression. IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ with the high-affinity to IL-2 is constitutively expressed on Tregs and ILC2 cells and transiently expressed on Teffs, activated B cells, and monocytes. IL-2R $\beta\gamma_c$ with the intermediate-affinity to IL-2 is constitutively expressed on Teffs, memory T cells, and NK cells. Low dose IL-2 preferentially binds to IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ and activates Tregs and ILC2 cells, results in immunosuppression. High dose IL-2 by exogenous administration binds Teffs, memory T cells, and NK cells results in immune activation. IL-2 signaling activates the JAK/STAT, RAS-MAPK, and PI3K/AKT pathways, which modulate target gene expression and subsequently differentiation, proliferation, survival, and cellular function. Abbreviations: IL-2: interleukin-2; IL-2R: interleukin-2 receptor; ILC2: type-2 innate lymphoid cells; NK: natural killer; Teffs: effector T cells; Tregs: regulatory T cells.

2.1 肿瘤

2.1.1 PEG 化 IL-2 激动剂

蛋白质 PEG 修饰是延长蛋白药物体内半衰期的最常用手段,同时可提高蛋白亲水性,降低免疫原性。IL-2 特定位点的 PEG 化还可以改变其受体偏向性。通过特定位点的 PEG 化使 IL-2 更倾向于结合 IL-2R $\beta\gamma_c$,在肿瘤微环境中更加特异地激活 Teff,降低对 Treg 的活化能力,可最大化发挥 IL-2 的抗肿瘤的作用,并降低其毛细血管渗漏等副作用。

(1) Bempedalsleukin: Bempedalsleukin 是 Nektar 公司和 BMS 公司共同开发的 PEG 化 IL-2 分子,由 6 个可释放 PEG 分子定点修饰到 IL-2 的 K31、K34、K42、K47、K48 和 K75 上^[5],目前与 Nivolumab 联用在肌层浸润性膀胱癌、恶性黑色素瘤、肾细胞癌 3 个适应证上处于 III 期临床研究阶段,是目前研发进度最快的 PEG 修饰 IL-2 分子。Bempedalsleukin 属于一种前药分子,进入体内后,随着 PEG 分子的释放发挥其功能。与天然 IL-2 相比,PEG 化 IL-2 分子优先与 NK 细胞和 Teff 细胞表面的 IL-2R $\beta\gamma_c$ 结合,相反,与 Treg 表面 IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ 结合减弱,从而实现 Teff 和 NK 细胞的特异活化^[5-6]。Bempedalsleukin 的人体半衰期为 15.5 h,暴露量较 7 倍剂量 IL-2 提高 500 倍以上。其前药设计可以在活性分子远低于血浆毒性剂量的情况下,大幅提高药物暴露,降低药物毒性,提高药效^[5]。

在临床前研究中, Bempedalsleukin 通过诱导瘤内效应细胞 Teff 和 NK 的增殖和活化显著诱导黑色素瘤模型小鼠体内肿瘤的消退,值得注意的是, Bempedalsleukin 并未扩增瘤内 Treg,给药 7 d 后,瘤内 CD8:Treg 比例较 IL-2 明显提高。在人体临床研究中,同样观察到 Bempedalsleukin 可以显著诱导外周及瘤内

CD8⁺ T 细胞的增殖和功能,且未观察到高剂量 IL-2 在恶性肿瘤治疗中常见的严重不良反应^[5]。

Bempedalsleukin 在临床研究中的推荐剂量为 0.006 mg/kg,联合 360 mg Nivolumab,每 3 周给药一次。在一项作为恶性黑色素瘤一线治疗的 II 期临床研究中,经过 29 个月的随访,该剂量 Bempedalsleukin 显示出良好的耐受性,客观缓解率 (objective response rate, ORR) 达到 52.6% ($n=20/38$),完全缓解率 (complete response, CR) 为 34.2% ($n=13/38$),肿瘤负荷与基线相比下降了 78.5%,中位无进展生存期 (progression-free survival, PFS) 为 30.9 个月^[7]。较 Nivolumab 关键 III 期临床 CheckMate 067 结果: ORR 44%, CR 9%,肿瘤负荷下降 34.5%, PFS 6.9 个月均有明显提高^[8]。与高剂量 IL-2 相比, Bempedalsleukin 给药更加方便,依从性更好,且有效率更高,与 Nivolumab 联用,效果明显优于 Nivolumab。值得注意的是,临床研究显示, Bempedalsleukin 在黑色素瘤、尿路上皮癌等瘤种中的作用与 PD-L1 的表达不相关。而且,与 Nivolumab 联用, Bempedalsleukin 可以诱导相当比例 ($n=7/10$) 肿瘤从 PD-L1 阴性向 PD-L1 阳性转变。该特点对于尿路上皮癌等瘤种十分重要,因为这些肿瘤 PD-L1 的低表达不能使用免疫检查点抑制剂治疗^[9]。

