



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108602871 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201780007419.1

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(22)申请日 2017.01.19

代理人 陈文平 徐志明

(30)优先权数据

15/002,144 2016.01.20 US

(51)Int.Cl.

G07K 14/55(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

G07K 14/00(2006.01)

2018.07.19

G07K 16/46(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/014090 2017.01.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/127514 EN 2017.07.27

(71)申请人 德里尼亚公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 J·格雷沃

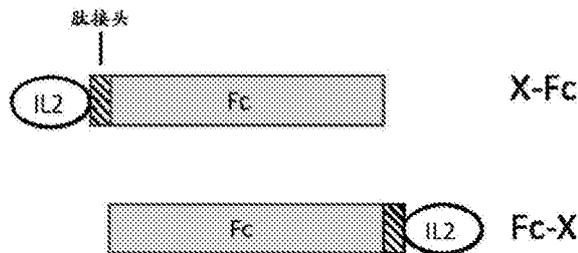
权利要求书2页 说明书32页
序列表65页 附图14页

(54)发明名称

用于治疗自身免疫疾病的选择性地活化调节性T细胞的分子

(57)摘要

本发明提供了使用接头的IL2 α β γ 选择性激动剂蛋白(IL2选择性激动剂)和IgG Fc蛋白之间的融合蛋白。该IL2选择性激动剂部分通过选择性地活化IL2 α β γ 形式的受体,因此选择性地刺激Tregs来提供治疗活性。该Fc部分提供与IL-2或IL2SA蛋白的循环半衰期相比延长的循环半衰期。



1. 一种融合蛋白,其包含人IL-2变体蛋白结构域、6-35个氨基酸的肽接头片段结构域和IgG Fc结构域,其中各结构域具有氨基末端(N-末端)和羧基末端(C-末端);且其中所述融合蛋白配置为使得所述人IL-2变体蛋白结构域的C-末端通过肽键与所述肽接头的N-末端融合和所述IgG Fc蛋白部分的N-末端通过肽键与所述肽接头的C-末端融合;

其中所述IL-2融合蛋白具有选择性地活化高亲和力IL-2受体且因此选择性地活化人调节性T细胞的能力。

2. 权利要求1所述的融合蛋白,其中所述IL-2变体蛋白包括相对于人IL2蛋白(SEQ ID NO:1)具有选自以下的置换的人IL-2:N88R、N88G、D20H、Q126L和Q126F。

3. 权利要求1所述的融合蛋白,其中所述IL-2变体蛋白包括具有置换C125S的人IL-2。

4. 权利要求1所述的融合蛋白,其中所述IL-2变体蛋白是SEQ ID NO:1中提供的N88R。

5. 权利要求1所述的融合蛋白,其中所述接头包含甘氨酸和丝氨酸残基且其中所述接头为10-30个氨基酸。

6. 权利要求1所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc蛋白包含一个或多个降低所述融合蛋白的Fc部分的效应子功能的氨基酸置换。

7. 一种融合蛋白,其包含:

a. IL-2变体蛋白,其相对于人IL-2(SEQ ID NO:1)具有氨基酸置换N88R和C125S;

b. 如SEQ ID NO:15中所示的接头肽;和

c. 如SEQ ID NO:2中所示的人IgG1Fc变体蛋白,

其中所述融合蛋白具有选择性地活化高亲和力IL-2受体且因此选择性地活化人调节性T细胞的能力。

8. 一种融合蛋白,其包含:

a. IL-2变体蛋白,其相对于人IL-2(SEQ ID NO:1)具有氨基酸置换N88R和C125S;

b. 如SEQ ID NO:15中所示的接头肽;和

c. 如SEQ ID NO:3中所示的人IgG2Fc蛋白。

9. 一种药物组合物,其包含权利要求1所述的融合蛋白和药学上可接受的载体。

10. 一种选择性地活化人调节性T细胞的方法,该方法包括施用包含以下的药物组合物:相对于人IL-2(SEQ ID NO:1)具有氨基酸置换N88R和C125S的IL-2变体蛋白、如SEQ ID NO:15中所示的接头肽和如SEQ ID NO:2中所示的人IgG1Fc蛋白,其中所述药物组合物以治疗有效剂量施用直到人调节性T细胞浓度达到所需水平。

11. 一种选择性地活化人调节性T细胞的方法,该方法包括施用包含以下的药物组合物:权利要求2的IL-2变体蛋白和选自以下的人IgG Fc蛋白:

a. 如SEQ ID NO:2中所示的人IgG1Fc蛋白;

b. 如SEQ ID NO:3中所示的人IgG2Fc蛋白;和

c. 如SEQ ID NO:24中所示的人IgG4Fc蛋白结构域,

其中所述药物组合物以治疗有效剂量施用直到人调节性T细胞浓度达到所需水平。

12. 一种测量人血液样品中的Treg细胞数量的方法,其是通过使人血液细胞与浓度1nM-0.01nM的权利要求1所述的融合蛋白接触,和然后通过流式细胞术检测与所述蛋白结合的细胞。

13. 一种二聚体蛋白,其包含两个相同的链,其中各链包含N-末端人IL-2变体蛋白部分

和C-末端IgG Fc蛋白部分,其中:

所述N-末端人IL-2变体蛋白部分

a. 具有N-末端和C-末端;

b. 与SEQ ID NO 1中的人IL-2野生型相比具有选自以下的至少一个置换的变化:N88R、N88G、D20H、Q126L和Q126F;

c. 与SEQ ID NO 1具有至少97%序列同一性;和

d. 具有通过结合Treg细胞上的IL2R $\alpha\beta\gamma$ 而活化那些细胞的能力;

所述N-末端人IL-2变体蛋白在其C-末端接合于6-30个氨基酸残基的氨基酸接头的N-末端,其中所述接头也具有C-末端;且

所述氨基酸接头的C-末端接合于IgG Fc蛋白部分的N-末端,该IgG Fc蛋白部分与SEQ ID No.2具有95%序列同一性且包含半胱氨酸残基;和其中所述两个链通过所述IgG Fc蛋白部分的半胱氨酸残基彼此连接。

14. 权利要求13所述的二聚体蛋白,其中所述IL-2变体蛋白还包括具有置换C125S的人IL-2。

15. 权利要求13所述的蛋白,其中所述氨基酸接头由选自甘氨酸残基、丝氨酸残基及甘氨酸和丝氨酸残基的混合物的接头组成。

16. 权利要求13所述的蛋白,其中所述IL-2变体蛋白部分具有置换N88R。

17. 权利要求13所述的蛋白,其中所述接头包含12-17个丝氨酸和甘氨酸残基的混合物。

18. 权利要求13所述的融合蛋白,其中所述接头包含4:1的甘氨酸残基-丝氨酸残基的比率。

19. 一种编码权利要求1所述的融合蛋白的核酸。

用于治疗自身免疫疾病的选择性地活化调节性T细胞的分子

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2016年1月20日提交的U.S.专利申请No. 15/002,144的优先权,该申请按引用全文合并于此。

[0003] 序列表的引用

[0004] 在2016年5月3日生成的88,573字节、机械格式IBM-PC、MS-Windows操作系统的文件SequenceListing_097584-000400US_ST25.txt中记载的序列表为所有目的按引用全文合并于此。

背景技术

[0005] 免疫系统必须能够区分自身和非自身。当自身/非自身区分失败时,免疫系统破坏身体的细胞和组织并因此导致自身免疫疾病。调节性T细胞主动地阻遏免疫系统的活化和防止病理性的自身反应性和作为结果的自身免疫疾病。开发选择性活化调节性T细胞的药物和方法用于治疗自身免疫疾病是密集研究的主题,且直到本发明的开发之前,主要是不成功的。

[0006] 调节性T细胞(Treg)是一类CD4+CD25+T细胞,其抑制其他免疫细胞的活性。Treg是免疫系统内稳态的中心,并在维持对自身抗原的耐受性和调节对外来抗原的免疫应答中起主要作用。多种自身免疫疾病和炎性疾病,包括1型糖尿病(T1D)、系统性红斑狼疮(SLE)和移植物抗宿主病(GVHD),已经显示具有Treg细胞数量或Treg功能的缺陷。因此,在开发加强Treg细胞的数量和/或功能的疗法方面存在极大兴趣。

[0007] 正在研究的用于自身免疫疾病的一种治疗方法是自体的、活体外扩增的Treg细胞的移植(Tang, Q. 等人, 2013, Cold Spring Harb. Perspect. Med., 3:1-15)。尽管这一方法已经在治疗疾病的动物模型和在数个早期人类临床试验中显示出前景,但其要求用患者自身的T细胞的个性化治疗,是创伤性的,并且是技术上复杂的。另一种方法是用低剂量白介素-2(IL-2)治疗。Treg细胞特征性地表达高组成型水平的高亲和力IL-2受体(IL2R $\alpha\beta\gamma$),其由亚基IL2RA(CD25)、IL2RB(CD122)和IL2RG(CD132)组成,且Treg细胞生长已经显示依赖于IL-2(Malek, T.R. 等人, 2010, Immunity, 33:153-65)。低剂量IL-2治疗慢性GVHD(Koreth, J. 等人, 2011, N Engl J Med., 365:2055-66)和HCV相关的自身免疫血管炎患者的临床试验(Saadoun, D. 等人, 2011, N Engl J Med., 365:2067-77)已经表明提高的Treg水平和临床效力的迹象。已经开始了研究IL-2在多种其他自身免疫和炎性疾病中的效力的新的临床试验。

[0008] Proleukin(由Prometheus Laboratories, San Diego, CA销售)(在这些试验中使用的IL-2的重组形式)伴有高的毒性。Proleukin被批准用于治疗转移性黑素瘤和转移性肾癌,但其副作用如此严重,以致其使用仅在具有使用重症监护的医院环境中被推荐(<http://www.proleukin.com/assets/pd/proleukin.pdf>)。直到Treg细胞的最近的表征,IL-2被认为是免疫系统刺激物,活化T细胞和其他免疫细胞以消除癌细胞。由于Treg细胞因其表达IL2R $\alpha\beta\gamma$ 而比许多其他免疫细胞类型响应于更低浓度的IL-2,IL-2在自身免疫疾病

中的临床试验已经采用了较低剂量的IL-2以靶向Treg细胞(Klatzmann D, 2015 Nat Rev Immunol. 15:283-94)。然而,即使这些较低剂量导致安全性和耐受性问题,使用的治疗已经采取了每日皮下注射(长期地或以间歇5天的治疗过程)。因此,对以下的自身免疫疾病疗法存在需求:其加强Treg细胞数量和功能,比IL-2更特异性地靶向Treg细胞,更安全和更可耐受,且较不频繁地施用。

[0009] 改善基于IL-2的疗法的治疗指数的一种方法是使用IL-2的变体,其相对于其他免疫细胞对Treg细胞是选择性的。IL-2受体在包括T细胞、NK细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞的多种不同免疫细胞类型上表达,且这一宽的表达谱很可能造成其对免疫系统的多效作用和高的系统性毒性。IL-2受体以三种形式存在:(1)低亲和力受体IL2RA,其不发信号;(2)中等亲和力受体(IL2R β γ),由IL2RB和IL2RG组成,其在常规T细胞(Tcons)、NK细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞上广泛表达;和(3)高亲和力受体(IL2R $\alpha\beta$ γ),由IL2RA、IL2RB和IL2RG组成,其在活化的T细胞上瞬时表达和在Treg细胞上组成型表达。已经开发了相对于IL2R β γ 对IL2R $\alpha\beta$ γ 选择性的IL-2变体(Shanafelt, A. B. 等人, 2000, Nat Biotechnol. 18:1197-202; Cassell, D. J. 等人, 2002, Curr Pharm Des., 8:2171-83)。这些变体具有降低其对IL2RB的亲合力的氨基酸置换。由于IL-2具有对IL2RG不可检测的亲合力,这些变体因此具有降低的对IL2R β γ 受体复合物的亲和力和减少的活化表达IL2R β γ 的细胞的能力,但保留结合IL2RA的能力和结合并活化IL2R $\alpha\beta$ γ 受体复合物的能力。基于表达IL2R β γ 的NK细胞是对毒性的主要贡献者的假设,这些变体之一,IL2/N88R (Bay 50-4798),临床上作为免疫系统刺激物的IL-2低毒性形式被测试。Bay 50-4798显示为相对于NK细胞选择性地刺激活化的T细胞的增殖,并在癌症患者(Margolin, K. 等人, 2007, Clin Cancer Res., 13:3312-9)和HIV患者(Davey, R. T. 等人, 2008, J Interferon Cytokine Res., 28:89-100)的I/II期临床试验中被评价。这些临床试验显示,Bay 50-4798比Proleukin显著地更安全和更可耐受,并且还显示,其提高了患者中CD4+T细胞和CD4+CD25+T细胞的水平。但是,CD4+T细胞和CD4+CD25+T细胞的增加不指示Treg细胞的增加,因为Treg的鉴别需要CD4和CD25之外的另外的标志物,和因为Treg细胞是CD4+CD25+T细胞的小部分。在这些临床试验之后,该领域中的研究更充分地确立了Treg细胞的身份并表明Treg细胞选择性地表达IL2R $\alpha\beta$ γ (在Malek, T. R. 等人, 2010, Immunity, 33:153-65中综述)。基于这一新的研究,现在可理解,IL2R $\alpha\beta$ γ 选择性激动剂对Treg细胞应当是选择性的。

[0010] 改善基于IL-2的疗法的治疗指数的第二种方法是优化该分子的药代动力学以最大地刺激Treg细胞。IL-2作用的早期研究表明,体外人类T细胞增殖的IL-2刺激要求暴露于有效浓度的IL-2至少5-6小时(Cantrell, D. A. 等人, 1984, Science, 224:1312-1316)。当施用于人类患者时,IL-2具有非常短的血浆半衰期:对于静脉内施用为85分钟和对于皮下施用是3.3小时(Kirchner, G. I. 等人, 1998, Br J Clin Pharmacol. 46:5-10)。由于其短的半衰期,维持循环IL-2处于或高于刺激T细胞增殖必需的水平持续必要的持续时间使高剂量(这导致峰值IL-2水平显著高于对于Treg细胞的EC50)成为必需或要求频繁施用(图1)。这些高IL-2峰值水平可活化IL2R β γ 受体并具有其他非预期的或不良的作用。具有比IL-2更长的循环半衰期的IL-2类似物可在比IL-2低的浓度下和以较低峰值水平实现目标药物浓度持续指定的时间段。因此,此类IL-2类似物将要求比IL-2更低的剂量或较不频繁施用来有效地刺激Treg细胞。事实上,在给药循环半衰期14小时的IgG-IL2融合蛋白的食蟹猴中,

与等摩尔剂量的IL-2相比刺激稳定得多的Treg的增加(Bell等人,2015,J Autoimmun.56:66-80)。IL-2药物的较不频繁的皮下施用也将对于患者更可耐受。具有这些特征的治疗将在临床上转化为改进的药理学效力、减少的毒性和改善的患者对疗法的顺应性。

[0011] 延长治疗性蛋白的半衰期的一种方法是将分子的治疗活性部分与另一蛋白质如IgG的Fc区融合以增加循环半衰期。治疗性蛋白与IgG Fc的融合通过增加蛋白质的流体力学半径(因此减少肾清除)和通过新生Fc受体(FcRn)介导的融合蛋白的再循环(因此延长循环半衰期)而实现这一目的。治疗性蛋白与白蛋白的融合(Sleep,D.等人,2013,Biochem Biophys Acta.,1830:5526-34)和与非免疫原性氨基酸聚合物蛋白质的融合(Schlapschy, M.等人,2007,Protein Eng Des Sel.20:273-84;Schellenberger,V.等人,2009,Nat Biotechnol.27:1186-90)也已经用于增加循环半衰期。但是,这类融合蛋白以确保IL2选择性激动剂伴体的稳定生物学活性的方式构建可能是不可预测的,特别是在IL2选择性激动剂(其在与受体亚基之一的结合中是缺陷的且必须组装三个受体亚基的复合物以激活受体的小蛋白质)的情况下(Wang,X.等人,2005,Science 310:1159-63)。

[0012] 其它研究者已经使用野生型IL-2或具有促进稳定性的C125S置换的IL-2产生了各种IL-2融合蛋白。Morrison和同事(Penichet,M.L.等人,1997,Hum Antibodies.8:106-18)产生了具有与野生型IL-2融合的IgG的融合蛋白以同时增加IL-2的循环半衰期和将IL-2靶向于特定抗原而用于增强对该抗原的免疫反应的目的。这一融合蛋白由完整抗体分子组成,该完整抗体分子由重链(H)和轻链(L)构成,其中N-末端H链部分与C-末端IL-2蛋白部分融合。这一IgG-IL-2融合蛋白具有Fc效应子功能。IgG Fc蛋白的关键效应子功能是补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。IgG-IL-2融合蛋白在IL-2生物测定中是高度活性的且显示为具有CDC活性。因此,Penichet等人教导使用抗体-IL2融合蛋白以将IL-2活性靶向于被抗体识别的抗原,用于增强对抗原的体液和细胞介导免疫反应的目的。以相似的方式,Gillies和同事已经构建了用于癌症免疫疗法的多种IgG-IL-2融合蛋白,其利用融合蛋白的抗体部分以靶向抗原,和利用IL-2部分以刺激对肿瘤细胞的免疫反应(在Sondel,P.M.等人,2012,Antibodies,1:149-71中综述)。这些教导与本发明的技术非常不同,其中IL-2选择性激动剂(其促进免疫抑制性Treg细胞的生长和活性)与缺乏效应子功能的Fc蛋白部分融合而用于增加系统性暴露的目的。

[0013] Strom及其同事已经构建了具有与Fc蛋白的N末端融合的IL-2的融合蛋白而用于消除表达高亲和力IL-2受体的活化T细胞的目的(Zheng,X.X.等人,1999,J Immunol.1999,163:4041-8)。这一融合蛋白显示为在T细胞转移的T1D小鼠模型中抑制自身免疫性糖尿病的发生。IL2-Fc融合蛋白显示为在移植到较低疾病易感的雄性NOD小鼠中时抑制来自T1D-易感的雌性NOD小鼠的促疾病T细胞的功能。它们也证明IL-2-Fc融合蛋白可以在体外杀死表达高亲和力IL-2受体的细胞。这些研究者进一步比较了从源自具有效应子功能的IgG2b Fc和突变的效应子功能缺陷的IgG2b Fc的Fc构建的IL2-Fc融合蛋白。仅包含具有效应子功能的Fc的IL2-Fc融合蛋白在预防疾病发作方面是有效的。因此,这些研究者教导,具有效应子功能的IL2-Fc融合蛋白可以消除引起疾病的活化T细胞,且Fc效应子功能是其治疗活性所需要的。这些教导与本发明的技术是非常不同的,其中IL-2选择性激动剂(其促进免疫抑制性Treg细胞的生长和活性)与效应子功能缺陷的Fc蛋白部分融合而用于增加系统性暴露和优化Treg扩增的目的。Strom和同事的其它工作教导使用IL2-Fc融合蛋白来促进移植