(2) THOR-707 是由 Synthorx 公司开发的“not- α ”单 PEG 定点修饰 IL-2 分子。通过天然 IL-2 结构中融入非天然氨基酸,实现定点 PEG 化, THOR-707 对 IL-2R $\beta\gamma_c$ 复合物具有亲和力,但不与 IL-2R α 链结合^[10]。为了进一步拓展肿瘤学市场,赛诺菲 2019 年底斥资 25 亿美元收购 Synthorx 公司,获得了 THOR-707。I/II 中期临床结果显示,患者在首次使用 THOR-707 后体内 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞数量增加,有明显剂量关系,并且可持续整个给药周期^[11];与 K

药 (pembrolizumab) 联合使用时, 这种效应更加明显, 且未观察到 CD4⁺调节性 T 细胞或嗜酸性粒细胞显著增加, 表明 THOR-707 对 IL-2R α 受体没有选择性。安全性方面, 单药最高剂量 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 联合用药最高剂量为 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 未观察到剂量限制性毒性^[12]。

(3) TransCon IL-2 β/γ 是由 Ascendis Pharma 公司开发的一款 IL-2 类似物。其通过在 IL-2 分子的 IL-2R α 结合区引入一个 Cys 突变, 进行定点 PEG (5 kDa) 修饰, 将其改造为一个非 α 结合分子, 再通过一个 TransCon linker 将修饰分子连接到 TransCon 载体上, 形成一个前药分子, 在生理条件下, TransCon linker 裂解, 释放出 PEG-IL-2 分子, 发挥药效。TransCon IL-2 β/γ 在小鼠体内半衰期为 22 h, 在猴子体内半衰期约为 32 h, 优于上述 Bempegaldesleukin (小鼠和猴子体内半衰期均为 20 h) 和 THOR-707 (小鼠 13.3 h; 猴子 11 h)^[13]。目前该项目处于临床前研究开发阶段。

(4) SHR-1916 是恒瑞医药自主研发的全新基于定点突变的 IL-2 PEG 分子, 详细信息未披露。目前处于 I 期临床阶段。

2.1.2 IL-2 融合蛋白

(1) ALKS-4230。IL2 和 IL2R α 胞外域融合蛋白, 在体内不与 IL2R α 结合, 而更倾向于结合 IL-2R $\beta\gamma\text{c}$ 。目前处于 II 期临床研究阶段。临床前研究表明, ALKS-4230 可以刺激 NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞的增殖, 并诱导 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 等炎症因子的升高。对小鼠肺癌模型 B16F10、ALKS-4230 表现出明显的抗肿瘤活性。ALKS-4230 体内半衰期较 IL-2 提高了 3-4 倍^[14]。ARTISTRY-1 研究了 ALKS-4230 单药及 pembrolizumab 联用在晚期实体瘤的药效和安全性。ALKS-4230 单药以及与 pembrolizumab 联用均表现出一定的获益和良好的耐受性^[15]。

(2) CUE-101。CUE-101 是一种融合蛋白, 由 HLA-A*0201、HPV16 E7 抗原肽 (11-20 个氨基酸) 一个亲和力减弱 IL-2 (F42A 和 H16A 突变, 分别降低了 IL-2 分子和 IL-2R α 以及 IL-2R β 的亲和力), 以及一个 IgG1 的 Fc 结构域融合而成。CUE-101 可以特异性结合和激活 HPV-16 抗原特异性 CD8⁺ T 细胞, 以清除 HPV16 驱动的肿瘤细胞^[16], 目前处于 I 期临床研究阶段。

2.1.3 IL-2 抗体融合蛋白

(1) Darleukin 和 NidleglyTM。Darleukin (L19IL2) 是靶向肿瘤的免疫刺激分子, 由人 L19 抗体 (靶向纤连蛋白 EDB 域) 和人 IL2 融合而成。Darleukin 通过激活病变区域的肿瘤特异 T 细胞和 NK 细胞杀伤肿瘤细胞, 单用或与其他药物联用, 具有很强的抗肿瘤活性^[17-18]。目前与立体定向消融放射治疗和 PD-1 抗体联合使用用于恶性非小细胞肺癌的制剂, 处于临床 II 期研究阶段。Darleukin 与另一个抗体融合分子 Fibromun (TNF 与 IL19 抗体融合蛋白) 组成组合制剂 (商品名 NidleglyTM, 曾用名 Daromun)。在同系免疫重建小鼠荷瘤模型中, 瘤内注射 NidleglyTM 可以实现肿瘤完全缓解, 而 Darleukin 和 Fibromun 单药都没有这种效果。在无法切除的恶性黑色素瘤 II 期临床研究中, 瘤内注射 NidleglyTM 使 20 个病例的 32 个肿瘤显现出完全缓解, 其他未注射肿瘤也有 54% 表现出完全缓解, 说明 NidleglyTM 可以激活系统性免疫反应^[18]。针对 IIIB/C 黑色素瘤的 III 期临床研究 neo-DREAM 目前正在进行中^[19]。