耐受 (Zheng, X. X. 等人, 2003, *Immunity*, 19:503-14)。在这一工作中, IL2-Fc融合蛋白在其中其与IL15-Fc受体拮抗剂和雷帕霉素联用的“三联疗法”中使用。而且, 这些研究者教导, IL2-Fc融合蛋白必须具有Fc效应子功能而成为有效的, 并进一步教导这一IL-2-Fc融合蛋白必须与两种其它分子组合以成为有效的。

[0014] 本发明提供了新型治疗剂, 具有6-30个氨基酸的肽接头的IL2选择性激动剂-Fc融合蛋白。这种构型将IL2选择性激动剂对于Treg细胞的高细胞选择性与长的循环半衰期结合。在开发这一分子的过程中, 具有令人惊讶和出人意料的发现, 其揭示了对于生物活性必要的该蛋白质的结构元件和设计特征, 且其导致满足所需的治疗特征的几种新型蛋白质的发现。

发明内容

[0015] 本发明提供了IL2 $\alpha\beta\gamma$ 选择性激动剂蛋白(IL2选择性激动剂)和IgG Fc蛋白之间的融合蛋白, 其中IL2激动剂和Fc蛋白通过17 Å-105 Å的接头分隔并配置为使得IL2激动剂在分子的N末端和Fc蛋白在C末端。IL2选择性激动剂部分通过选择性地活化IL2 $\alpha\beta\gamma$ 形式的受体, 因而选择性地刺激Treg来提供治疗活性。Fc部分与IL-2或IL2选择性激动剂蛋白的循环半衰期相比提供了延长的循环半衰期。Fc部分通过增大融合蛋白的分子大小到大于60,000道尔顿(其是肾的大分子肾小球过滤的近似截止值)和通过经由新生Fc受体(FcRn)蛋白(该受体结合和再循环IgG)再循环融合蛋白而因此延长其循环半衰期来增加循环半衰期。Fc部分也是Fc效应子功能(如补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC))缺陷的, 从而使得融合蛋白能够选择性地活化Treg以增强Treg功能和扩增Treg数量。两个蛋白质部分以保持IL2选择性激动剂部分的稳定生物活性和使得Fc部分能够促进延长的循环半衰期并因此有效地强化Treg功能和数量的方式融合。Treg的这种强化将抑制过度旺盛的自身免疫性或炎性反应, 并具有治疗自身免疫性或炎性疾病的益处。本发明的蛋白质可以是单体的或通过Fc部分或结构域中的半胱氨酸残基形成二聚体的二聚形式。

[0016] 更具体地, 本发明提供了融合蛋白, 其包含:N-末端人IL-2变体蛋白部分和C-末端IgG Fc蛋白部分, 其中所述IL-2融合蛋白具有选择性地活化高亲和力IL-2受体且因此选择性地活化人调节性T细胞的能力。IL-2的变体包括相对于人IL2蛋白具有选自以下的置换的那些:N88R、N88G、D20H、Q126L和Q126F。SEQ ID NO:1是变体IL-2/N88R, 具有对应于wt IL2的编号。另外, IL-2变体蛋白任选地包括具有置换C125S的人IL-2。优选的是本发明的蛋白质是融合的, 其中IL-2变体蛋白和IgG Fc蛋白两者都具有N-末端和C-末端且所述人IL-2变体蛋白在其C-末端与IgG Fc蛋白的N-末端融合。还公开了IL-2变体结构域的活性在接头肽位于IL-2变体蛋白和IgG Fc蛋白部分之间时极大增强。IgG Fc蛋白部分或结构域任选地缺乏Fc效应子功能或包含一个或多个降低融合蛋白的Fc部分的效应子功能的氨基酸置换。

[0017] 本发明的实例是一种蛋白质, 其包含: 相对于人IL-2具有氨基酸置换N88R和C125S的IL-2变体蛋白(SEQ ID NO:1-N88R)、如SEQ ID NO:15中所示的接头肽和如SEQ ID NO:2中所示的具有置换N297A的人IgG1Fc蛋白, 其中所述融合蛋白具有选择性地活化高亲和力IL-2受体且因此选择性地活化人调节性T细胞的能力。本发明的可选蛋白质包括: 相对于人IL-2具有氨基酸置换N88R和C125S的IL-2变体蛋白(SEQ ID NO:1-N88R)、如SEQ ID NO:15中所示的接头肽和如SEQ ID NO:3中所示的人IgG2Fc蛋白。

[0018] 本发明的更具体的实施方式是二聚体蛋白,其包含两个相同的链,其中各链包含N-末端人IL-2变体蛋白部分和C-末端IgG Fc蛋白部分,其中:N-末端人IL-2变体蛋白部分具有N-末端和C-末端,与SEQ ID NO:1中的人IL-2野生型相比具有选自以下的至少一个置换的变化:N88R、N88G、D20H、Q126L和Q126F,与SEQ ID NO:1具有至少90或95或97%序列同一性;和具有通过结合Treg细胞上的IL2R $\alpha\beta\gamma$ 而活化那些细胞的能力;N-末端人IL-2变体蛋白在其C-末端接合于6-20或6-30个氨基酸残基的氨基酸接头的N-末端,其中所述接头也具有C-末端;且氨基酸接头的C-末端接合于IgG Fc蛋白部分的N-末端,该IgG Fc蛋白部分与例如SEQ ID NO:3 (IgG2)或SEQ ID No.2 (IgG1N297A)具有90或95或97%序列同一性且包含半胱氨酸残基;和其中两个链通过形成IgG Fc蛋白部分的链间二硫键的半胱氨酸残基彼此连接。本发明的二聚体可以进一步在IL-2部分的C125S处被置换。本发明的蛋白质优选包括由甘氨酸残基、丝氨酸残基及甘氨酸和丝氨酸残基的混合物组成的氨基酸接头。接头可以优选地以3:1-5:1范围的甘氨酸残基-丝氨酸残基的比率(例如4:1的比率)包含12-17个丝氨酸和甘氨酸残基的混合物。

[0019] 本发明还提供包含药学上可接受的载体的药物组合物中的以上组合物。

[0020] 本发明还提供编码本文所述蛋白质的核酸。核酸优选地与可设计用于与宿主细胞基因组重组或引入到独立复制的质粒或染色体外核酸上的表达盒可操作地连接。

[0021] 本发明还提供在需要的患者中选择性地活化人调节性T细胞的方法,该方法包括施用药物组合物,包括以治疗有效剂量施用所述的组合物直到人调节性T细胞浓度达到所需水平。

[0022] 通过将人血液细胞与1nM-0.01nM浓度的权利要求1的融合蛋白接触和然后通过流式细胞术检测与蛋白质结合的细胞来测量人血液样品中Treg细胞的数量数的方法。

附图说明

[0023] 图1是单剂量的IL-2或具有增加的半衰期的IL2-Fc融合蛋白后,循环半衰期、峰值药物水平、生物有效浓度和刺激Treg细胞增殖必需的持续时间之间的关系图解说明。虚线代表皮下注射后随时间的IL-2血液水平,且实线代表随时间的IL2-Fc融合蛋白血液水平。水平点线指示分别活化表达IL2R $\alpha\beta\gamma$ 和IL2R $\beta\gamma$ 的细胞必需的浓度(EC50值)。双箭头指示在刺激细胞增殖必需的EC50下暴露于IL-2的暴露持续时间(5-6hr)。

[0024] 图2显示Fc融合蛋白的设计构型。融合伴侣(X)可以在Fc蛋白的N末端(X-Fc)或C-末端(Fc-X)处融合。接头肽可以在X和Fc之间插入。

[0025] 图3A-3C显示CD4+T细胞中IL-2和N88RL9AG1刺激的STAT5磷酸化的剂量-反应,如通过流式细胞术测量的。细胞在37C下用IL-2或N88RIL2-Fc以在上方所示的浓度下处理10分钟,固定,渗透化,用抗体染色和然后进行流式细胞术分析,如实施例3中所述的。显示了分选(gate)为CD4+的细胞及针对CD25和pSTAT5进一步分选的细胞,如4个象限的每一个中所示的。各象限中的数字指示各个分选中CD4+细胞的百分比。上方象限中的细胞代表最高的1-2%的CD25表达细胞,Treg细胞富集的群体,且右方象限中的细胞是pSTAT5+。图3A.N88RL9AG1以高选择性仅刺激CD25^高细胞,而IL-2重度地刺激CD25^低和CD25^高细胞两者直到皮摩尔浓度。图3B.D20HLOG2没有pSTAT5刺激活性。在两个独立的实验中没有观察到pSTAT5激活。图3C.对照显示D20H/IL2刺激CD25^高细胞中的pSTAT5而D20HLOG2不刺激。图形

以假色模式显示。两种蛋白质以 10^{-8} M的浓度测试。

[0026] 图4显示用N88RL9AG1处理的CD4⁺T细胞表现出表达高水平FOXP3的细胞中pSTAT5水平的刺激。细胞用 4×10^{-9} M IL-2或N88RL9AG1处理和然后如实施例3中所述分析。大多数用N88RL9AG1处理的pSTAT5⁺细胞也是FOXP3⁺，而用IL-2处理的pSTAT5⁺细胞也是FOXP3⁻和FOXP3⁺两者，其中大多数是FOXP3⁻。

[0027] 图5A-5B显示HEK293细胞中产生的不同Fc融合构建体的蛋白质产量。蛋白质在优化的瞬时表达系统中平行表达并如实施例1中所述纯化。结果表示为来自30ml培养物的纯化蛋白质的最终产率。图5A. N88R/IL2-Fc融合蛋白的蛋白质产量随增加的肽接头长度提高。图5B. wt IL2-Fc融合蛋白的产量仅随15残基肽接头略微提高。D20H/IL2-Fc融合蛋白的较高产量在X-Fc构型而非Fc-X构型中获得。

[0028] 图6A-6B显示IL-2生物活性对N88R/IL2-Fc融合蛋白中的肽接头长度的相关性。(图6A) CD25^高CD4⁺T细胞 (Tregs) 中的pSTAT5信号随增大的肽接头长度增加。(图6B) 在CD25^{-/低}细胞中没有观察到任何N88R/IL2-Fc蛋白的明显pSTAT5信号。 10^{-8} M IL-2内部对照的pSTAT5信号通过黑色三角形显示在两个图中。

[0029] 图7显示人Tregs中D20H/IL2-Fc融合蛋白的生物活性。D20HL15AG1的效力显著低于N88RL15AG1的效力，且D20HL15AG1 (X-Fc构型) 和AG1L15D20H (Fc-X构型) 具有相似的效力。所有3种蛋白质具有15残基肽接头。

[0030] 图8A-8B显示具有或没有15残基肽接头的wt IL-2-Fc pSTAT5活性的生物活性。IL-2生物活性在Tregs细胞 (图8A) 和CD25^{-/低}细胞 (图8B) 中通过15残基肽接头仅适度地增强。

[0031] 图9. 人PBMC中的7种不同免疫细胞类型上IL-2和IL-2选择性激动剂蛋白的选择性。N88RL15AG1与wt IL-2和WTL15AG1相比对于Treg具有高度选择性，且在多种细胞类型中显示比N88R/IL2更高的选择性。

具体实施方式

[0032] 引言

[0033] 本发明是包含三个关键蛋白质元件的新型治疗性融合蛋白：(1) 工程化的IL-2细胞因子，其经修饰以对Treg细胞是高度选择性的，(2) 效应子功能缺陷的Fc蛋白，其增加蛋白质的循环半衰期和(3) 两个部分之间的肽接头，其是融合蛋白的高生物学活性所必需的。融合蛋白配置为使得IL-2结构域通过IL-2结构域的C-末端连接于接头肽的N-末端。Fc结构域通过其N-末端连接于接头的C-末端。在之前的具有或没有短肽接头的研究中，据报告n-IL-2:c-Fc融合蛋白缺乏显著的生物活性。这导致聚焦于反向构型n-Fc:c-IL-2，其中Fc区连接接头的N-末端和IL-2结构域形成融合蛋白的羧基末端。

[0034] 在Fc的N-末端上具有生物活性融合伴体结构域的Fc融合蛋白是优选的构型，因为生物活性结构域替代了IgG的Fab部分。在Fc的C-末端上具有生物活性融合伴体结构域的Fc融合蛋白是较不优选的构型，因为IgG Fc的C-末端潜在地损害其结合其它分子如Fc受体FcRn (其是Fc蛋白的长循环半衰期所需的) 的能力。与Fc的C-末端融合的IL2融合蛋白已报告为具有比对于Fc融合蛋白预期的短得多的循环半衰期，表明Fc的功能或稳定性受到损害。因此，具有对于IL-2生物活性所必需的其长肽接头的本发明代表了与现有技术中IL-2

融合蛋白的教导相反的显著的和意料不到的进步。由本发明定义的分子将使得能够通过刺激阻遏自身免疫性和炎性病理的T细胞小亚群的产生的新机制安全和有效地治疗自身免疫疾病。这种打破范例的治疗剂预期治疗许多不同的自身免疫疾病。

[0035] 定义

[0036] 如本文使用的“与序列ID No.1的至少某百分比(例如90或95或97%)的序列同一性”是指两个或更多个核酸或多肽的序列相同的程度。目标序列与第二序列之间在评价窗口上(例如目标序列的长度上)的百分同一性可通过以下计算:比对序列;确定评价窗口内与相同残基相对的残基(核苷酸或氨基酸)的数目,允许引入缺口以使同一性最大化;除以感兴趣的序列或第二序列(无论哪个更大)落入评价窗口内的残基的总数目;并乘以100。当计算实现特定百分同一性所需的相同残基的数目时,分数将舍入到最接近的整数。百分同一性可使用多种计算机程序计算。例如,计算机程序诸如BLAST2、BLASTN、BLASTP、Gapped BLAST等生成比对并提供目标序列之间的百分同一性。Karlin和Altschul的算法(Karlin和Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:22264-2268, 1990), 如在Karlin和Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993中改进的, 被并入到Altschul等人的NBLAST和XBLAST程序中(Altschul等人, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。为了获得带空位的比对以用于比较目的, 利用Gapped BLAST, 如在Altschul等人(Altschul等人, Nucleic Acids Res. 25 3389-3402, 1997)中描述的。当利用BLAST和Gapped BLAST程序时, 可使用各自程序的缺省参数。可使用PAM250或BLOSUM62矩阵。用于进行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)公开获得。对于这些程序, 参见具有URL全球网址“ncbi.nlm.nih.gov”的Web站点。在特定实施方案中, 使用BLAST2利用由NCBI提供的缺省参数计算百分同一性。

[0037] “N-末端”是指携带氨基基团的肽或多肽的末端, 与携带羧酸基团的羧基末端相反。

[0038] “C-末端”是指携带羧酸基团的肽或多肽的末端, 与携带氨基基团的氨基末端相反。

[0039] “C-末端IgG Fc蛋白部分”是指衍生自两个相同蛋白质片段的融合蛋白的部分, 各蛋白质片段具有IgG分子的两个重链的铰链区、第二恒定域和第三恒定域, 且由通过铰链区彼此二硫键键合的羧基末端重链组成。其在功能上定义为与补体蛋白C1q和IgG-Fc受体(Fc γ R)相互作用的IgG分子的部分, 从而介导补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)效应子功能。序列可以修饰以降低效应子功能, 增加循环半衰期和消除糖基化位点。

[0040] IL2变体

[0041] 本发明的IL-2变体蛋白是IL-2 $\alpha\beta\gamma$ 选择性激动剂。在功能上它们相对于IL2R $\beta\gamma$ 受体复合物选择性地活化IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体复合物。其衍生自野生型IL-2蛋白, 所述野生型IL-2蛋白在结构上定义为与序列ID No.1的野生型IL-2具有至少95%序列同一性, 并且在功能上由优先活化Treg细胞的能力定义。该蛋白还可在功能上由其选择性地活化Treg中IL-2受体信号转导的能力定义, 如由Treg细胞中与CD4+CD25-/低T细胞或NK细胞相比磷酸化STAT5蛋白的水平测量的, 或由植物凝集素刺激的T细胞相对于NK细胞的选择性活化测量的。

[0042] “N-末端IL-2变体蛋白部分”是指融合蛋白的N-末端结构域, 其源自结构上和功

能上如上定义的野生型IL-2蛋白。

[0043] “C-末端”是指携带羧酸基团的肽或多肽的末端，与携带氨基基团的氨基末端相反。

[0044] Treg

[0045] “Treg”或“Treg细胞”是指调节性T细胞。调节性T细胞是一类T细胞，其抑制其他免疫细胞的活性，并使用流式细胞术由细胞标志物表型CD4+CD25+FOXP3+定义。由于FOXP3是细胞内蛋白并要求细胞固定和渗透化来染色，可使用细胞表面表型CD4+CD25+CD127-用于定义活的Treg。Treg还包括各种Treg亚类，诸如tTreg (胸腺衍生的) 和pTreg (从外周中的幼稚T细胞外周衍生的、分化的)。所有Treg表达IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体，不产生其自身的IL-2并且依赖于IL-2来生长，且本领域技术人员将认识到，两个种类将被IL2R $\alpha\beta\gamma$ 选择性激动剂选择性地活化。

[0046] 肽接头

[0047] “肽接头”定义为位于包含融合蛋白的两个蛋白质之间的氨基酸序列，使得接头肽序列不是源自任一伴体蛋白。为促进正确的蛋白质折叠和组成蛋白质部分的稳定性，肽接头作为间隔体并入融合蛋白中，以改善蛋白质表达或实现两个融合伴体的更好生物活性 (Chen等人, 2013, Adv Drug Deliv Rev. 65 (10) :1357-69)。肽接头可以分为非结构化柔性肽或刚性结构化肽。

[0048] Fc融合蛋白

[0049] “Fc融合蛋白”是通过重组DNA技术制成的蛋白质，其中哺乳动物IgG蛋白的Fc结构域的翻译阅读框与另一蛋白质 (“Fc融合伴体”) 的翻译阅读框融合以产生新的单一重组多肽。Fc融合蛋白通常作为通过位于铰链区中的二硫键接合在一起的二硫键连接的二聚体产生。

[0050] 功能活化

[0051] “生物活性”是指在定量的基于细胞的体外测定中生物活性的测量。

[0052] “Treg细胞的功能活化”定义为Treg中IL-2介导的反应。对于Treg细胞的功能活化的分析读出值包括pSTAT5的刺激、Treg细胞增殖和Treg效应物蛋白水平的刺激。

[0053] 设计和构建

[0054] 对于Fc融合蛋白的设计和构建存在多种选择，且在这些设计选项之间的选择在下面给出以允许生成具有所需生物学活性和药理学特征的分子。关键的设计选项是：(1) IL2选择性激动剂的特性，(2) Fc蛋白部分的选择，(3) 融合蛋白中融合伴体的构型和(4) Fc和融合伴体之间的接合区的氨基酸序列。

[0055] 一般方法

[0056] 通常，本发明的融合蛋白的制备可由本文公开的程序和由公认的重组DNA技术实现，所述公认的重组DNA技术包括例如，聚合酶链式扩增反应 (PCR)、质粒DNA的制备、用限制性酶的DNA切割、寡核苷酸的制备、DNA的连接、mRNA的分离、DNA引入适当细胞中、宿主的转化或转染、宿主的培养。另外，可以使用离液剂和熟知的电泳、离心和色谱方法分离和纯化融合分子。关于这些方法的公开内容一般参见，Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第二版) (1989)；和Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, New York (1989)。

[0057] 编码本发明的融合蛋白的基因包括作为用于产生编码所需融合体的DNA的基本步骤的限制性酶消化和连接。DNA片段的末端可能需要在连接之前修饰,且这可通过用填充突出端、用核酸酶(例如,ExoIII)删除片段的末端部分、定点诱变或通过PCR添加新的碱基对来实现。可使用多接头和衔接子来促进所选片段的连接。表达构建体通常以使用数轮限制性酶切、连接和大肠杆菌转化的阶段组装。适合于构建表达构建体的许多克隆载体是本领域已知的(λ .ZAP和pBLUESCRIPT SK-1, Stratagene, LaJolla, Calif., pET, Novagen Inc., Madison, Wis.--Ausubel等人,1999中引用的)并且特定的选择对于本发明不是关键的。克隆载体的选择将受被选择用于将表达构建体引入宿主细胞中的基因转移系统的影响。在每个阶段结束时,可通过限制性酶切、DNA序列、杂交和PCR分析来分析所得的构建体。

[0058] 定点诱变通常用于通过本领域已知的方法将特定突变引入编码本发明的融合蛋白的基因中。参见例如,美国专利申请公布2004/0171154;Storici等人,2001,Nature Biotechnology 19:773-776;Kren等人,1998,Nat.Med.4:285-290;及Calissano和Macino,1996,Fungal Genet.Newslett.43:15-16。可在本发明中使用任何定点诱变程序。存在许多可用于制备本发明的变体的可得的商业试剂盒。

[0059] 可以根据本发明使用各种启动子(转录起始调控区)。合适的启动子的选择取决于所提议的表达宿主。可以使用来自异源来源的启动子,只要它们在所选宿主中是功能性的。

[0060] 可以使用各种信号序列来促进本文所述的蛋白质的表达。选择或设计信号序列用于有效分泌并且也可以使用表达宿主中的加工。与TCR编码序列或小鼠IL-2编码序列同源的信号序列可用于哺乳动物细胞。其它合适的信号序列/宿主细胞对包括用于在枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)中分泌的枯草芽孢杆菌*sacB*信号序列和用于巴斯德毕赤酵母(*P.pastoris*)分泌的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) α -交配因子或巴斯德毕赤酵母酸性磷酸酶*phoI*信号序列。信号序列可以通过编码信号肽酶裂解位点的序列直接连接到蛋白编码序列,或通过短核苷酸桥连接。

[0061] 已经鉴定了用于真核蛋白表达系统的用于增强转录和翻译的元件。例如,将花椰菜花叶病毒(CaMV)启动子1000bp放置在异源启动子的任一侧可在植物细胞中将转录水平提高10至400倍。表达构建体还应包括合适的翻译起始序列。修饰表达构建体以包括用于正确翻译起始的Kozak共有序列可将翻译水平提高10倍。

[0062] 将表达盒连接到与正在使用的宿主相容的合适载体。载体必须能够适应编码待表达的融合蛋白的DNA序列。合适的宿主细胞包括真核和原核细胞,优选地可容易地被转化并在培养基中表现出快速生长的那些细胞。特别优选的宿主细胞包括原核细胞如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等,以及真核细胞如动物细胞和酵母菌株,例如酿酒酵母。通常优选哺乳动物细胞,特别是HEK、J558、NS0、SP2-0或CHO。其它合适的宿主包括例如昆虫细胞如Sf9。使用常规的培养条件。参见Sambrook,同上。然后可以选择稳定的转化或转染细胞系。体外转录-翻译系统也可以用作表达系统。

[0063] 可以通过用于转染细胞的标准技术将编码期望的融合蛋白的核酸引入宿主细胞中。术语“转染的(transfecting)”或“转染(transfection)”旨在包括用于将核酸引入宿主细胞中的所有常规技术,包括磷酸钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质转染、电穿孔、显微注射、病毒转导和/或整合。用于转染宿主细胞的合适方法可见于Sambrook等人,同上和其他实验室教科书中。

[0064] 可选地,人们可使用合成基因构建用于本文所述的蛋白质的全部或部分的构建。这要求体外合成设计的多核苷酸分子以编码感兴趣的多肽分子。基因合成可以使用多种技术进行,诸如Tian等人描述的基于多重微芯片的技术(Tian等人,Nature 432:1050-1054)和其中寡核苷酸被合成和在光可编程微流体芯片(photo-programmable microfluidic chip)上组装的类似技术。

[0065] 本发明的融合蛋白从收获的宿主细胞或从培养基分离。使用标准蛋白纯化技术从培养基或从收获的细胞分离感兴趣的蛋白质。特别地,纯化技术可用于从多种方法大规模(即至少毫克量)表达和纯化期望的融合蛋白,所述方法包括滚瓶、旋转瓶、组织培养板、生物反应器或发酵罐。

[0066] IL2选择性激动剂部分

[0067] 具有置换N88R的IL-2是IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体的IL2选择性激动剂的示例性情况(Shanafelt,A.B.等人,2000,Nat Biotechnol.18:1197-202)。IL2/N88R缺乏与IL2R β 受体亚基和IL2R $\beta\gamma$ 受体复合物的结合,但能够与wt IL-2一样有效地与IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体复合物结合并刺激表达IL2R $\alpha\beta\gamma$ 的PHA活化的T细胞的增殖,尽管表现出刺激表达IL2R $\beta\gamma$ 的NK细胞增殖的能力降低3,000倍。具有相似活性谱的其他IL2R $\alpha\beta\gamma$ 选择性激动剂包括具有置换N88G和D20H的IL-2,且具有置换Q126L和Q126F(与IL2RG亚基的接触残基)的其它IL2变体也具有IL2R $\alpha\beta\gamma$ 选择性激动剂活性(Cassell,D.J.等人,2002,Curr Pharm Des.,8:2171-83)。本领域技术人员将认识到,这些IL2选择性激动剂分子的任一种可以置换IL2/N88R部分,以期望Fc融合蛋白将具有相似的活性。所有上述突变可以在wt IL-2或具有置换C125S的wt IL-2的背景下进行,置换C125S是通过消除未配对的半胱氨酸残基而促进IL-2稳定性的置换。本发明还可以与改善产生或稳定性而不显着影响IL-2受体活化活性的其它突变或截短一起使用。

[0068] 本发明的变体任选地包括应用于氨基酸和核酸序列的保守置换的变体。关于特定核酸序列,保守修饰的变体是指编码相同或基本相同的氨基酸序列的那些核酸,或当核酸不编码氨基酸序列时,指基本上相同的序列。具体地,简并密码子置换可以通过产生其中一个或多个选择的(或所有)密码子的第三位置被混合的碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等人,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);Rossolini等人,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。由于遗传密码的简并性,大量功能相同的核酸编码任何给定的蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在其中丙氨酸被密码子指定的每个位置处,该密码子可被改变为所描述的相应密码子中的任一个而不改变编码的多肽。此类核酸变异是沉默变异,其是一种类型的保守修饰的变异。本文的编码多肽的每个核酸序列也描述核酸的每个可能的沉默变异。技术人员将认识到,核酸中的每个密码子(除了AUG,其通常是甲硫氨酸的唯一密码子,和TGG,其通常是色氨酸的唯一密码子)可被修饰以产生功能上相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异隐含在每个所述序列中。

[0069] 对于氨基酸序列的保守置换,技术人员将认识到,在编码的序列中改变、添加或删除单一氨基酸或小百分比的氨基酸的核酸、肽、多肽或蛋白序列的单个置换、缺失或添加是保守修饰的变体,其中该改变导致氨基酸置换为化学上相似的氨基酸。提供功能相似的氨基酸的保守置换表是本领域公知的。此类保守修饰的变体是本发明的多态性变体、种间同

源物和等位基因以外的但不排除本发明的多态性变体、种间同源物和等位基因。

[0070] 以下组各自含有彼此为保守置换的氨基酸：

[0071] 1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G)；

[0072] 2) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；

[0073] 3) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；

[0074] 4) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；

[0075] 5) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)；

[0076] 6) 精氨酸(R)、赖氨酸(K)、组氨酸(H)；

[0077] 7) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、缬氨酸(V)；和

[0078] 8) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

[0079] Fc蛋白部分

[0080] 关键的设计选择是Fc蛋白部分的特性。Fc融合蛋白的主要治疗应用是(1)赋予融合伴侣蛋白以免疫球蛋白Fc效应子功能；或(2)增加融合伴侣蛋白的循环半衰期(Czajkowsky等人,2012,EMBO Mol Med.4:1015-28)。IgG蛋白的主要效应子功能是补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC),其为分别通过Fc与补体蛋白C1q和与IgG-Fc受体(Fc γ R)结合介导的功能。这些效应子功能在治疗蛋白用于指导或增强对特定抗原或细胞的免疫反应时是重要的。本发明的融合蛋白仅仅设计为增加IL2选择性激动剂部分的循环半衰期,而效应子功能不是需要的和可能甚至是毒性的,且因此明显是不希望的。例如,具有效应子功能性的Fc的IL2选择性激动剂-Fc融合蛋白可能潜在地杀死本发明的融合蛋白试图活化和扩增的Treg细胞,恰恰与用于自身免疫疾病的治疗目的相反。具有四种人IgG亚类,其在效应子功能(CDC、ADCC)、循环半衰期和稳定性方面不同(Salfeld, J.G.,2007,Nature Biotechnology 25:1369-72)。IgG1具有Fc效应子功能,是最丰富的IgG亚类,且是在US FDA批准的治疗蛋白质中最常使用的亚类。IgG2是缺乏Fc效应子功能的,但经历与其它IgG2分子的二聚化,且也发生由于铰链区中二硫键的混杂导致的不稳定性。IgG3具有Fc效应子功能,且具有极长的、刚性的铰链区。IgG4缺乏Fc效应子功能,具有比其它亚类更短的循环半衰期,且IgG4二聚体由于铰链区中唯一的单二硫键导致不同IgG4分子之间H链的交换而使得是生物化学不稳定的。本领域技术人员认识到,来自IgG2和IgG4的Fc蛋白部分不具有效应子功能且可以用于本发明中。技术人员也认识到,Fc序列修饰已在本领域中描述,其使得IgG2Fc的铰链区可以进行修饰以防止聚集或者IgG4Fc的铰链区可以进行修饰以使二聚体稳定化。或者,已经生成了效应子功能缺陷的IgG1变体。一种这样的变体具有位置N297(N-连接的糖基化位点的位置)处的氨基酸置换。这一天冬酰胺残基的置换移除糖基化位点并显著地降低ADCC和CDC活性(Tao,M.H.等人,1989,J Immunol.143:2595-2601)。这一变体在本文的本发明中用作示例性的情况。另一效应子功能缺陷的IgG1变体是IgG1(L234F/L235E/P331S/)(Oganesyanyan等人,2008,Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.64:700-4),其使C1q和Fc γ R结合位点中的氨基酸突变,且本领域技术人员会考虑使用这些或相似的Fc变体以产生效应子缺陷的和稳定的IL2SA-Fc融合蛋白。技术人员也认识到,经工程化以成为稳定的单体而非二聚体的Fc蛋白部分的形式(Dumont,J.A.等人,2006,BioDrugs 20:151-60;Liu Z等人,J Biol Chem.2015 20;290:7535-62)也可以与本发明的IL-2选择性激动剂组合。另外,技术人员会认识到,由与Fc H链多肽组合的IL-2-

Fc H链多肽组成且使用双特异性抗体技术组装的功能单体性的异二聚体(Zhu Z等人, 1997Protein Sci.6:781-8)也可以与本发明的IL-2选择性激动剂组合。一些IL-2Fc融合蛋白用完整IgG抗体分子制成,具有(Penichet,M.L.等人,1997,Hum Antibodies.8:106-18)或没有(Bell等人,2015,J Autoimmun.56:66-80)IgG部分中的抗原特异性。另外,技术人员会认识到,缺乏部分或全部铰链区的Fc变体可以用于本发明。

[0081] Fc融合蛋白可以以两种构型制备,此处表示为X-Fc和Fc-X(其中X(融合伴体蛋白)处于N-末端和Fc处于C-末端)及Fc-X(其中Fc处于N-末端,且融合伴体蛋白处于C-末端)(图2)。在文献中具有表明不同融合伴体可以具有对于N-或C-末端Fc融合的不同偏好的实例。例如,FGF21已经显示为具有对于Fc-X构型的强烈偏好。Fc-FGF21具有与FGF21本身基本上相同的受体活化的生物活性,而FGF21-Fc具有1000-倍降低的生物活性(Hecht等人,2012,PLoS One.7(11):e49345)。已经制备多种IL-2Fc融合蛋白用于各种应用,且这些已经报告为在以Fc-X(Gillies等人,1992,Proc Natl Acad Sci,89:1428-32;Bell等人,2015,J Autoimmun.56:66-80)和X-Fc(Zheng,X.X.等人,1999,J Immunol.163:4041-8)两种构型与Fc直接融合时具有良好的IL-2生物活性。Gavin等人(US 20140286898A1)描述了以Fc-X构型包含IL-2和某些IL-2变体的Fc融合蛋白,其具有与游离IL-2细胞因子相似的生物活性,但与发现X-Fc构型的IL-2变体融合蛋白具有降低的或没有生物活性的Zheng等的结果(Zheng,X.X.等人,1999,J Immunol.1999,163:4041-8)相反。因此,Gavin等人一般地给出与N-末端IL-2Fc融合蛋白相反的教导。影响融合蛋白构型的选择的另一因素是对循环半衰期的影响。文献中反复的发现是Fc-X构型的IL-2融合蛋白具有相对低的循环半衰期,远低于人IgG1在人中的21天半衰期或当前FDA批准的Fc融合蛋白的半衰期(表I)。Fc-X构型的IgG-IL2融合蛋白已经报告为在小鼠中具有小时量级(Gillies S.D.,2002Clin Cancer Res.,8:210-6;Gillies,S.D.,US 2007/0036752A2;Bell C.J.,2015J Autoimmun.56:66-80)及在人体中具有约3.3小时(Ribas A.,J 2009Transl Med.7:68)和3.7小时(King D.M.,2004J Clin Oncol.,22:4463-73)的相对短的循环半衰期,且Fc-IL2融合蛋白已经报告为在小鼠中具有12.5小时的循环半衰期(Zhu E.F.,Cancer Cell.2015,13;27(4):489-501)。Fc部分的C-末端和IL-2部分之间的蛋白水解造成短的循环半衰期(Gillies S.D.,2002Clin Cancer Res.,8:210-6;Zhu E.F.,2015Cancer Cell.27:489-501)。因为这些相对短的半衰期,我们聚焦于X-Fc构型的IL2选择性激动剂Fc融合蛋白。这一工作中的发现表明包含IgG1(N297A)置换的IL2-Fc融合蛋白具有高生物活性且是本发明的特别优选的种类。消除O-连接糖的IgG1Fc融合蛋白的变体也是特别优选的种类,因为它是高度生物活性的并提供对于制造纯的和均相的药物产物的优势。这一专利中的发现进一步表明,具有效应子功能缺陷的IgG1变体和IgG4Fc的IL2-Fc融合蛋白,尽管是略微低活性的,也是优选的种类。具有IgG2和血清白蛋白(HSA)的融合体具有较低的生物活性,且为较不优选的种类,虽然如果它们具有其它有利属性,它们可能适合于治疗用途。

[0082] 接头

[0083] Fc和融合伴体蛋白之间的接合区的氨基酸序列可以是(1)两个蛋白质序列的直接融合或(2)与插入接头肽的融合。目前被US FDA批准用于临床应用的10种Fc融合蛋白(表I)中,8种是融合伴体蛋白与Fc的直接融合,而2种具有接头肽,因此许多Fc融合蛋白在没有接头肽的情况下可能是功能性的。接头肽包括作为两个蛋白质部分之间的间隔物。接头肽可

以促进正确的蛋白质折叠和组成蛋白质部分的稳定性,改善蛋白质表达和实现组成蛋白质部分的更好生物活性(Chen等人,2013,Adv Drug Deliv Rev.65:1357-69)。许多融合蛋白中使用的肽接头设计为非结构化的柔性肽。天然蛋白质中的独立结构域之间接头肽的长度、序列和构型的研究已经提供了用于柔性肽接头的设计的理论基础(Argos,1990,J Mol Biol.211:943-58)。Argos提供了长的柔性接头肽由小的非极性残基如甘氨酸及小的极性残基如丝氨酸和苏氨酸组成的指导,其中多个甘氨酸残基使得能够实现高度柔性的构型且丝氨酸或苏氨酸提供极性表面以限制肽内或与组成融合蛋白部分的疏水性相互作用。文献中描述的许多肽接头富含甘氨酸和丝氨酸,如序列GGGGS的重复序列,虽然本领域技术人员认识到也可以使用遵循Argos的一般推荐的其它序列(Argos,1990,J Mol Biol.20;211(4):943-58)。例如,本文所述的蛋白质之一包含由甘氨酸和丙氨酸组成的接头肽(SEQ ID NO 15)。具有完全伸展的 β -链构象的柔性接头肽具有大约每残基 3.5 \AA 的端对端长度。因此,5、10、15、20、25或30个残基的接头肽分别具有 17.5 \AA 、 35 \AA 、 52.5 \AA 、 70 \AA 、 87.5 \AA 或 105 \AA 的最大完全伸展长度。肽接头的最大端对端长度也可以是用于限定本发明的肽接头的特征的指导。