(2) APN-301。由 IL-2 和抗 GD2 单克隆抗体共价结合组成的。动物研究表明其对黑色素瘤和神经母细胞瘤具有抑制作用^[20-21]。已经完成的 II 期临床研究表明, APN-301 只对早期较小疾病负担的复发/难治神经母细胞瘤病例

(¹³¹I-MIBG 显像和/或骨髓病理确诊)作用更加明显,而对标准诊断指标确诊的病例无作用。单药的完全缓解率为 21.7% ($n=5/23$),响应时间长达 35 个月^[22]。与 GM-CSF 和异维 A 酸联用的客观缓解率为 16%^[23]。在接受 APN-301 治疗的难治复发 III/IV 期黑色素瘤病例中, 33% ($n=6/18$) 的病例到研究完成仍未见复发, 2 年无复发比例和客观存活率分别为 39% 和 65%。所有研究中 APN-301 安全性均可接受^[24]。

(3) RG-7461。由靶向肿瘤相关成纤维细胞的单克隆抗体(抗 FAB 单抗)和非 IL-2R α 结合 IL-2 分子融合表达而成,可以诱导瘤内 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞的积累,降低 Treg 活性。I 期临床研究中, RG-7461 可诱导外周血和肿瘤内的效应 T 细胞和 NK 细胞的快速增殖,3 位恶性实体瘤患者的长期客观响应时间超过 6 个月^[25]。RG-7461 与其他抗肿瘤药物联用的多个 II 期临床研究目前正在进行中。

(4) 阿 姆 白 介 素 -2- 瑟 妥 珠 单 抗 (cergutuzumab amunaleukin)。是抗癌胚抗原 (anti-carcinoembryonic antigen, CEA) 抗体偶联 IL-2 表达而成,其中 IL-2 有 3 个位点突变,降低和 IL-2R α 结合。CEA 是在特定实体肿瘤,包括结直肠癌 (95%)、胰腺癌 (90%)、胃癌 (80%)、非小细胞肺癌 (60%) 以及乳腺癌 (40%) 等细胞上特异高表达的糖蛋白。Cergutuzumab amunaleukin 一方面可以靶向肿瘤细胞,另一方面也可以延长 IL2 的半衰期。在人 CEA 转基因 C57BL/6 模型上, Cergutuzumab amunaleukin 可以显著诱导肿瘤和外周血中的 NK 和 CD8⁺ T 细胞的增殖。在 MC38-CEA 和 PancO2-CEA 同源小鼠模型中, Cergutuzumab amunaleukin 可以提高小鼠存活率,且不会影响 Treg 的水平^[26]。目前瘤内注射,单药或联合 PD-L1 单抗 atezolizumab 治疗晚期/恶性实体瘤的处于 I

期临床研究中。

2.2 自身免疫疾病

与高剂量 IL2 的免疫刺激作用治疗肿瘤不同,低剂量 IL2 特异作用于 Treg 表面的高亲和力 IL2R $\alpha\beta\gamma_c$, 提高了 Treg 的数量和活性,增强其免疫抑制作用,可以用来治疗系统性红斑狼疮等自身免疫疾病。

2016 年,栗占国教授团队首次在概念临床上证明了低剂量 IL-2 针对中重度系统性红斑狼疮患者的疗效以及其作用机制,临床应答率(系统性红斑狼疮反应指数 SRI-4) 可达 89.5%, 用药 12 周后, 91.9% 患者的泼尼松龙减量超过 25%, 67.6% 患者泼尼松龙减量超过 50%。另外,通过对患者外周血淋巴细胞分型进行检测发现,低剂量 IL-2 可明显诱导外周血 Treg 水平,抑制 Th17 和 Tfh 细胞水平, Th1 和 Th2 水平变化不明显,与动物模型研究结果类似。与传统的免疫治疗相比,这项低剂量 IL-2 治疗并未增加感染的风险^[27]。随后发表随机、双盲、对照临床研究证明,低剂量 IL-2 治疗中重度系统性红斑狼疮安全有效。结果显示低剂量 IL-2 组明显优于对照组, 24 周 IL-2 组的该指数为 65.52%。低剂量 IL-2 组患者的耐受性好,感染发生率 (6.9%) 明显低于对照组 (20.0%)。在免疫指标方面,给予低剂量 IL-2 治疗后,患者体内的调节性 T 细胞水平升高,而致病性细胞和因子水平降低,可能说明通过靶向调控 IL-2 受体改善了患者体内的免疫失衡。同时,低剂量 IL-2 组患者体内 NK 细胞水平升高,可能与感染较少发生有关^[28]。另外,低剂量 IL-2 在类风湿关节炎、强直性脊柱炎、I 型糖尿病、自身免疫性肝炎等自身免疫疾病治疗上也表现出一定的作用^[29]。