[0084] 技术人员也将认识到,非肽柔性化学接头也可以替代具有以上所示长度的多肽接头,例如 17.5 \AA 、 35 \AA 、 52.5 \AA 、 70 \AA 、 87.5 \AA 或 105 \AA 。本发明内接头肽的目的是使得能够实现单个融合蛋白部分的适宜构象和定向以允许IL-2选择性激动剂部分与其同源受体的结合和允许Fc部分与FcRn的结合,从而实现融合蛋白再循环和延长的循环半衰期。许多Fc融合蛋白不需要接头肽,如通过表中I列出的缺乏这样的肽的10种US FDA批准的Fc融合蛋白中的8种证明的。相反,度拉糖肽,一种GLP-1和Fc的融合体,包含15残基的肽接头,其对生物活性具有强的影响(Glaesner,US专利7,452,966B2)。本领域中在IL-2-Fc融合蛋白上进行的先前工作表明接头肽不是生物活性必需的。Fc-X定向的包含wt IL-2或具有置换C125S的IL-2的IL-2融合蛋白已经报告为具有与游离IL-2细胞因子相似的IL-2生物活性,其不具有(Gillies等人,1992,Proc Natl Acad Sci,89:1428-32;Gavin等人,US专利申请20140286898A1)或具有(Bell等人,2015,J Autoimmun.56:66-80)肽接头。在X-Fc定向中,Zheng等报告了X-Fc构型的IL-2融合蛋白的IL-2生物活性,其与IL-2本身基本上不可区分(Zheng,X.X.等人,1999,J Immunol.1999,163:4041-8)。这一广泛的现有技术教导,IL-2蛋白与Fc的融合不需要接头肽以具有高IL-2生物活性。但是,Gavin等报告,包含具有改变的受体选择性的某些变体的X-Fc构型的Fc融合蛋白在没有肽接头或具有5残基肽接头的情况下具有降低的或没有生物活性(Gavin等人,US专利申请20140286898A1)。这一专利中报告的工作证明至少6个和优选至少9个氨基酸的肽接头对于在Treg上的稳定IL-2生物活性是必要的,且进一步显示出生物活性的改善在15个氨基酸时达到平台和对于长度达30个氨基酸的接头维持。

[0085] 生物测定

[0086] 稳健的和定量的生物测定对于候选蛋白质的生物活性的表征是必需的。这些测定应测量IL2受体的活化,测量Treg中活化的下游功能性后果,并测量活化的Treg的治疗相关的结果和功能。这些测定可用于测量IL2选择性激动剂分子的治疗活性和效力,并且还可用于测量动物或人类中IL2选择性激动剂的药效学。一种测定测量信号转导蛋白STAT5的磷酸

化,用对磷酸化蛋白 (pSTAT5) 特异性的抗体的流式细胞术测量。STAT5的磷酸化是IL-2信号转导途径中的必要步骤。STAT5对于Treg发育是必需的,并且在CD4+CD25+细胞中表达的组成型活化形式的STAT5足以在IL-2的不存在下产生Treg细胞 (Mahmud, S.A. 等人, 2013, JAKSTAT 2:e23154)。因此, Treg细胞中磷酸化的STAT5 (pSTAT5) 的测量被本领域技术人员公认为是这些细胞中IL-2活化的反映, 并且将预测在给定的适当暴露时间和条件下IL-2治疗的其他生物学后果。另一种用于功能性活化的测定测量IL-2刺激的Treg细胞增殖。本领域技术人员将认识到, Treg增殖可以通过以下测量: 氙化胸苷掺入纯化的Treg细胞中, 流式细胞术测量的混合细胞群体中Treg细胞数量的增加及CD4+CD25+FOXP3+或CD4+CD25+CD127-标志物表型的频率, Treg细胞中增殖相关细胞周期蛋白 (诸如Ki-67) 的增加的表达, 或Treg细胞中通过流式细胞术的活体荧光染料诸如羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 的细胞分裂相关稀释的测量。利用IL-2的Treg功能性活化的另一种测定是Treg的稳定的稳定性。pTreg细胞被一些人认为是不稳定的, 并且具有分化成Th1和Th17效应T细胞的潜能。Treg的IL-2活化可以稳定Treg并防止这种分化 (Chen, Q. 等人, 2011, J Immunol. 186:6329-37)。Treg的IL-2刺激的另一种后果是刺激Treg功能性效应物分子诸如CTLA4、GITR、LAG3、TIGIT、IL-10、CD39和CD73的水平, 其有助于Treg的免疫抑制活性。

[0087] 为开发IL2选择性激动剂Fc蛋白, 我们最初聚焦于X-Fc构型的蛋白质, 因为对于Fc-X构型的IL-2融合蛋白已经报告的短循环半衰期。产生和测试的前两种蛋白质, 一种具有接头肽和另一种不具有接头肽, 出人意料地显示具有肽接头的蛋白质具有IL-2生物活性和不具有肽接头的蛋白质不具有可检测的生物活性。两种蛋白质表现出对于IL2RA的高结合亲和力, 表明两种蛋白质正确地折叠。这些结果表明接头肽对于IL-2受体激活和生物活性是必要的。然后产生了一系列另外的类似物以消除其它变量并测试这一假设。来自这些研究的结果导致发现对于这一治疗性蛋白质的关键结构-活性关系且产生具有所需活性和药理学属性的新分子。

[0088] 以下表格提供了优选种类的列表。

[0089]

名称	接头	融合伴侣
N88RL10AG1	10 氨基酸	IgG1(N297A) Fc
N88RL15AG1	15 氨基酸	IgG1(N297A) Fc
N88RL20AG1	20 氨基酸	IgG1(N297A) Fc
N88RL25AG1	25 氨基酸	IgG1(N297A) Fc
N88RL30AG1	30 氨基酸	IgG1(N297A) Fc
N88RL15G1ED	15 氨基酸	IgG1(E233P/L234A/L235A/G236del)
N88RL15G2	15 氨基酸	IgG2 Fc
N88RL15G4(S228P)	15 氨基酸	IgG4 Fc
N88RT3AL15AG1	15 氨基酸	IgG1(N297A) Fc
N88RL15HSA	15 氨基酸	HSA (C-末端)
HSAL15N88R	15 氨基酸	HSA (N-末端)

[0090]

N88GL15AG1	15 氨基酸	IgG1(N297A) Fc
D20HL15AG1	15 氨基酸	IgG1(N297A) Fc
Q126LL15AG1	15 氨基酸	IgG1(N297A) Fc
Q126FL15AG1	15 氨基酸	IgG1(N297A) Fc

[0091] 制剂

[0092] 本发明的融合蛋白的药物组合物被定义为根据常规方法配制用于胃肠外(特别是静脉内或皮下)递送。通常,药物制剂将包括与药学上可接受的溶媒诸如盐水、缓冲盐水、5%葡萄糖水溶液等组合的本发明的融合蛋白。制剂可以还包括一种或多种赋形剂、防腐剂、增溶剂、缓冲剂、防止小瓶表面上的蛋白质损失的白蛋白等。配制方法是本领域公知的并且公开于例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Gennaro,ed., Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,19th ed.,1995中。

[0093] 作为示例说明,药物制剂可以作为试剂盒提供,所述试剂盒包括含有本发明的融合蛋白的容器。治疗性蛋白可以以用于单次或多次剂量的可注射溶液的形式、作为在注射前重构的无菌粉末或作为预填充注射器提供。这样的试剂盒还可包括关于药物组合物的适应症和用法的书面信息。此外,这样的信息可以包括本发明的融合蛋白在具有已知对本发明的融合蛋白的过敏性的患者中禁忌的陈述。

[0094] 本发明的IL-2选择性激动剂融合蛋白可以掺入组合物,包括药物组合物中。这样的组合物通常包括所述蛋白质和药学上可接受的载体。如本文所用的,术语“药学上可接受的载体”包括但不限于与药物施用相容的盐水、溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。补充的活性化合物(例如,抗生素)也可掺入组合物中。

[0095] 将药物组合物配制成与其预期的施用途径相容。本发明的IL-2选择性激动剂融合蛋白可能通过胃肠外途径施用。肠胃外施用途径的实例包括例如静脉内、皮内和皮下。用于肠胃外施用的溶液或悬浮液可包括以下组分:无菌稀释剂如注射用水、盐水溶液、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗细菌剂如苯醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或硫酸氢钠;螯合剂诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和用于调节张力的试剂如氯化钠或葡萄糖。可以用酸或碱诸如磷酸二氢钠和/或磷酸氢二钠、盐酸或氢氧化钠调节pH(例如,至约7.2-7.8的pH,例如7.5)。胃肠外制剂可以包封在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0096] 适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌的可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物应当是无菌的,并且应当是流动的而达到存在易注射性的程度。它在制造和储存条件下应该是稳定的,并且必须防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。在分散体的情况下,可以通过使用表面活性剂,例如聚山梨醇酯或吐温,来促进所需粒径的保持。通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等,可以实现防止微生物的作用。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇、氯化钠。

[0097] 无菌可注射溶液可通过以下来制备：将所需量的活性化合物根据需要与上述成分中的一种或组合一起掺入合适的溶剂中，然后过滤除菌。通常，通过将活性化合物掺入无菌溶媒中制备分散体，所述无菌溶媒包含基础分散介质和来自上面列举的那些的所需其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥，其从先前活性成分加上任何另外的所需成分的无菌过滤溶液的产生其粉末。

[0098] 在一个实施方案中，IL-2选择性激动剂融合蛋白用保护IL-2选择性激动剂融合蛋白免于从体内快速消除的载体制备，例如控释制剂，包括植入物和微囊化递送系统。可以使用生物可降解的生物相容性聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。这样的制剂可使用标准技术制备。

[0099] 药物组合物可以与施用说明书一起包括在容器、包装或分配器中。

[0100] 施用

[0101] 本发明的融合蛋白将优选地通过胃肠外途径施用。皮下途径是优选的途径，但是也可使用静脉内、肌内和皮下施用。对于皮下或肌内途径，可以使用贮库 (depot) 和贮库制剂。对于某些疾病，可使用专门的施用途径。例如，对于炎性眼病，可使用眼内注射。融合蛋白可以以约0.1至10mcg/ml总体积的浓度使用，尽管可使用0.01mcg/ml至100mcg/ml范围内的浓度。

[0102] 剂量的确定在本领域普通技术人员的水平内。在治疗期间每天或每周给药，或者可以另一间歇性频率给药。静脉内施用将通过快速浓注或经一至数小时的典型时间段输注。也可使用缓释制剂。通常，本发明的融合蛋白的治疗有效量是足以在治疗的病症中产生临床显著改变的量，所述临床显著改变诸如循环Treg细胞的临床显著改变、存在于患病组织内的Treg细胞的临床显著改变或疾病症状的临床显著改变。

[0103] 从细胞培养分析和动物研究获得的数据可用于配制用于在人体中使用的剂量范围。这类化合物的剂量优选在具有很少或没有毒性的循环浓度范围内，包括半最大有效浓度 (EC50；即实现Treg细胞半数最大刺激的测试化合物的浓度)。剂量可根据所使用的剂型和利用的施用途径而在该范围内变化。对于本发明方法中使用的任何化合物，治疗有效剂量可最初从细胞培养分析估计。剂量可在动物模型中配制以实现包括如在细胞培养中确定的EC50的循环血浆浓度范围。此类信息可用来更精确地确定在人类中的有用的剂量。可例如通过酶联免疫吸附测定法测量血浆中的水平。

[0104] 如本文定义的，IL-2选择性激动剂融合蛋白的治疗有效量 (即，有效剂量) 取决于所选择的多肽和给药频率。例如，可施用在大约0.001至0.1mg/kg患者体重范围内的单剂量的量；在一些实施方案中，可施用约0.005、0.01、0.05mg/kg。组合物可每天一次至每周一次或多次、或每月一次或多次施用；包括每隔一天一次。本领域技术人员将理解，某些因素可影响有效治疗受试者所需的剂量和时机，包括但不限于疾病或紊乱的严重性、先前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄、存在于患者中的Treg细胞的水平及存在的其它疾病。此外，用治疗有效量的本发明的IL-2选择性激动剂融合蛋白治疗受试者很可能是一系列治疗。

[0105] 自身免疫疾病

[0106] 已经注意到可从本发明的治疗受益的一些疾病。然而，Treg细胞在自身免疫疾病中的作用是非常活跃的研究领域，并且另外的疾病将可能被鉴定为可通过本发明治疗。自

身免疫疾病定义为其中免疫系统攻击其自身蛋白质、细胞和组织的人类疾病。自身免疫疾病的综合列表和综述可以在The Autoimmune Diseases (Rose和Mackay, 2014, Academic Press) 中找到。存在着从Treg增强受益的证据的疾病包括移植物抗宿主病、寻常天疱疮、系统性红斑狼疮、硬皮病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、银屑病、1型糖尿病、多发性硬化、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、斑秃、葡萄膜炎、视神经脊髓炎和杜氏肌萎缩症。

[0107] 其它融合蛋白

[0108] 因为本发明中Fc蛋白部分的目的仅仅是增加循环半衰期,本领域技术人员使用本发明中发现的结构-活性关系将认识到,IL-2选择性激动剂部分可以与其它蛋白质的N-末端融合以实现增大分子大小和降低肾清除率的相同目的。IL2选择性激动剂可以与血清白蛋白的N-末端融合(Sleep, D.等人, 2013, Biochim Biophys Acta. 1830:5526-34),这相对于IL-2部分增大融合蛋白的液体动力学半径且也通过FcRN再循环。技术人员也会认识到,本发明的IL2选择性激动剂部分也可以与重组非免疫原性氨基酸多肽的N-末端融合。开发用于这一目的的非免疫原性氨基酸多肽的两个实例是XTEN聚合物, A、E、G、P、S和T氨基酸的链(Schellenberger, V.等人, 2009, Nat Biotechnol. 27:1186-90), 及PAS聚合物, P、A和S氨基酸残基的链(Schlapschy, M.等人, 2007, Protein Eng Des Sel. 20:273-84)。

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

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

[0111] 实施例

[0112] 以下实施例仅通过举例说明的方式而绝非通过限制的方式来提供。本领域技术人员将容易地认识到,多种非关键参数可被改变或修改以产生基本相似的结果。

[0113] 实施例1. IL-2选择性激动剂-IgG Fc融合蛋白的克隆、表达和纯化

[0114] 编码N88RL9AG1 (SEQ ID NO:4)的cDNA通过DNA合成和PCR组装构建。N88RL9AG1构建体由小鼠IgG1信号序列、具有置换N88R和C125S的成熟人IL-2 (SEQ ID NO:1)序列、9氨基酸接头肽序列 (SEQ ID NO:15)和包含置换N297A的人IgG1的Fc区 (SEQ ID NO:2)构成。N88R/IL2是具有降低的与IL2RB的结合和在IL2R $\alpha\beta\gamma$ 受体-表达细胞上的选择性激动剂活性的IL2选择性激动剂 (Shanafelt, A.B.等人, 2000, Nat Biotechnol. 18:1197-202)。IgG1Fc上N297处N-连接糖基化位点的消除降低Fc效应子功能 (Tao, M.H.等人, 1989, J Immunol. 143:2595-2601)。D20HLOG2由小鼠IgG1信号序列、具有置换D20H和C125S的IL-2 (SEQ ID NO:1)及源自人IgG2的Fc蛋白部分 (SEQ ID NO:3)构成。D20H IL-2变体已经报告为具有与N88R相似的选择性激动剂活性 (Cassell, D.J.等人, 2002, Curr Pharm Des., 8:2171-83)。

[0115] 这些cDNA使用限制性位点HindIII和NotI克隆到pcDNA3.1 (+) (Life Technologies, Carlsbad, CA)中。含有该构建体的纯化的表达载体质粒瞬时转染到HEK293细胞中。HEK293细胞在转染前24小时接种到摇瓶中,并使用无血清化学限定培养基生长。DNA表达构建体瞬时转染到0.1升的悬浮HEK293细胞中。24小时后,细胞计数以获得存活力和活细胞计数。在第5天收获培养物,且条件化培养基上清液通过以3000X g离心15分钟澄

清。蛋白质通过在蛋白A柱(GE Healthcare)上运行上清液、用0.25%乙酸(pH 3.5)洗脱,用1M Tris(pH8.0)中和洗脱的蛋白质和针对30mM HEPES,pH 7,150mM NaCl透析进行纯化。样品然后通过0.2 μ m膜式过滤器无菌过滤并在还原性和非还原性条件下通过SDS PAGE进行分析。蛋白质作为二硫键连接的二聚体迁移。蛋白质浓度使用计算的1.11mg/ml cm^{-1} 的消光系数通过吸光度测定,且等分样品在-80C下储存。

[0116] 细胞因子N88R/IL2和D20H/IL2是SEQ ID NO 1的变体并基本上如US专利6,955,807B1中所述在大肠杆菌中产生,除了为了提高的稳定性而添加额外的突变C125S。

[0117] 实施例2.N88RL9AG1和D20HLOG2的受体结合活性的测定。

[0118] 为确定N88RL9AG1和D20HLOG2是否正确地折叠,使用Biacore T-200仪器(GE Healthcare)通过表面等离子体共振(SPR)测定其对IL-受体亚基IL2RA和IL2RB的亲合力。IL2RA和IL2RB细胞外结构域蛋白及IL-2蛋白(R&D Systems,Minneapolis,MN)通过NHS/EDC偶联固定在CM-5Biacore芯片上分别达到30和484的最终RU(共振单位)值。与IL2RA的结合动力学以50 μ l/分钟的流速在0.6nM-45nM范围的五个IL2和N88RL9AG1浓度下测量。与IL2RB的结合动力学以10 μ l/分钟的流速对于IL2在16.7nM-450nM范围和对于Fc融合蛋白在14nM-372nM范围的五个浓度下测量。解离常数(Kd)使用Biacore评估软件2.0版从动力学常数计算,假定对于IL-2为1:1拟合及对于N88RL9AG1和D20HLOG2为二价拟合。平衡Kd值使用稳态结合值通过Biacore评估软件计算。

[0119] 与IL2RA的结合针对IL-2和N88RL9AG1两者进行检测。对于N88RL9AG1的Rmax值(14.43)比IL2的Rmax值(2.62)高5.5倍,这与N88RL9AG1(82,916g/M)具有比IL-2(15,444g/M)更高的分子量的事实一致。IL-2的kon、koff和Kd值在从公布的SPR值预测的范围内(表II)。N88RL9AG1的亲合力比IL2的亲合力高大约2-倍,如通过动力学和平衡方法两者测定的。IL2与IL2RB的结合检测为具有6.19的Rmax。对于kon、koff和Kd测定的值在文献中报告的范围内。报告的值是 3.1×10^{-8} M(IL2RA)和 5.0×10^{-7} M(IL2RB)(Myszka,D.G.等人,1996,Protein Sci.5:2468-78); 5.4×10^{-8} M(IL2RA)和 4.5×10^{-7} (IL2RB)(Shanafelt,A.B.等人,2000,Nat Biotechnol.18:1197-202);及 6.6×10^{-9} M(IL2RA)和 2.8×10^{-7} M(IL2RB)(Ring,A.M.等人,2012,Nat Immunol.13:1187-95)。基本上没有检测到N88RL9AG1与IL2RB的结合,在测试的最高浓度下检测到轻微结合(Rmax=0.06),远低于基于IL2和N88RL9AG1之间的分子量差异和基于IL2RA结合结果预期的结合。D20HLOG2蛋白也测试与IL2RA的结合,且发现具有 8.3×10^{-9} M的Kd,与N88RL9AG1的Kd类似。因此,SPR结合研究表明N88RL9AG1和D20HLOG2蛋白两者都结合IL2RA,表明蛋白质正确地折叠。

[0120] 实施例3.T细胞上N88RL9AG1和D20HLOG2的生物活性。

[0121] N88RL9AG1和D20HLOG2在T细胞上的生物活性通过测量特定T细胞亚群中的磷酸化STAT5(pSTAT5)水平测定。pSTAT5的水平使用针对磷酸化STAT5肽的抗体在固定和渗透的细胞中通过流式细胞术测量。Treg细胞组成型地表达CD25,且处于前1%的CD25表达水平中的细胞是Treg细胞高度富集的(Jailwala,P.等人,2009,PLoS One.2009;4:e6527;Long,S.A.等人,2010,Diabetes 59:407-15)。因此,流式细胞术数据分别分选成对于Treg和CD4效应T细胞亚群的CD25^高(前1-2%的CD25表达细胞)和CD25^低组。

[0122] 冷冻保存的CD4+T细胞(Astarte Biologics,Seattle,WA)解冻,在包含1%人AB血清(Mediatech,Manassas,VA)的X-VIVO 15(Lonza,Allendale,NJ)培养基中洗涤,并允许在

37C下回收2小时。细胞然后在0.1ml中以 5×10^6 细胞/ml的浓度分布到15x75mm管中。细胞在37C下用变化浓度的IL-2或Fc融合蛋白处理10分钟。细胞然后在37C下用Cytotfix固定缓冲液固定10分钟,在冰上用Perm Buffer III (BD Biosciences, Santa Clara, CA) 渗透30分钟,和然后洗涤。细胞然后在20C下用抗-CD4-Pacific Blue (BD Biosciences, Santa Clara, CA)、抗-CD25-AF488 (eBioscience, San Diego, CA) 和抗-pSTAT5-AF547 (BD Biosciences) 抗体的混合物以制造商推荐的浓度染色30分钟,洗涤,且流式细胞术数据在LSRII仪 (BD Biosciences) 上获取。数据使用Flowjo分析软件 (Flowjo, Ashland, OR) 进行分析。

[0123] 这一分析中N88RL9AG1的结果表明,与IL-2相比,N88RL9AG1对于Treg群体具有明显的选择性(图3A)。N88RL9AG1激活少于1%的CD4+细胞,对于CD25^高细胞具有非常强的选择性。相反,IL-2在40nM的浓度下激活超过80%的CD4+T细胞,其中高比例的pSTAT5+细胞表达低水平的或不表达CD25。甚至在4pM(测试的最低浓度)下,IL-2在CD25^低细胞和CD25^高细胞两者中仍然刺激显著的pSTAT5水平。

[0124] D20HLOG2然后测试在CD4+T细胞pSTAT5分析中的活性。出人意料地,D20HLOG2在这一分析中没有活性(图3B)。使用 10^{-8} M D20H/IL2细胞因子(未与Fc融合的变体IL-2细胞因子)的另外的对照显示CD25^高细胞的稳定的和选择性的pSTAT5活化(图3C)。考虑到D20HLOG2与IL-2和N88RL9AG1类似的Kd结合IL2RA(从而表明它是正确折叠的),D20HLOG2的活性缺乏是特别令人惊讶的。

[0125] 为确认通过N88RL9AG1选择性地活化的CD25^高细胞是Treg,活化的细胞对于pSTAT5和FOXP3 (Treg细胞的另一分子标志物) 共染色。CD4+细胞用4nM IL-2或N88RL9AG1处理,固定,和如以上对于pSTAT5染色所述渗透化,且然后在室温下用1ml FOXP3Perm Buffer (BioLegend, San Diego, CA) 处理30min,和然后洗涤和重悬在FOXP3Perm Buffer中。渗透化的细胞在20C下用抗-FOXP3-eFluor450、抗-CD25-AF488 (eBioscience, San Diego, CA) 和抗-pSTAT5-AF547 (BD Biosciences) 抗体的混合物染色30分钟,洗涤,并通过流式细胞术分析。这一实验的结果表明高比例的具有活化STAT5的N88RL9AG1-处理的细胞(pSTAT5+细胞)也表达高水平的FOXP3。这一结果提供了活化的细胞是Treg细胞高度富集的进一步证据。相反,IL-2处理的pSTAT5+细胞是FOXP3+和FOXP3-两者,大多数是FOXP3-细胞。

[0126] 实施例4. 对于生物活性重要的结构-活性关系的确定。

[0127] 实施例3中描述的出人意料的结果表明,用N88RL9AG1而非D20HLOG2检测的IL2生物活性是由于接头肽的存在。为验证这一发现和消除其它变量(如Fc部分的同种型和IL-2部分中的选择性突变)的影响,设计和产生了一组类似物(全部使用IgG1N297A Fc)(表III)。

[0128] 构建cDNA且蛋白质如实施例1中所述表达和纯化,除了Fc的C-末端赖氨酸残基在所有构建体中检测到且生产细胞培养物在30ml而非100ml的体积中。所有蛋白质以良好的产率回收。事实上,N88R/IL2系列分子的产量的比较表明蛋白质产量随着增大的肽接头长度增加的明显趋势,其中N88RL20AG1(具有最长肽接头)回收率比N88RLOAG1(没有肽接头)高6.8倍(图5A)。含接头肽的蛋白质的提高的产量的基础还不清楚,但可能是由于提高的表达水平、提高的分泌速率、提高的蛋白质稳定性或提高的纯化效率。有趣的是,WTL15AG1的产量仅少量地(1.8倍)高于WTL0AG1,这与N88RL15AG1相比于N88RLOAG1的4.5倍高的产量形

成对比。D20HL15AG1产量类似于N88RL15AG1产量,表明IL-2选择性突变对产量没有显著影响,且这两种蛋白质具有比AG1L15D20H显著更高的产量(分别4.3倍和3.4倍)(图5B)。总的说来,这些结果表明增加的肽接头长度与包含N88R/IL2的Fc融合蛋白的较高蛋白质产量相关,包含wt IL-2的Fc融合蛋白的产量对于接头肽的存在的敏感性低得多,且产生X-Fc构型的IL-2-Fc融合蛋白。

[0129] 这些纯化的蛋白质在基本上如实施例3中描述的人T细胞pSTAT5生物测定中测试,除了使用人CD3+T细胞(负向选择的)代替CD4+细胞,且细胞用测试蛋白孵育20min而非10min。

[0130] 来自N88R/IL2系列分子的结果证明,Treg-富集群体中的生物活性受到肽接头长度的显著影响(图6A)。Treg群体中的pSTAT5信号(%pSTAT5+细胞)随着增加的肽接头长度逐步地增大。这种增加的生物活性在 10^{-8} M测试蛋白质下的最大pSTAT5信号中和通过EC50值两者反映(表IV)。N88RL20AG1,具有最长肽接头的蛋白质,显示高于N88RL0AG1的最大pSTAT5信号的4.2倍提高。因为N88RL0AG1pSTAT5信号在其最高浓度(10^{-8} M)下未达到50%的IL-2活化,不可能确定包含接头肽的蛋白质的EC50相对于N88RL0AG1的倍数提高。但是,基于N88RL20AG1EC50和测试的N88RL0AG1的最高浓度,可以估计的是N88RL20AG1与N88RL0AG1相比表现出>100倍低的EC50。

[0131] 如预期的,在CD25^{-低}群体上,基本上没有任何N88R/IL2分子的可检测活性,而 10^{-8} M IL-2在54.2%的CD25^{-低}细胞中刺激pSTAT5活性(图6B)。

[0132] WTL0AG1与WTL15AG1的比较证明接头肽对于wt IL-2-Fc融合蛋白具有比N88R/IL2-Fc融合蛋白低得多的显著影响(图7)。在Treg亚群中,WTL0AG1和WTL15AG1两者具有显著的生物活性,且事实上刺激比IL-2高大约2-倍的最高pSTAT5磷酸化水平。但是,WTL0AG1和WTL15AG1也在CD25^{-低}细胞中以大约10倍高的浓度刺激大的pSTAT5信号。WTL15AG1和WTL0AG1在Treg和CD25^{-低}细胞群体两者中表现出EC50值的大约10倍的差异。

[0133] Treg中D20HL15AG1的最大pSTAT5信号显著低于N88RL15AG1(图8)。这表明实施例3中使用D20HL0G2的任何可检测活性的缺乏部分地是由于Fc融合蛋白的背景中D20H/IL2部分与N88R/IL2部分相比的较低活性。AG1L15D20H的活性略高于D20HL15AG1,表明Fc融合蛋白中IL-2部分的构型(即,X-Fc vs Fc-X)对于Treg生物活性没有重大影响。

[0134] 总的说来,这些结果限定了最佳生物活性必要的N88R/IL2-Fc融合蛋白的关键特征。N88R/IL2-Fc蛋白为了最佳Treg生物活性需要接头肽,具有生物活性随增加的接头肽长度提高的趋势。第二,与其它人的工作一致,接头肽对包含wt IL-2的Fc融合蛋白的生物活性具有更轻度的影响。对于接头肽的这些不同要求可能是N88R/IL2缺乏与IL2RB的结合的事实的结果,其可能导致对于受体结合的更严格的要求和提高对Fc融合蛋白伴体导致的立体位阻的敏感性。这些结果也限定最有效的IL2选择性激动剂-Fc融合蛋白。

[0135] 实施例5. IL2选择性激动剂-Fc融合蛋白在人PBMC中的选择性

[0136] 为了确定N88R/IL2-Fc融合蛋白在更广泛的生物学背景中的选择性,开发了测量粗制的未分级人类PBMC中所有关键免疫细胞类型的STAT5活化的分析法。通过Ficoll-Hypaque离心从正常志愿者分离人PBMC。将 10^6 个PBMC悬浮在具有葡萄糖(Lonza)和10%FBS(Omega)的X-VIVO15培养基中,并在37°C下用 10^{-8} M测试蛋白质处理20分钟。然后根据制造商的说明用Foxp3/转录因子染色缓冲液组(EBIO)处理细胞。然后如实施例3中所述用Cytotfix

缓冲液固定细胞并用Perm缓冲液III渗透化。然后将固定的和渗透化的细胞用1%FBS/PBS洗涤,并在室温下在黑暗中用抗体混合物染色60分钟。然后将染色的细胞在1%FBS/PBS中洗涤,重悬于PBS中,并在Fortessa流式细胞仪(BD Biosciences)上分析。抗体混合物由以下组成:抗CD4-PerCP-Cy5.5 (BD, #560650)、抗pSTAT5-AF-488 (BD, #612598)、抗CD25-PE (BD, #560989)、抗CD56-PE-CF594 (BD, #562328)、抗FOXP3-AF647 (BD, #560889)、抗CD3-V450 (BD, 560366)和抗CD8-BV650 (Biolegend, #301041)。这种染色程序使得能够监测7种关键免疫细胞类型中的pSTAT5水平。

[0137] 细胞表型定义如下:Treg细胞:CD3⁺、CD4⁺、Foxp3⁺、CD25^高、CD8⁻、CD56⁻;活化的CD4Teff细胞:CD3⁺、CD4⁺、Foxp3⁻、CD25^高、CD8⁻、CD56⁻;CD4Teff细胞:CD3⁺、CD4⁺、Foxp3⁻、CD25^低、CD8⁻、CD56⁻;NKT细胞:CD3⁺、CD4⁻、Foxp3⁻、CD25^低、CD8⁻、CD56⁺;NK细胞:CD3⁻、CD4⁻、Foxp3⁻、CD25^低、CD8⁻、CD56⁺;B细胞:CD3⁻、CD4⁻、Foxp3⁻、CD25^低、CD8⁻、CD56⁻。

[0138] 蛋白质在这一分析中以 10^{-8} M的浓度测试。图9中显示和表V中总结的结果证明N88RL15AG1与wt IL2和WTL15AG1(这两者都活化所有细胞群体的大部分中的pSTAT5)相比表现出明显的选择性。N88RL15AG1以接近于wt IL-2的水平刺激Treg群体中的pSTAT5信号,具有除NK细胞外的其它细胞类型的不显著活化。另外的分析(未显示)证明pSTAT5+NK细胞是CD25^高,其是NK-CD56^亮细胞(也具有免疫调节活性的NK细胞亚群)的特征(Poli, A等人, 2009 Immunology. 126 (4):458-65)。对于N88R/IL2具有低水平pSTAT5信号的几种细胞类型(活化的CD4Teff细胞、CD4Teff细胞、NK T细胞和NK细胞)表现出对于N88RL15AG1没有或具有较低pSTAT5信号。这些结果显示在复杂的生物学环境中N88RL15AG1对于Tregs的活性和高选择性。

[0139] 实施例6.对于生物活性重要的另外结构-功能关系的探究。

[0140] 实施例5中给出的结果表明N88R/IL-2-Fc融合蛋白的稳定生物活性对于长度6-20个氨基酸的接头肽的强烈需求,其中增加的接头肽长度与增加的生物活性相关。为确定是否甚至更长的接头肽促进增加的生物活性,具有25-30个氨基酸的肽接头长度的另外的蛋白质构建体如实施例1中所述制备,并与N88RL15AG1和N88RL20AG1的独立制剂一起如实施例3中所述在T细胞pSTAT5生物活性分析中测试。这一实验的结果显示,增加肽接头至25(N88RL25AG1)或30(N88RL30AG1)个氨基酸与具有20个氨基酸接头的蛋白质相比在CD25hi细胞上不导致更高的生物活性(表VII)。这些结果与实施例4中给出的结果一起表明肽接头在15-20个氨基酸的长度下促进IL-2生物活性平台的能力且较长的接头肽不进一步促进生物活性的增加。

[0141] 评价了可以增加循环半衰期和缺乏Fc效应子功能的可选Fc融合伴侣。具有突变E233P/L234A/L235A/G236del的IgG1Fc (SEQ ID NO.22)、IgG2Fc (SEQ ID NO.23)和具有稳定Fc二聚体的铰链区突变S228P的IgG4Fc (SEQ ID NO.24)类似地制备和测试。此外,制备和测试了其中IL2/N88R与人白蛋白融合(融合于人白蛋白的N-末端(N88RL15HSA, SEQ ID NO.25)或C-末端(HSAL15N88R, SEQ ID NO.26))的融合蛋白。虽然所有蛋白质在CD25hi细胞上是生物活性的,但这些融合蛋白中没有一种表现出高于对于N88RL15AG1观察到的生物活性(表VIII)。

[0142] 不同IL-2选择性突变的作用在IgG1N297A Fc融合体的骨架上检验(表IX)。具有选择性突变N88G和Q126F的蛋白质在 10^{-8} M(测试的最高浓度)下在CD25hi细胞上具有与N88R相

比较低的生物活性,而在CD25⁻/低细胞上没有表现出生物活性(数据未显示)。具有置换N88I的蛋白质在任一细胞类型上没有活性。这可能表明对于这一变体的选择性激动剂活性的原始报告是错误的,或者可选地这可能表明它在Fc融合蛋白的情况中不是活性的。具有置换Q126L的蛋白质具有比N88R更高的生物活性,如通过在CD25^{hi}细胞上最高测试浓度下更大的pSTAT5反应所反映的,虽然这伴随 10^{-8} M下表达CD25⁻/低的细胞活化中的适度增加(数据未显示)。这些结果表明Q126L/IL2是更强大的选择性激动剂,在CD25^{hi}和CD25⁻/低细胞两者上具有较高生物活性。

[0143] 最后,消除IL2/N88R部分的苏氨酸3处的O-连接糖基化位点的影响通过制备变体N88RT3AL15AG1来评价。IL-2中的O-连接糖基化位点不是生物活性需要的(Robb, R. J. 等人, 1984, Proc Natl Acad Sci U S A. 81:6486-90),且消除这一糖基化位点应当导致完全去糖基化的蛋白质,其具有较少的翻译后修饰,从而造成产物异质性。制备和测试了变体N88RT3AL15AG1,并显示为在CD25^{hi}细胞中具有类似于N88RL15AG1的生物活性(表IX)。

[0144] 表格

[0145] 表I. US FDA-批准的Fc融合蛋白及其特征

[0146] 表I

[0147]

药物	Fc 同种 型	融合伴侣	N vs C 融合	接头肽	半衰期 (天)
罗米司亭	G1	TPO-R 肽	C	Y	3.5
依那西普	G1	P75 TNFa-R	N	N	4.3
阿法西普	G1	LFA3	N	N	10.1
利纳西普	G1	IL1-R	N	N	8.6
阿巴西普	G1	CTLA4	N	N	16.7
贝拉西普	G1	CTLA4 (mut)	N	N	9.8
阿柏西普	G1	VEGF R1 + R2	N	N	n/a
度拉糖肽	G4 (mut)	GLP1	N	Y	3.7
Eloctate	G1	FVIII	N	N	0.8
Alprolix	G1	FIX	N	N	3.6

[0148] 表II. IL-2Fc融合蛋白对于IL2RA和IL2RB亚基的亲和力

[0149] 表II

[0150]

配体	分析物	方法	k_{on}	k_{off}	K_d (M)
IL2RA	IL-2	动力学	5.85×10^6	8.4×10^{-2}	1.44×10^{-8}
	N88RL9AG	动力学	1.78×10^6	1.0×10^{-2}	5.63×10^{-9}
	1				
	D20HL0G2	动力学	1.66×10^7	0.137	8.30×10^{-9}
	IL-2	平衡	-	-	1.47×10^{-8}
N88RL9AG	平衡	-	-	9.36×10^{-9}	
1					