低剂量 IL-2 虽然安全性相对较高,不会产生血管漏综合征 (vascular leak syndrome, VLS) 等严重不良反应,但如何使之更特异地作用于

Treg, 避免效应 T 细胞的刺激, 最大程度提高药效、避免不良反应的发生, 也是在研究中需要解决的重要问题。

2.2.1 PEG 化 IL-2

与肿瘤药物开发不同, 针对自身免疫病的 PEG 化 IL2 需要借助 PEG 分子屏蔽 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma\epsilon$ 的结合位点, 使之更加倾向于结合 IL-2R $\alpha\beta\gamma\epsilon$ 。

(1) NKTR-358。由 Nektar 公司开发, 2017 年礼来公司斥资 4 亿美元共同开发, 目前处于 II 期临床研究阶段。NKTR-358 为多种 PEG 修饰 IL-2 的混合物, 其中双 PEG 修饰和三 PEG 修饰分子总占比超 80%。主要的修饰位点为 K7/8、K31、K34、K42、K47^[30]。与 IL-2 相比, NKTR-358 降低了 IL-2R β 的亲合力, 使之更加偏向 Treg 细胞表面的 IL-2R $\alpha\beta\gamma\epsilon$, 特异性刺激 Treg 水平的升高。小鼠研究表明, 单次皮下注射 NTKR-358 即可强烈诱导外周血 Treg 细胞增殖, 效果优于多次 (1 次/d, 连续 5 d) 给药的 IL-2。多种 Treg 的生物标志物都显著诱导, 而其他细胞如 CD8⁺ T 诱导不明显。IL-2 或 NTKR-358 处理健康人外周血 PBMC, 利用 CyTOF (质谱流式细胞术) 检测, NTKR-358 更加特异刺激 Treg, 对 CD8⁺ T、Tcon 和 NK 细胞刺激不明显^[31]。SLE 病人体内 I 期临床研究显示, NTKR-358 的 C_{max} 和 AUC 表现出剂量依赖。给药 4–6 d 达峰, 清除半衰期约 8–9 d。在最高剂量 (28 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 下, CD25 高表达 Treg 数量较给药前提高 17 倍; Treg 最高水平出现在 10–12 d, 其升高可维持 20–25 d; 在大于 13.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量下, 可观察到 ICOS 和 CTLA-4 表达的升高; Foxp3 基因甲基化水平的变化与 Treg 数量结果一致, IDO-1 和 CD38 基因表达水平均和剂量呈相关性。各剂量下, Tcon 细胞水平无变化, NK 细胞水平仅在高剂量下有轻微升高^[32]。目

前 NKTR-358 在 SLE 适应证上处于 II 期临床研究阶段, 在银屑病和特应性皮炎适应症上处于 I 期临床研究阶段。

(2) THOR-809。由 Synthorx 公司开发, 与 THOR-707 同属拓展密码子平台。在 IL-2 引入非天然氨基酸后进行定点 PEG 修饰, 与 THOR-707 不同的是, THOR-809 对 IL-2R $\alpha\beta\gamma\epsilon$ 选择性提高。在小鼠和猴体内研究中, THOR-809 特异诱导 Treg 细胞的增殖和活化, 在猴体内半衰期约为 17.2–18.0 h^[33]。2019 年底 Synthorx 被 Sanofi 收购后, 未见 THOR-809 披露新的研究数据。

(3) Dual-31/51-20K。Dual-31/51-20K 是由北京大学药学院的周德敏教授与北京协和医学院张烜教授团队联合开发的双 PEG 定点修饰 IL-2 分子。通过周教授团队的非天然氨基酸编码系统, 对 IL-2 分子进行突变, 在 Y31 和 T51 两个位点引入两个非天然氨基酸, 随后在这两个位点上进行定点修饰, PEG 分子量为 20 K。研究发现, Y31 和 T51 两个位点修饰后可抑制 IL-2R 介导的内吞作用, 延长修饰分子的半衰期, 小鼠皮下注射, Dual-31/51-20K 分子半衰期为 23.1 h。体外细胞研究中, Dual-31/51-20K 可特异刺激 Treg 增殖, 模型动物数据结果表明, Dual-31/51-20K 可显著降低类风湿关节炎、系统性红斑狼疮及移植物抗宿主病小鼠模型的疾病活动度, 且不影响模型动物的抗感染能力^[34]。目前该分子已申报专利。