[0151]

IL2RB	IL-2	动力学	5.10×10^5	3.0×10^{-1}	5.87×10^{-7}
	N88RL9AG	动力学	nd	nd	-
	1				
	IL-2	平衡	-	-	2.53×10^{-7}
	N88RL9AG	平衡	-	-	7.60×10^{-2}
1					

[0152] nd:结合未检测

[0153] 表III

	蛋白质	IL2	肽接头	构型	SEQ ID #
	N88RL0AG1	N88R	0	X-Fc	6
	N88RL5AG1	N88R	5	X-Fc	7
	N88RL10AG1	N88R	10	X-Fc	8
	N88RL15AG1	N88R	15	X-Fc	9
[0154]	N88RL20AG1	N88R	20	X-Fc	10
	WTL0AG1	wt	0	X-Fc	11
	WTL15AG1	wt	15	X-Fc	12
	D20HL15AG1	D20H	15	X-Fc	13
	AG1L15D20H	D20H	15	Fc-X	14

[0155] 表IV

[0156]

蛋白质	EC50	10 ⁻⁸ M 下的最大 pSTAT5 反应	最大 pSTAT5 反应的倍数变化
N88RL0AG1	>10 ⁻⁸	0.33	1.0
N88RL5AG1	>10 ⁻⁸	0.52	1.6
N88RL9AG1	7 X 10 ⁻¹⁰	0.96	2.9
[0157]			
N88RL10AG1	9 X 10 ⁻¹⁰	0.90	2.7
N88RL15AG1	4 X 10 ⁻¹⁰	1.22	3.7
N88RL20AG1	1 X 10 ⁻¹⁰	1.40	4.2

[0158] 表V

[0159]

	对照	IL-2	WTL15A G1	N88R/IL2	N88RL15A G1
Treg 细胞	0.8	99.9	99.8	99.9	75.1
活化的 CD4 Teff 细胞	0.1	70.5	65.2	3.7	0.1
CD4 Teff 细胞	0.2	60.9	40.0	2.4	0.5
CD8 Teff 细胞	0.1	90.2	35.4	2.3	0.1
NKT 细胞	0.5	74.9	60.5	20.5	5.2
NK 细胞	0.3	96.8	96.1	49.9	19.3
B 细胞	0.1	20.9	10.6	0.2	0.1

[0160] 人PBMC的7种免疫细胞中pSTAT5+细胞的百分比。细胞用栏标题中所示的蛋白质处理并如实施例6中所述进行分析。

[0161] 表VI

[0162]

蛋白质	IL2	肽接头(aa)	融合伴侣	SEQ ID #
N88RL25AG1	N88R	0	IgG1 Fc N297A	20
N88RL30AG1	N88R	5	IgG1 Fc N297A	21
N88RL15G1ED	N88R	10	IgG1 Fc	22
N88RL15G2	N88R	15	IgG2 Fc	23
N88RL15G4(S228P)	N88R	20	IgG4 Fc	24
N88RL15HSA	wt	0	HSA	25
HSAL15N88R	wt	15	HSA	26
N88IL15AG1	N88I	15	IgG1 Fc N297A	27
N88GL15AG1	N88G	15	IgG1 Fc N297A	28

[0163]

Q126FL15AG1	Q126F	15	IgG1 Fc N297A	29
Q126LL15AG1	Q126L	15	IgG1 Fc N297A	30
N88RT3AK15AG1	N88R, T3A	15	IgG1 Fc N297A	31

[0164] 表VII

[0165]

蛋白质	EC50	10 ⁻⁸ M 下的最大 pSTAT5 反应(% pSTAT5+细胞)	10 ⁻⁸ M 下的 pSTAT5 反应(wt IL-2 反应的%)
N88RL15AG1	13.0 X 10 ⁻¹⁰	1.12	73
N88RL20AG1	9.5 X 10 ⁻¹⁰	1.18	77
N88RL25AG1	29.7 X 10 ⁻¹⁰	1.10	71
N88RL30AG1	8.5 X 10 ⁻¹⁰	1.18	77

[0166] 表VIII

[0167]

蛋白质	EC50	10 ⁻⁸ M 下的最大 pSTAT5 反应(% pSTAT5+细胞)	10 ⁻⁸ M 下的 pSTAT5 反应(wt IL-2 反应的%)
N88RL15G1ED	5.2 X 10 ⁻⁹	0.90	58
N88RL15G2	-	0.71	46
N88RL15G4(S228P)	6.9 X 10 ⁻⁹	0.77	50
N88RL15HSA	-	0.32	21
HSAL15N88R	-	0.68	44

[0168] 表IX

[0169]

蛋白质	EC50	10 ⁻⁸ M 下的最大 pSTAT5 反应(% pSTAT5+细胞)	10 ⁻⁸ M 下的 pSTAT5 反应(wt IL-2 反应的%)
N88IL15AG1	-	0.00	0
N88GL15AG1	8.1 X 10 ⁻¹⁰	0.81	53
Q126FL15AG1	9.1 X 10 ⁻¹⁰	0.75	49
Q126LL15AG1	9.5 X 10 ⁻¹⁰	1.66	108
N88RT3AK15AG1	1.9 X 10 ⁻⁹	0.97	63

[0171] 序列表

[0172] SEQ ID NO.1

[0173] >人IL-2 (N88R)

[0174] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEV
LNLAQSKNFHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[0175] SEQ ID NO.2

[0176] >人IgG1 (N297A)Fc

[0177] DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0178] SEQ ID NO.3

[0179] >human IgG2 Fc

[0180]

VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

[0181] SEQ ID NO.4

[0182] >N88RL9AG1

[0183]

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGAGGGGDKHTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

[0184] SEQ ID NO.5

[0185] >D20HLOG2

[0186]

APTSSSTKKTQLQLEHLLHLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTVECPPCPAPPVAGPSVFLFPP
KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

[0187] SEQ ID NO.6

[0188] >N88RL0AG1

[0189]

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISRINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE

YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0190] SEQ ID NO.7

[0191] >N88RL5AG1

[0192]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISRINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSDKTHTCPPCPAPPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0193] SEQ ID NO.8

[0194] >N88RL10AG1

[0195]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISRINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0196] SEQ ID NO.9

[0197] >N88RL15AG1

[0198]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISRINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTC
PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0199] SEQ ID NO.10

[0200] >N88RL20AG1

[0201]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISRINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSD
KTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0202] SEQ ID NO.11

[0203] >WTL0AG1

[0204]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISRINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL

LFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0205] SEQ ID NO.12

[0206] >WTL15AG1

[0207]

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISNINVIIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0208] SEQ ID NO.13

[0209] >D20HL15AG1

[0210]

APTSSSTKKTQLQLEHLLHLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISNINVIIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0211] SEQ ID NO.14

[0212] >AG1L15D20H

[0213]

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS
GGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLHLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT*

[0214] SEQ ID NO.15

[0215] >L9

[0216] GGGGAGGGG

[0217] SEQ ID NO.16

[0218] >L5

[0219] GGGGS

[0220] SEQ ID NO.17

[0221] >L10

[0222] GGGGSGGGGS

[0223] SEQ ID NO.18

[0224] >L15

[0225] GGGGSGGGGSGGGGS

[0226] SEQ ID NO.19

[0227] >L20

[0228] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

[0229] SEQ ID NO.20

[0230] >N88RL25AG1

[0231]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISRINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0232] SEQ ID NO.21

[0233] >N88RL30AG1

[0234]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISRINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG*

[0235] SEQ ID NO.22

[0236] >N88RL3G1ED (E233P/L234A/L235A/G236de1)

[0237] APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDV

[0238]

SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0239] SEQ ID NO.23

[0240] >N88RL3G2

[0241]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISRINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSVECPPC
PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0242] SEQ ID NO.24

[0243] >N88RL3G4 (S228P)

[0244]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISRINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGSESKYGP
PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG*

[0245] SEQ ID NO.25

[0246] >N88RL15HSA

[0247]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEV
LNLAQSKNFHLRPRDLISRINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGG
GSDAHKSEVAHRFKDLGEEFNKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLC
TVATLRETYGEMADCCAQKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAP
ELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKGERAFKAWAVARLSQRFPAEFA
EVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLA
ADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEE
PQNLIKQNCLELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDY

[0248]

LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAL
VELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL*

[0249] SEQ ID NO.26

[0250] >HSAL15N88R

[0251]

DAHKSEVAHRFKDLGEEFNKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTL
FGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRH
PYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKGERAFKAWAVARLSQRF
PKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA
DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEF
KPLVEEPQNLIKQNCLELFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLS
VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVE
LVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGGSGGGSGGGGS

[0252]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISRINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT*

[0253] SEQ ID NO.27

[0254] >N88IL15AG1

[0255]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISIIINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGSDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0256] SEQ ID NO.28

[0257] >N88GL15AG1

[0258]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISGINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0259] SEQ ID NO.29

[0260] >Q126FL15AG1

[0261]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFSFSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0262] SEQ ID NO.30

[0263] >Q126LL15AG1

[0264]

APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFSLSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG*

[0265] SEQ ID NO.31

[0266] >N88RT3AL15AG1

[0267]

APASSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN
FHLRPRDLISRNIVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG*

序列表

- <110> Delinia, Inc.
Greve, Jeffrey
- <120> 用于治疗自身免疫疾病的选择性地活化调节性 T 细胞的分子
- <130> 098210-097584-000400US
- <140> US 15/002,144
- <141> 2016-01-20
- <160> 31
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 133
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- [0001] <220>
- <223> 合成肽 - 变体 IL-2/N88R
- <400> 1
- 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 Arg 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> 2

<211> 227

<212> PRT

<213> 人工序列

[0002]

<220>

<223> 合成肽 - 人 IgG1 Fc N297A

<400> 2

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 Ala 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

[0003]

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 Gly Lys
225

<210> 3
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 20 25 30

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

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 50 55 60

[0004]

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 65 70 75 80

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 85 90 95

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

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 115 120 125

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

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

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 Arg 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 Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Asp Lys
130 135 140

[0006]

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
145 150 155 160

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
165 170 175

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
180 185 190

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
195 200 205

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val
210 215 220

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
225 230 235 240

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 245 250 255

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 260 265 270

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 275 280 285

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 290 295 300

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 305 310 315 320

[0007] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 325 330 335

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 340 345 350

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355 360 365

Lys

<210> 5

<211> 356

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - D20HLOG2

<400> 5

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

Leu Leu Leu His 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

[0008]

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 Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
130 135 140

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
145 150 155 160

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

	165	170	175
His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
	180	185	190
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr			
	195	200	205
Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn			
	210	215	220
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro			
225	230	235	240
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
	245	250	255
[0009]			
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
	260	265	270
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
	275	280	285
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
	290	295	300
Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
305	310	315	320
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
	325	330	335
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			

340

345

350

Ser Pro Gly Lys

355

<210> 6

<211> 359

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - N88RLOAG1

<400> 6

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

[0010] 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 Arg 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 Ser Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 130 135 140

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 145 150 155 160

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 165 170 175

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 180 185 190

[0011]

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 195 200 205

Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 210 215 220

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 225 230 235 240

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 245 250 255

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 260 265 270

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

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 290 295 300

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 305 310 315 320

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 325 330 335

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355

[0012] <210> 7
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽 - N88RL5AG1

<400> 7

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

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

[0015] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg 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 Ser Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 130 135 140

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 145 150 155 160

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 165 170 175

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 180 185 190

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 195 200 205

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg
 210 215 220

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 225 230 235 240

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 245 250 255

[0016]

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 260 265 270

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 275 280 285

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 290 295 300

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 305 310 315 320

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 325 330 335

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 340 345 350

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 355 360 365

Gly

<210> 9

<211> 374

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - N88RL15AG1

<400> 9

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

[0017]

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 Arg 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	Ser	Gln	Ser	Ile
	115		120		125										
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
	130		135		140										
Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
145			150		155										160
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
			165		170										175
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
			180						185						190

[0018]

Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
			195				200								205
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
			210				215								220
Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
225							230								240
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
			245												255
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
			260												270
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys

275

280

285

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 290 295 300

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 305 310 315 320

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 325 330 335

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 340 345 350

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 355 360 365

[0019]

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 370

<210> 10

<211> 379

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - N88RL20AG1

<400> 10

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 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 Arg 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

[0020] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 145 150 155 160

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 165 170 175

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 180 185 190

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 195 200 205

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 210 215 220

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

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 245 250 255

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 260 265 270

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 275 280 285

[0021]

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 290 295 300

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 305 310 315 320

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 325 330 335

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 340 345 350

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 355 360 365

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 370 375

<210> 11
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 11

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

[0022] 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 Ser Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 130 135 140

	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro		
	145					150					155					160		
	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val		
					165					170					175			
	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val		
				180					185						190			
	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln		
			195					200						205				
	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln		
	210						215						220					
[0023]	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala		
	225					230					235					240		
	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro		
					245					250					255			
	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr		
				260					265					270				
	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser		
			275					280					285					
	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr		
	290						295					300						
	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr		
	305					310					315					320		

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 325 330 335

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 340 345 350

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355

<210> 12

<211> 374

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

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

[0024]

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	Ser	Gln	Ser	Ile
	115		120		125										
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
	130		135		140										
Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
145			150		155										160
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
			165		170										175
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
		180			185										190

[0025]

Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
	195		200		205										
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
	210		215		220										
Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
225			230		235										240
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
			245		250										255
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
	260		265		270										
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys

275

280

285

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 290 295 300

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 305 310 315 320

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 325 330 335

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 340 345 350

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 355 360 365

[0026]

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 370

<210> 13

<211> 374

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - D20HL15AG1

<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 His 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 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

[0027] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 145 150 155 160

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 165 170 175

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 180 185 190

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 195 200 205

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 210 215 220

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 225 230 235 240

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 245 250 255

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 260 265 270

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 275 280 285

[0028] Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 290 295 300

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 305 310 315 320

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 325 330 335

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 340 345 350

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 355 360 365

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 370

<210> 14

<211> 374

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - AGIL15D20H

<400> 14

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

[0029]

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 Ala 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

[0030]

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
225	230	235 240
Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu		
	245	250 255
His Leu Leu Leu His Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr		
	260	265 270
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr 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 Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His		

1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 17

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

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

[0032]

<220>

<223> 合成肽序列

<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> 合成肽序列

<400> 19

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

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 20

<211> 384

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - N88RL25AG1

<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

[0033]

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 Arg 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 Ser Gln Ser Ile

115	120	125	
Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly			
130	135	140	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys			
145	150	155	160
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
	165	170	175
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
	180	185	190
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
	195	200	205
[0034]			
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
210	215	220	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val			
225	230	235	240
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
	245	250	255
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
260	265	270	
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
275	280	285	
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			

290

295

300

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 305 310 315 320

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 325 330 335

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 340 345 350

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 355 360 365

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 370 375 380

[0035]

<210> 21

<211> 389

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - N88RL30AG1

<400> 21

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 Arg 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 Ser Gln Ser Ile
 115 120 125

[0036] Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 165 170 175

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 180 185 190

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 195 200 205

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 210 215 220

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala
225 230 235 240

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
245 250 255

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
260 265 270

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
275 280 285

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

[0037]

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
305 310 315 320

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
325 330 335

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
340 345 350

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
355 360 365

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
370 375 380

Ser Leu Ser Pro Gly
385

<210> 22

<211> 373

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - IgG1 Fc E233P/L234A/L235A/G236del

<400> 22

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			

[0038]

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	Arg	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	Ser	Gln	Ser	Ile
		115					120						125		

Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
145 150 155 160

Pro Ala Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
165 170 175

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
180 185 190

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
195 200 205

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
210 215 220

[0039]

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
225 230 235 240

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
245 250 255

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
260 265 270

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
275 280 285

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
290 295 300

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

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 Arg 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 Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

[0041]

Gly Gly Gly Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
145 150 155 160

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
165 170 175

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
180 185 190

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
195 200 205

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
210 215 220

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
225 230 235 240

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
 245 250 255

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 260 265 270

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 275 280 285

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu
 290 295 300

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 305 310 315 320

[0042] Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 325 330 335

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 340 345 350

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 355 360 365

Pro Gly
 370

<210> 24

<211> 376

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - 具有铰链区突变 S228P 的 IgG4 Fc

<400> 24

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

[0043]

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg 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 Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

Pro. Lys. Asp. Thr.	Leu. Met. Ile. Ser. Arg.	Thr. Pro. Glu. Val.	Thr. Cys. Val.
180	185	190	
Val. Val. Asp. Val.	Ser. Gln. Glu. Asp. Pro.	Glu. Val. Gln. Phe. Asn.	Trp. Tyr.
195	200	205	
Val. Asp. Gly. Val.	Glu. Val. His. Asn. Ala.	Lys. Thr. Lys. Pro. Arg.	Glu. Glu.
210	215	220	
Gln. Phe. Asn. Ser.	Thr. Tyr. Arg. Val.	Val. Ser. Val. Leu. Thr.	Val. Leu. His.
225	230	235	240
Gln. Asp. Trp. Leu.	Asn. Gly. Lys. Glu. Tyr.	Lys. Cys. Lys. Val.	Ser. Asn. Lys.
245	250	255	
[0044]			
Gly. Leu. Pro. Ser.	Ser. Ile. Glu. Lys. Thr.	Ile. Ser. Lys. Ala. Lys.	Gly. Gln.
260	265	270	
Pro. Arg. Glu. Pro.	Gln. Val. Tyr. Thr.	Leu. Pro. Pro. Ser.	Gln. Glu. Glu. Met.
275	280	285	
Thr. Lys. Asn. Gln.	Val. Ser. Leu. Thr.	Cys. Leu. Val. Lys.	Gly. Phe. Tyr. Pro.
290	295	300	
Ser. Asp. Ile. Ala.	Val. Glu. Trp. Glu. Ser.	Asn. Gly. Gln. Pro.	Glu. Asn. Asn.
305	310	315	320
Tyr. Lys. Thr. Thr.	Pro. Pro. Val. Leu.	Asp. Ser. Asp. Gly.	Ser. Phe. Phe. Leu.
325	330	335	
Tyr. Ser. Arg. Leu.	Thr. Val. Asp. Lys.	Ser. Arg. Trp. Gln.	Glu. Gly. Asn. Val.