(4) RS2102。RS2102 是由恒瑞全资子公司瑞石生物开发的 1 类生物制品。RS2102 通过将 N88 突变成 R, 降低了 IL-2 对 IL-2R $\beta\gamma\epsilon$ 的亲合力, 提高了对 IL-2R $\alpha\beta\gamma\epsilon$ 的选择性, 再通过 PEG 化延长分子半衰期。给药频率预计可以达到 2 周给药一次。该分子已于 2021 年 10 月份申报临床试验。

(5) FNS036。河北菲尼斯生物开发的 PEG 定点修饰 IL-2 分子。Cys125 位于 IL-2 和 IL-2R γ c 结合面上, 通过 Cys125 定点修饰, 降低 IL-2 和 IL-2R γ c 的亲合力, 提高分子对 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ c 的选择性。动物研究表明, 其可特异诱导 Treg 水平的升高。目前该分子处于临床前开发阶段。

2.2.2 IL-2 融合蛋白

(1) AMG592。是由 Amgen 公司开发的 Fc 融合 IL-2 突变体蛋白分子。IL-2 突变可提高对 IL-2R α 的选择性, Fc 融合延长分子半衰期。hPBMC 实验结果表明, AMG592 较 IL-2 更加特异刺激 Treg (pSTAT5), 减少促炎性细胞因子的产生。食蟹猴研究结果, IL-2 在诱导 FoxP3⁺ Treg 增殖的同时, 会引起体温和 CRP 水平升高, 而 AMG592 未出现以上副作用。在 I 期临床研究中, AMG592 耐受性良好, 无严重副作用。最常见不良反应是注射部位红肿、疼痛, 结束治疗后缓解。AMG592 所有剂量都可以引起 Treg : Tcon 的升高, 在最高剂量下, Treg : Tcon 在第 8 天达到最高 (基线水平 4 倍), 可维持 29 d。AMG592 介导 Treg 特异升高, NK 无明显升高, Tcon 只有微弱升高, 血清 IL-6、TNF α 或 IFN- γ 无明显升高^[35]。AMG592 对红斑狼疮的治疗目前处于 II 临床研究阶段。

(2) PT101。也是 Fc 融合 IL-2 突变体蛋白分子, 由 Pandion Therapeutics 公司开发, 目前被 Merck 收购。于 2021 年 1 月完成 I 期临床。单次皮下注射 1–10 mg, 观察 28 d, 耐受性良好, 未观察到严重副作用。生物标志物方面, 3.5 mg 剂量下对 Treg 的刺激作用最强, 总 Treg 升高 3.6 倍, CD25^{high}Treg 升高 72.5 倍。Pandion Therapeutics 公司计划在今年下半年开展炎症性肠炎和系统性红斑狼疮 II 期临床研究^[36]。

(3) CC92252 (DEL-106)。最初由 Delinia 公

司开发, 现在归 Bristol-Myers Squibb 所有。CC92252 也是一个 Fc 融合突变 IL-2 分子, 适应症是银屑病, 目前处于 I 期临床招募阶段。

(4) RG-7835。RG-7835 是一个 IgG 融合 IL-2 突变 (N88D) 分子。其中 N88D 突变可以降低分子与 IL-2R β 的亲合力。RG-7835 可以特异刺激人源化小鼠体内 Treg 升高, 而 IgG 融合野生型 IL-2 分子在刺激 Treg 的同时, 还会刺激 NK 细胞的增殖。食蟹猴体内, 单剂量 (100 μ g/kg) 可以使 Treg 水平提高 14 倍^[37]。目前 RG-7835 已完成健康人体内的 I a 临床研究, 正在进行炎症肠病病人体的 I b 临床研究。

(5) IL233。由 Slate Bio 公司开发, 目前处于临床前研究阶段。IL233 是由 IL-2 和 IL-33 分子 C 末端 (aa109–aa266) 融合而成^[38]。动物研究显示, IL233 在诱导 Treg 增殖和活化的能力上较 IL-2 或 IL-33 单药都明显提高, 对狼疮肾炎、阿霉素诱导肾炎以及 aGVHD 都具有保护或治疗作用^[38–40]。目前 IL233 处于临床前研究阶段。

3 问题与展望

IL-2 上市之后, 因为治疗窗太窄, 应用受到很大限制。如今随着免疫学的进步, 多种工程化 IL-2 药物正在接受临床研究的检验, 同时更多的分子正在进入临床前研究, 见表 1。

在肿瘤治疗领域, 人们主要关注重点是修饰后分子的药物代谢动力学的改善, 降低药物副作用和给药频率, 降低药物对 Treg 活化的同时提高对 T_H1 和 NK 细胞的激活能力, 以及和免疫检查点抑制剂联用的疗效等。未来的基础和临床研究的工作将主要集中在以下重要问题上: 降低或彻底消除 IL-2R α 亲合力对抗肿瘤药效的影响; IL-2 修饰分子免疫原性如何; IL-2 修饰分子的抗肿瘤谱较 IL-2 有什么变化, 特别是和免