340

345

350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 370 375

<210> 25

<211> 733

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - IL2/N88RL15HSA

<400> 25

[0045] 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 Arg 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 Ser Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys
 145 150 155 160

Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala
 165 170 175

[0046] Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn
 180 185 190

Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu
 195 200 205

Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr
 210 215 220

Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala
 225 230 235 240

Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp
 245 250 255

Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys
 260 265 270

Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr
 275 280 285

Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe
 290 295 300

Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala
 305 310 315 320

Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu
 325 330 335

Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln
 340 345 350

[0047] Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser
 355 360 365

Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr
 370 375 380

Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu
 385 390 395 400

Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln
 405 410 415

Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu
 420 425 430

Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala
 435 440 445

Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys
450 455 460

Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr
465 470 475 480

Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg
485 490 495

Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala
500 505 510

Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu
515 520 525

[0048]

Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu
530 535 540

Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr
545 550 555 560

Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg
565 570 575

Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
580 585 590

Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu
595 600 605

Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys
610 615 620

Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu
625 630 635 640

Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr
645 650 655

Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys
660 665 670

Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr
675 680 685

Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu
690 695 700

[0049] Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly
705 710 715 720

Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
725 730

<210> 26

<211> 733

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - IL2/HSAL15N88R

<400> 26

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln

	20		25		30
Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu					
	35		40		45
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys					
	50		55		60
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu					
65		70		75	80
Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro					
		85		90	95
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu					
	100		105		110
[0050]					
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His					
	115		120		125
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg					
	130		135		140
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg					
	145		150		155
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala					
	165		170		175
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser					
	180		185		190
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu					

195	200	205
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro		
210	215	220
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys		
225	230	235
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp		
	245	250
255		
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser		
260	265	270
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His		
275	280	285
[0051]		
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser		
290	295	300
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala		
305	310	315
320		
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg		
	325	330
335		
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr		
340	345	350
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu		
355	360	365
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro		

370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
450 455 460

[0052]

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys

545	550	555	560
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val			
	565	570	575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
	580	585	590
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys			
	595	600	605
Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile			
	610	615	620
Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu			
625	630	635	640
[0053]			
Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu			
	645	650	655
Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu			
	660	665	670
Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg			
	675	680	685
Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met			
	690	695	700
Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg			
705	710	715	720
Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr			

725

730

<210> 27

<211> 374

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - N88IL15AG1

<400> 27

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

[0054] 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 Ile 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 Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 145 150 155 160

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 165 170 175

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 180 185 190

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 195 200 205

[0055]

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 210 215 220

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 225 230 235 240

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 245 250 255

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 260 265 270

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 275 280 285

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 290 295 300

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
305 310 315 320

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
325 330 335

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
340 345 350

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
355 360 365

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
370

[0056] <210> 28

<211> 374

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - N88GL15AG1

<400> 28

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 Gly 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 Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

[0057]

Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
145 150 155 160

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
165 170 175

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
180 185 190

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
195 200 205

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
210 215 220

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

225	230	235	240
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	245	250	255
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	260	265	270
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys	275	280	285
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	290	295	300
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	305	310	315
[0058]			
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	325	330	335
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser	340	345	350
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	355	360	365
Leu Ser Leu Ser Pro Gly	370		
<210>	29		
<211>	374		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		

<220>

<223> 合成肽 - Q126FL15AG1

<400> 29

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

[0059] 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 Ser Phe Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
145 150 155 160

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 165 170 175

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 180 185 190

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 195 200 205

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 210 215 220

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 225 230 235 240

[0060] Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 245 250 255

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 260 265 270

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 275 280 285

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 290 295 300

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 305 310 315 320

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 325 330 335

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 340 345 350

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 355 360 365

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 370

<210> 30

<211> 374

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - Q126LL15AG1

<400> 30

[0061]

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 Ser Leu Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 145 150 155 160

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 165 170 175

[0062]

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 180 185 190

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 195 200 205

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 210 215 220

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 225 230 235 240

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 245 250 255

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

260

265

270

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 275 280 285

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 290 295 300

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 305 310 315 320

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 325 330 335

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 340 345 350

[0063]

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 355 360 365

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 370

<210> 31

<211> 374

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽 - N88RT3AL15AGI

<400> 31

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 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 Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

[0064] 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 Ser Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 145 150 155 160