表 1 全球在研 IL-2 修饰分子

Table 1 Worldwide modified IL-2 molecules in development

Modification type	Agent	Company	Molecular composition	Indication	Development stage	
PEG modified IL-2	Bempegaldesleukin (NKTR-214)	Nektar Therapeutics, Bristol myers squibb	6 releasable PEG modified IL-2	Melanoma, RCC, UC	III	
	THOR-707 (SAR444245)	Sanofi	MonoPEG site-specific modified IL-2v	Solid tumor	I / II	
	SHR-1916	Hengrui Pharmaceuticals	MonoPEG site-specific modified IL-2v	Solid tumor	I	
	TransCon IL-2 β/γ	Ascendis pharma	MonoPEG site-specific modified IL-2v	Solid tumor	Pre-clin	
	NKTR-358	Nektar Therapeutics, Lilly	Multi-PEG modified IL-2	SLE, IBD	II	
	RS2012	Reistone Biopharma	MonoPEG site-specific modified IL-2v	SLE	I	
	THOR-809	Sanofi	MonoPEG site-specific modified IL-2v	AID	I	
	311/51-20K	Peking University/Peking Union Medical College	Double PEG site-specific modified IL-2v	AID	Pre-clin	
	IL-2 fusion protein	Nemvaleukin alfa (Alks-4230)	Alkermes	IL-2/IL-2Ra fusion protein	Melanoma	II
		Dartleukin	Phlogem	Anti-EDB mAb (L19)/IL-2v fusion protein	Melanoma, NSCLC, DLBCL	II
		APN-301	Merck KGaA, Apeiron Biologics AG	Anti-GD2 mAb/IL-2v fusion protein	Melanoma, Neuroblastoma	II
		RG-6279	Roche	Anti-PD1 mAb/IL-2v fusion protein	Solid tumor	I
CUE-101		Cue Biopharma	E7-pHLA-IL-2v-Fc fusion protein	HNSCC	I	
RG-7461		Roche	Anti-FAP mAb/IL-2v fusion protein	Solid tumor	I	
Cergutuzumab amunaleukin		Roche	Anti-CEA mAb/IL-2v fusion protein	Solid tumor	I	
KY1043		Kymab	Anti-PDL1 mAb/IL-2v fusion protein	Solid tumor	Pre-clin	
Efavaleukin alfa (AMG-592)		Amgen	IL-2v/Fc fusion protein	SLE	II	
CC92252		Bristol myers squibb	IL-2v/Fc fusion protein	PS	I	
RG-7835		Roche	IL-2v/IgG1 fusion protein	AID	I	
PT101		Pandion Therapeutics	IL-2v/Fc fusion protein	IBD, SLE	I	
IL233	Slate Bio	IL2/IL33 fusion protein	cGVHD	Pre-clin		

AID: autoimmune disease; CEA: carcinoembryonic antigen; DLBCL: diffuse large B cell lymphoma; EDB: extra domain B; GVHD: graft-versus-host disease; HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma; IBD: inflammatory bowel disease; IL-2: interleukin-2; IL-2v: interleukin-2 variant; NSCLC: non-small cell lung cancer; PD-1: programmed cell death protein-1; PD-L1: programmed death ligand-1; PS: psoriasis; RCC: renal cell carcinoma; SLE: systemic lupus erythematosus; UC: urothelial carcinoma;

疫检查点联用的情况下；除免疫检查点抑制剂外，IL-2 修饰分子还有其他更优组合吗，如 CAR-T、TCR-T 和 CAR-NK 疗法等。

在自身免疫病领域中，IL-2 修饰的目标主要是改善给药便利性和耐受性，并通过 Treg 和 Teff 选择性的差异，达到治疗疾病的目的。未来的工作将集中在给药剂量和频次的探索；生物标志物的探索；长期给药时免疫原性对药效的影响；感染和肿瘤风险的控制；以及与其他疗法的联用方式的探索等。

除了本文介绍的 IL-2 工程化修饰分子外，近年来人们也开始开发 IL-2 变体分子，来克服天然 IL-2 的一些问题，如 Neoleukin Therapeutics 的 NL-201，即基于 IL-2 和 IL-15 序列，通过计算机设计出来的新分子，它比 IL-2 分子短 25%，与 IL-2 序列同源性只有 14%^[41]。研究显示，其只结合 IL-2R $\beta\gamma_c$ ，该项目目前处于 I 期临床研究阶段，用于治疗恶性实体瘤^[42]。类似分子还有 Synthekine 公司的 STK-012 以及 BioNTech 的 BNT151 等，这些项目都还处于早期研究阶段^[43]。

IL-2 相关药物研发的复兴，是基础研究推动药物工业发展的典型案例。相信未来随着基础和临床研究的进展，IL-2 分子在肿瘤、自身免疫病甚至其他新的疾病领域的应用将越来越广泛，为人类提供应对免疫相关疾病的有力武器。

REFERENCES

- [1] Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol*, 2014, 192(12): 5451-5458.
- [2] Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, et al. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature*, 1983, 302(5906): 305-310.
- [3] Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell*, 1993, 73(1): 5-8.
- [4] Overwijk WW, Tagliaferri MA, Zalevsky J. Engineering IL-2 to give new life to T cell immunotherapy. *Annu Rev Med*, 2021, 72: 281-311.
- [5] Charych DH, Hoch U, Langowski JL, et al. NKTR-214, an engineered cytokine with biased IL2 receptor binding, increased tumor exposure, and marked efficacy in mouse tumor models. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(3): 680-690.
- [6] Charych D, Khalili S, Dixit V, et al. Modeling the receptor pharmacology, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of NKTR-214, a kinetically-controlled interleukin-2 (IL2) receptor agonist for cancer immunotherapy. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0179431.
- [7] Diab A, Tykodi SS, Daniels GA, et al. Bempedaldesleukin plus nivolumab in first-line metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 2021, 39(26): 2914-2925.
- [8] Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med*, 2015, 373(1): 23-34.
- [9] Siefker-Radtke AO, Fishman MN, Balar AV, et al. NKTR-214 + nivolumab in first-line advanced/metastatic urothelial carcinoma (mUC): updated results from PIVOT-02. *J Clin Oncol*, 2019, 37(7_suppl): 388.
- [10] Milla ME, Ptacin JL, Ma L, et al. THOR-707, a novel not-alpha IL-2, promotes all key immune system anti-tumoral actions of IL-2 without eliciting vascular leak syndrome (VLS). *Ann Oncol*, 2019, 30: v501.
- [11] Janku F, Abdul-Karim R, Azad A, et al. Preliminary results from an open-label, multicenter phase 1/2 dose escalation and expansion study of THOR-707, a novel not-Alpha IL-2, as a single agent in adult subjects with advanced or metastatic solid tumors. *Eur J Cancer*, 2020, 138: S11.
- [12] Joseph IB, Ma LN, Ptacin JL, et al. Abstract 3258: THOR-707, a novel not-alpha IL-2, elicits durable pharmacodynamic responses in non-human primates and efficacy as single agent and in combination with anti PD-1 in multiple syngeneic mouse models. *Immunology. American Association for Cancer Research*, 2019: 3258.
- [13] Rosen DB, Laufer B, Knappe T, et al. Abstract 4507: TransConTM IL-2 β/γ : a novel long-acting prodrug of receptor-biased IL-2 designed for improved pharmacokinetics and optimal activation of T cells for the treatment of cancer. *Immunology. American*

- Association for Cancer Research, 2020: 4507.
- [14] Lopes JE, Fisher JL, Flick HL, et al. ALKS 4230: a novel engineered IL-2 fusion protein with an improved cellular selectivity profile for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000673.
- [15] Vaishampayan UN, Muzaffar J, Velcheti V, et al. 1027MO ALKS 4230 monotherapy and in combination with pembrolizumab (pembro) in patients (pts) with refractory solid tumours (ARTISTRY-1). *Ann Oncol*, 2020, 31: S708-S709.
- [16] Quayle SN, Girgis N, Thapa DR, et al. CUE-101, a novel E7-pHLA-IL2-fc fusion protein, enhances tumor antigen-specific T-cell activation for the treatment of HPV16-driven malignancies. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(8): 1953-1964.
- [17] Ongaro T, Gouyou B, Stringhini M, et al. A novel format for recombinant antibody-interleukin-2 fusion proteins exhibits superior tumor-targeting properties *in vivo*. *Oncotarget*, 2020, 11(41): 3698-3711.
- [18] Weide B, Eigentler T, Catania C, et al. A phase II study of the L19IL2 immunocytokine in combination with dacarbazine in advanced metastatic melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(9): 1547-1559.
- [19] Philogen innovating targeting pipeline: nidlegy TM [EB/OL]. [2022-03-03]. <https://www.philogen.com/pipeline/nidlegytm/>.
- [20] Becker JC, Pancook JD, Gillies SD, et al. T cell-mediated eradication of murine metastatic melanoma induced by targeted interleukin 2 therapy. *J Exp Med*, 1996, 183(5): 2361-2366.
- [21] Sabzevari H, Gillies SD, Mueller BM, et al. A recombinant antibody-interleukin 2 fusion protein suppresses growth of hepatic human neuroblastoma metastases in severe combined immunodeficiency mice. *PNAS*, 1994, 91(20): 9626-9630.
- [22] Shusterman S, London WB, Gillies SD, et al. Antitumor activity of Hu14.18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group (COG) phase II study. *J Clin Oncol*, 2010, 28(33): 4969-4975.
- [23] Shusterman S, Naranjo A, Van Ryn C, et al. Antitumor activity and tolerability of Hu14.18-IL2 with GMCSF and isotretinoin in recurrent or refractory neuroblastoma: a children's oncology group phase II study. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(20): 6044-6051.
- [24] Albertini MR, Yang RK, Ranheim EA, et al. Pilot trial of the Hu14.18-IL2 immunocytokine in patients with completely resectable recurrent stage III or stage IV melanoma. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(10): 1647-1658.
- [25] Soerensen MM, Ros W, Rodriguez-Ruiz ME, et al. Safety, PK/PD, and anti-tumor activity of RO6874281, an engineered variant of interleukin-2 (IL-2v) targeted to tumor-associated fibroblasts via binding to fibroblast activation protein (FAP). *J Clin Oncol*, 2018, 36(15_suppl): e15155.
- [26] Klein C, Waldhauer I, Nicolini VG, et al. Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines. *Oncoimmunology*, 2017, 6(3): e1277306.
- [27] He J, Zhang X, Wei YB, et al. Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4⁺ T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Nat Med*, 2016, 22(9): 991-993.
- [28] He J, Zhang RJ, Shao M, et al. Efficacy and safety of low-dose IL-2 in the treatment of systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(1): 141-149.
- [29] Rosenzweig M, Lorenzon R, Cacoub P, et al. Immunological and clinical effects of low-dose interleukin-2 across 11 autoimmune diseases in a single, open clinical trial. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78(2): 209-217.
- [30] Kirk P, Langowski J, Zalevsky J. Selective Treg stimulator RUR20kD-IL-2 and related compositions: PCT/US2019/033100. 2019-05-20.
- [31] Dixit N, Fanton C, Langowski JL, et al. NKTR-358: a novel regulatory T-cell stimulator that selectively stimulates expansion and suppressive function of regulatory T cells for the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *J Transl Autoimmun*, 2021, 4: 100103.
- [32] Fanton C, Siddhanti S, Dixit N, et al. op0195 selective expansion of regulatory t-cells in humans by a novel il-2 conjugate treg stimulator, nktr-358, being developed for the treatment of autoimmune diseases Oral presentations. *BMJ Publishing Group Ltd and European League Against Rheumatism*, 2019.
- [33] Ptacin J, Caffaro CE, Ma L, et al. THOR-809: an IL-2 engineered from an expanded genetic alphabet for the

- potential treatment of autoimmune disorders. Poster 86 presented at the ACR/ARP Annual Meeting, Nov. 8–13, 2019, Atlanta, GA.
- [34] Zhang B, Sun JQ, Wang Y, et al. Site-specific PEGylation of interleukin-2 enhances immunosuppression via the sustained activation of regulatory T cells. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5(11): 1288-1305.
- [35] Tchao N, Gorski KS, Yuraszek T, et al. Amg 592 is an investigational IL-2 mutein that induces highly selective expansion of regulatory T cells. *Blood*, 2017, 130(Suppl_1): 696.
- [36] Sundy JS, Otipoby KL, Higginson-Scott N, et al. ab0282 safety, tolerability and selective expansion of regulatory t cells by a single dose of the novel il-2 mutein Pt101 in a phase I study in healthy volunteers. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80(Suppl 1): 1167.1-1167.
- [37] Peterson LB, Bell CJM, Howlett SK, et al. A long-lived IL-2 mutein that selectively activates and expands regulatory T cells as a therapy for autoimmune disease. *J Autoimmun*, 2018, 95: 1-14.
- [38] Stremaska ME, Jose S, Sabapathy V, et al. IL233, A novel IL-2 and IL-33 hybrid cytokine, ameliorates renal injury. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(9): 2681-2693.
- [39] Stremaska ME, Dai C, Venkatadri R, et al. IL233, an IL-2-IL-33 hybrid cytokine induces prolonged remission of mouse lupus nephritis by targeting Treg cells as a single therapeutic agent. *J Autoimmun*, 2019, 102: 133-141.
- [40] Venkatadri R, Sabapathy V, Dogan M, et al. Hybrid cytokine IL233 renders protection in murine acute graft vs host disease (aGVHD). *Cell Immunol*, 2021, 364: 104345.
- [41] Silva DA, Yu S, Ulge UY, et al. De novo design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15. *Nature*, 2019, 565(7738): 186-191.
- [42] Naing A, Callahan M, Costello B, et al. 509 A first-in-human phase 1 study of NL-201 in patients with relapsed or refractory cancer. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(suppl 2): A540.
- [43] Mullard A. Restoring IL-2 to its cancer immunotherapy glory. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(3): 163-165.

(本文责编 陈宏宇)