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 165 170 175

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 180 185 190

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 195 200 205

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 210 215 220

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 225 230 235 240

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 245 250 255

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 260 265 270

[0065] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 275 280 285

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 290 295 300

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 305 310 315 320

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 325 330 335

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 340 345 350

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 355 360 365

[0066] Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 370

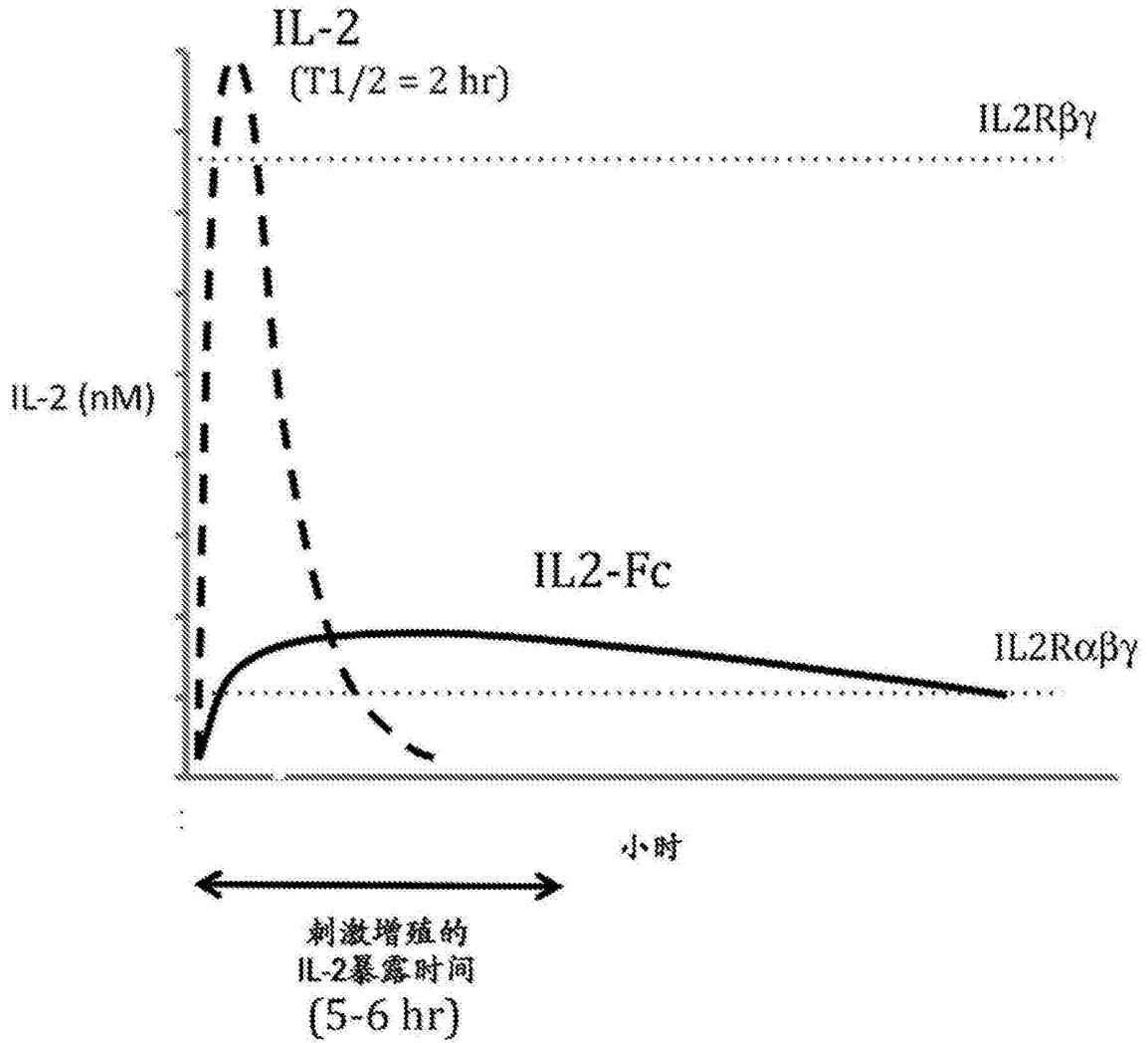


图1

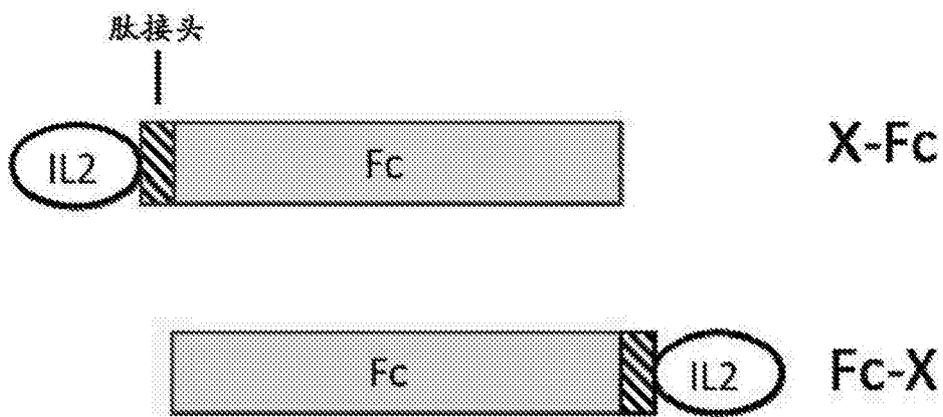


图2

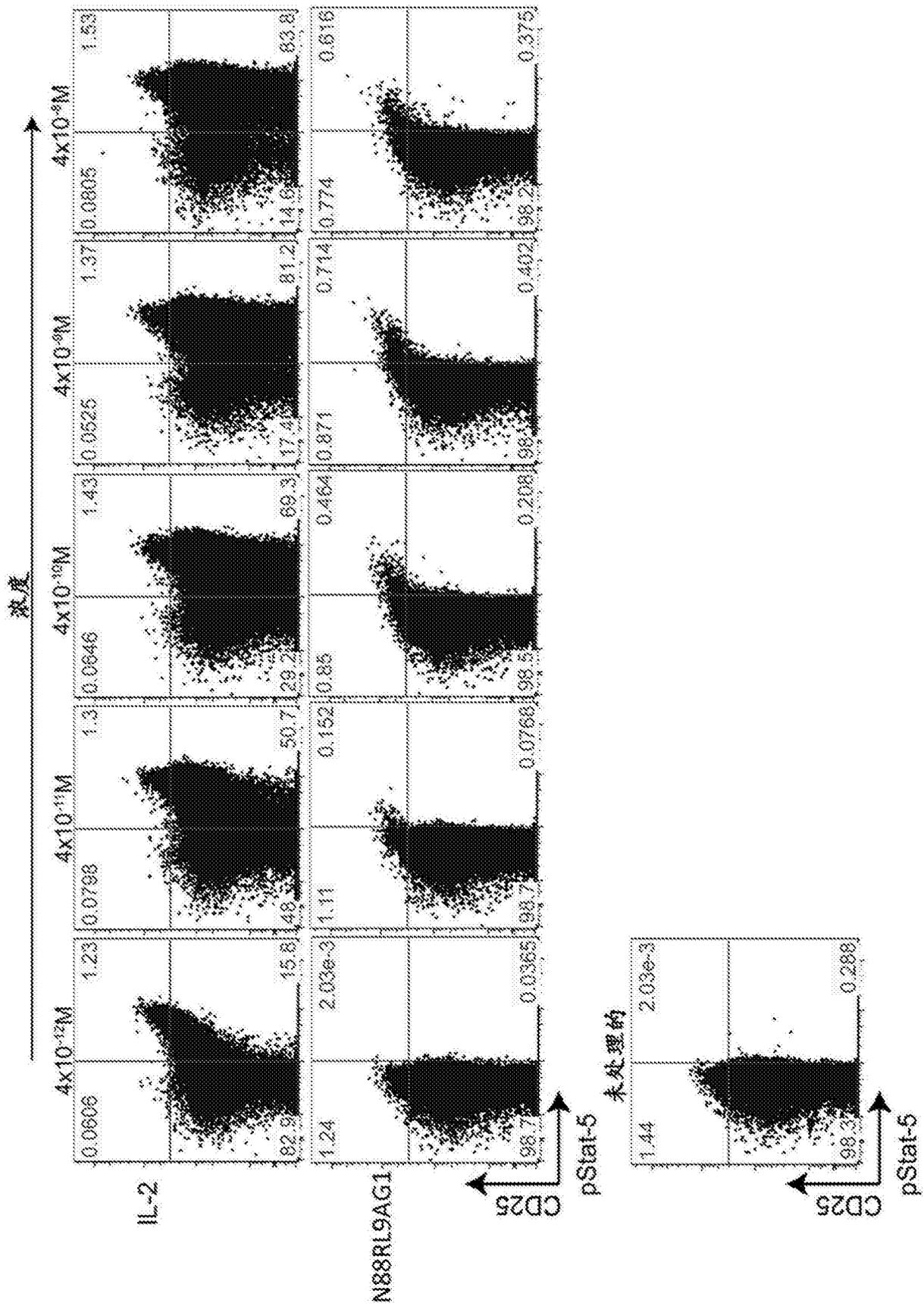


图3A

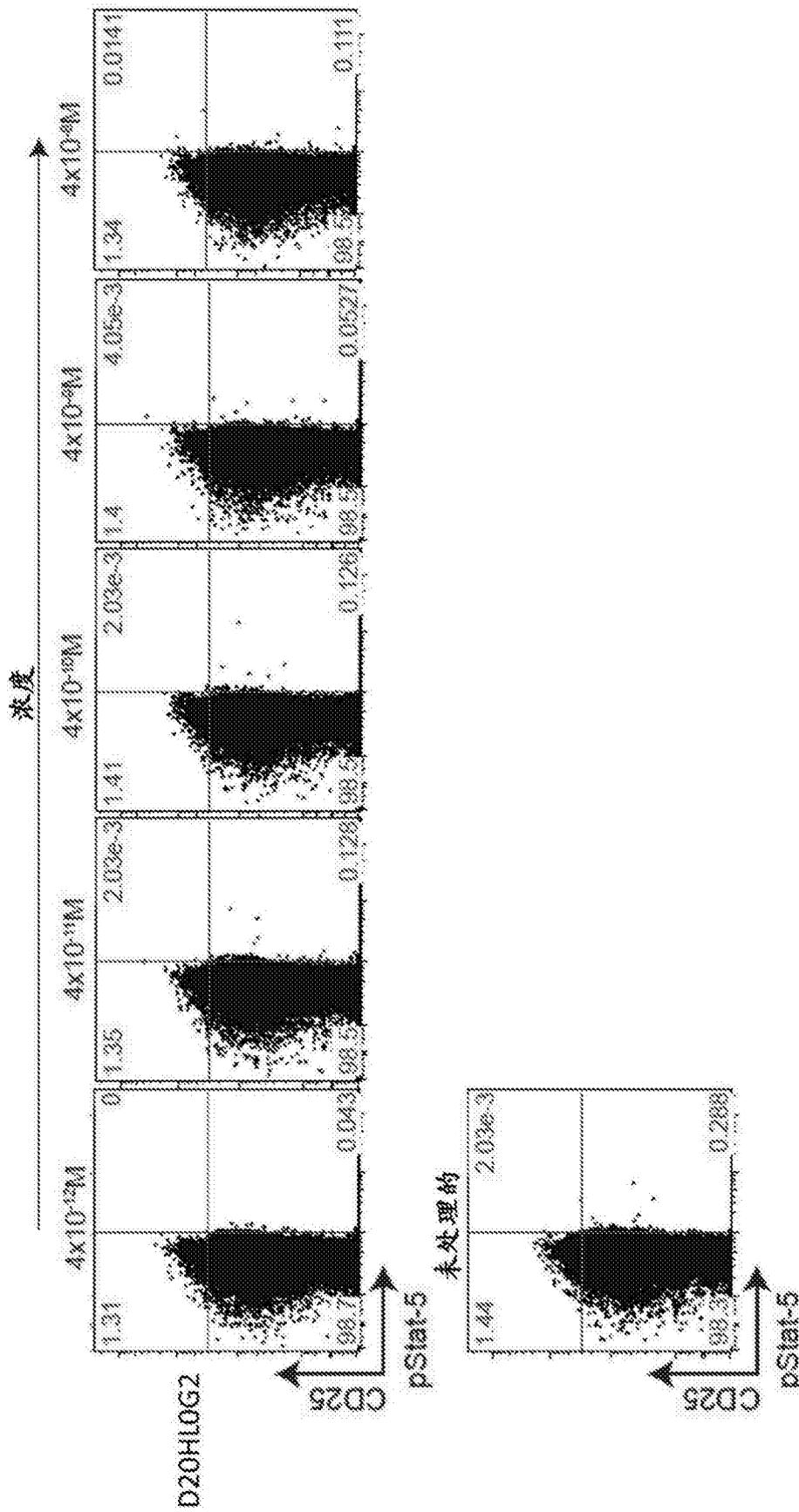


图3B

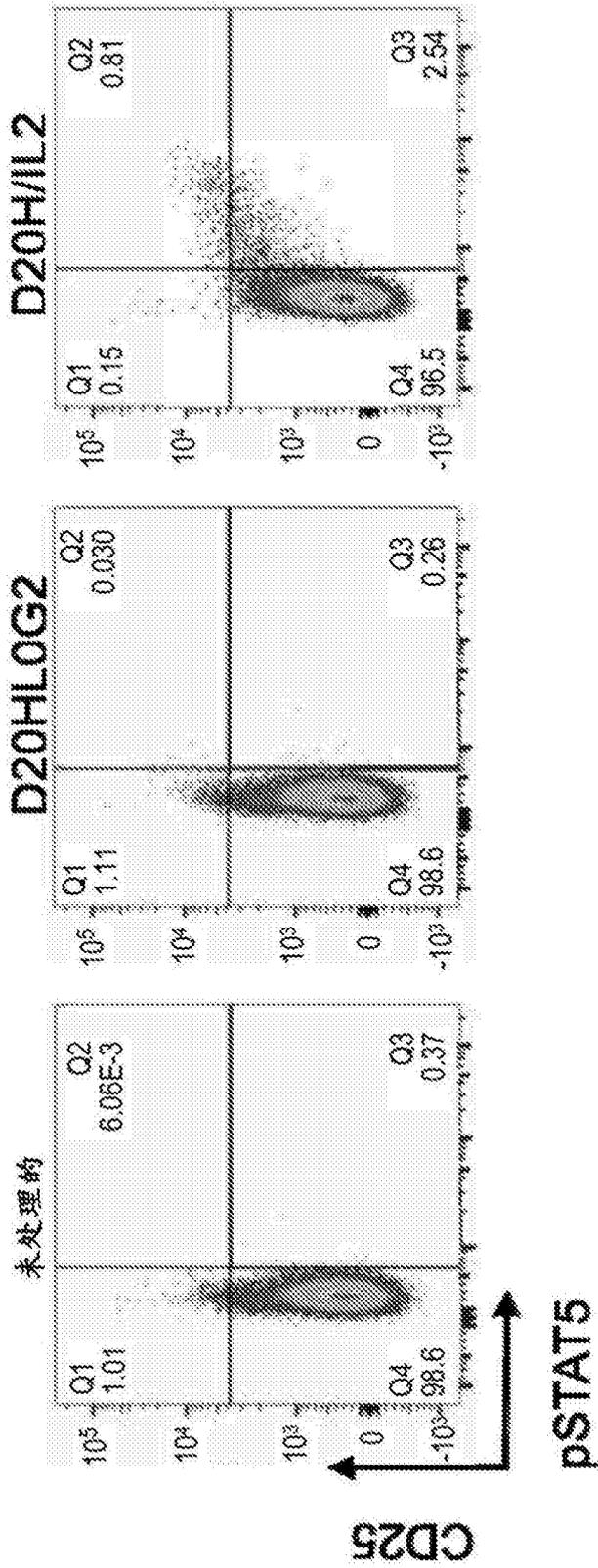


图3C

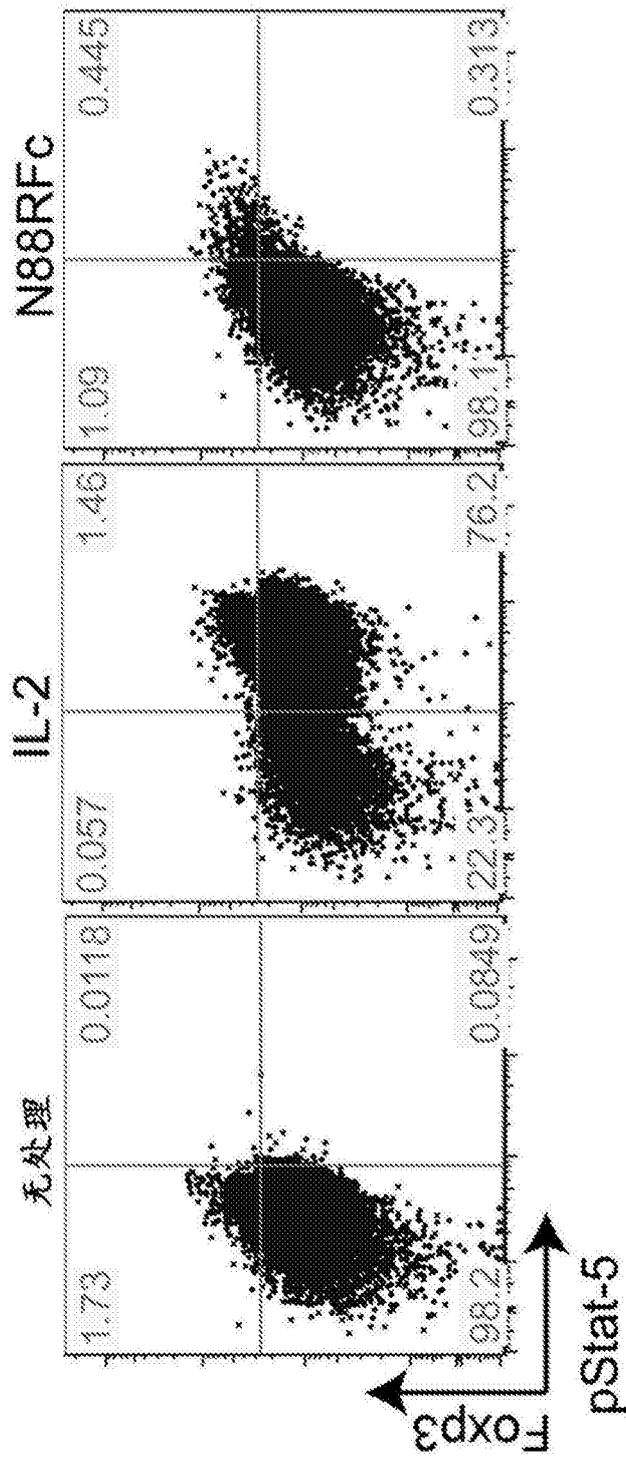


图4

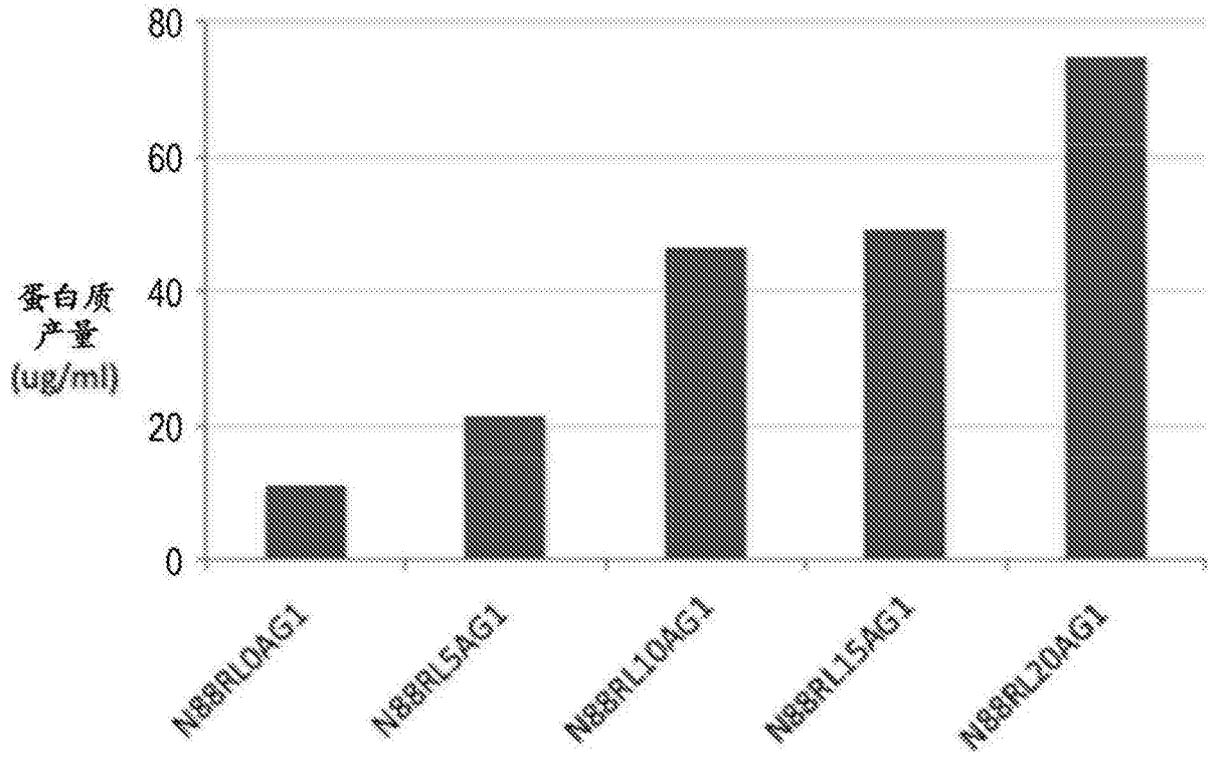


图5A

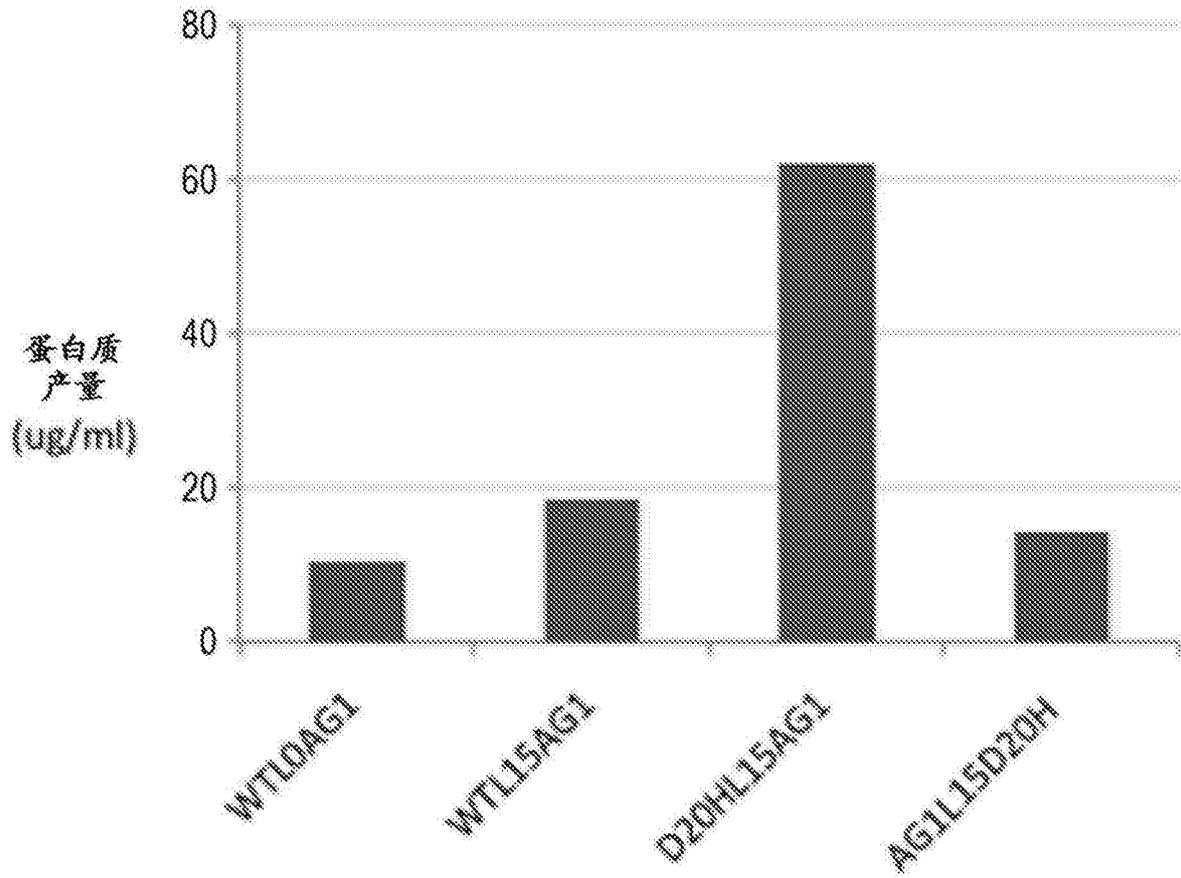


图5B

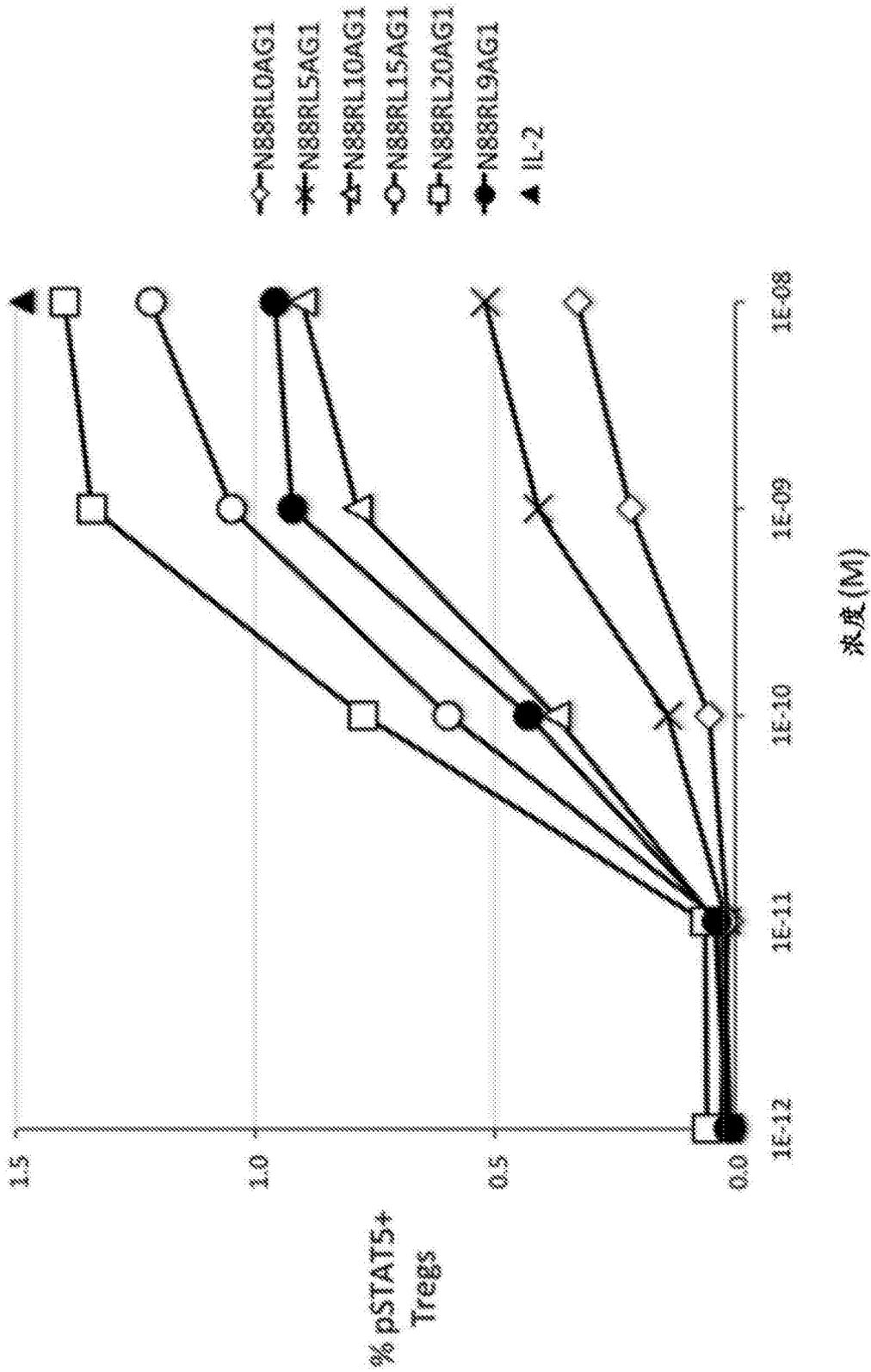


图6A

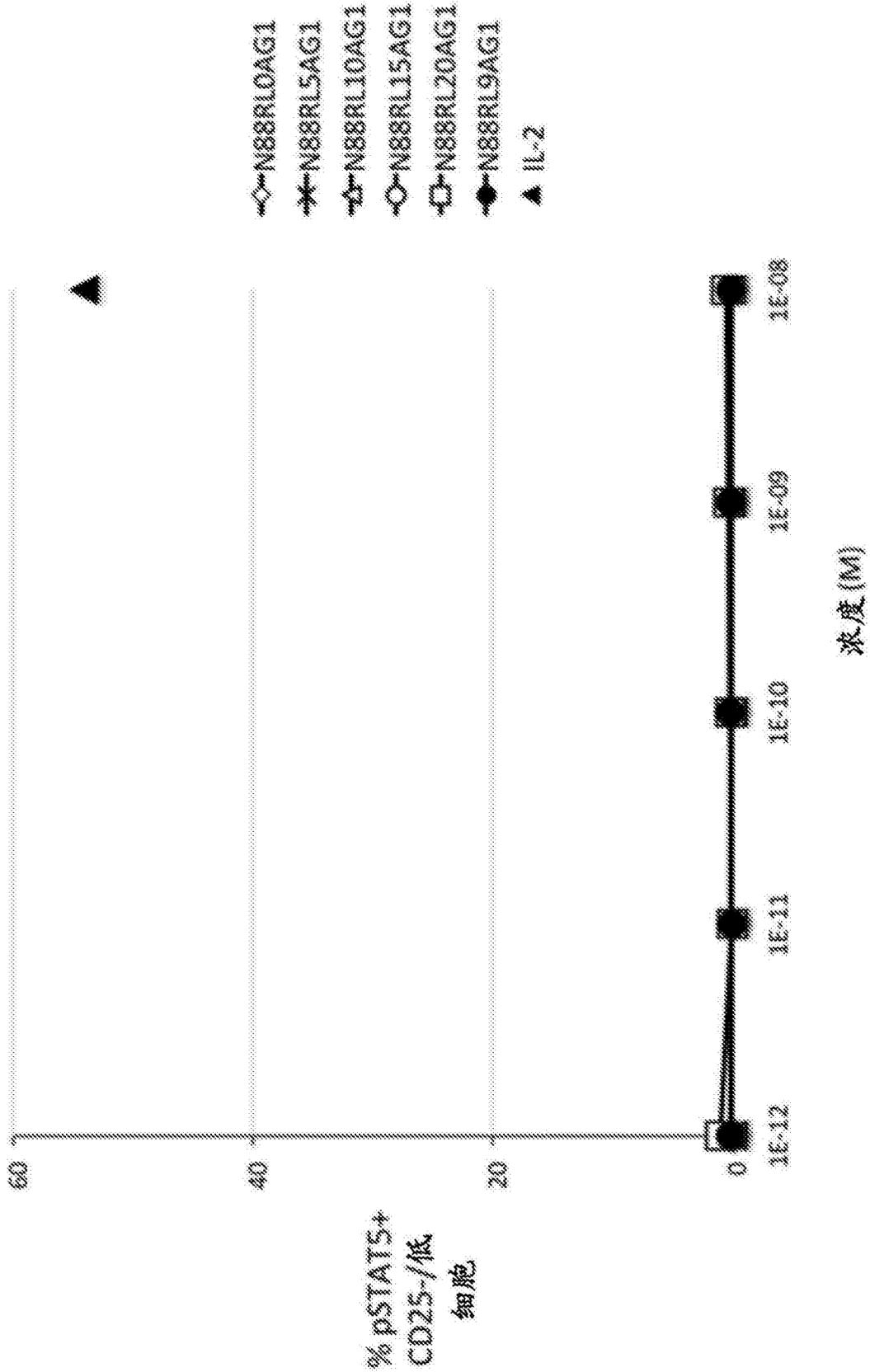


图6B

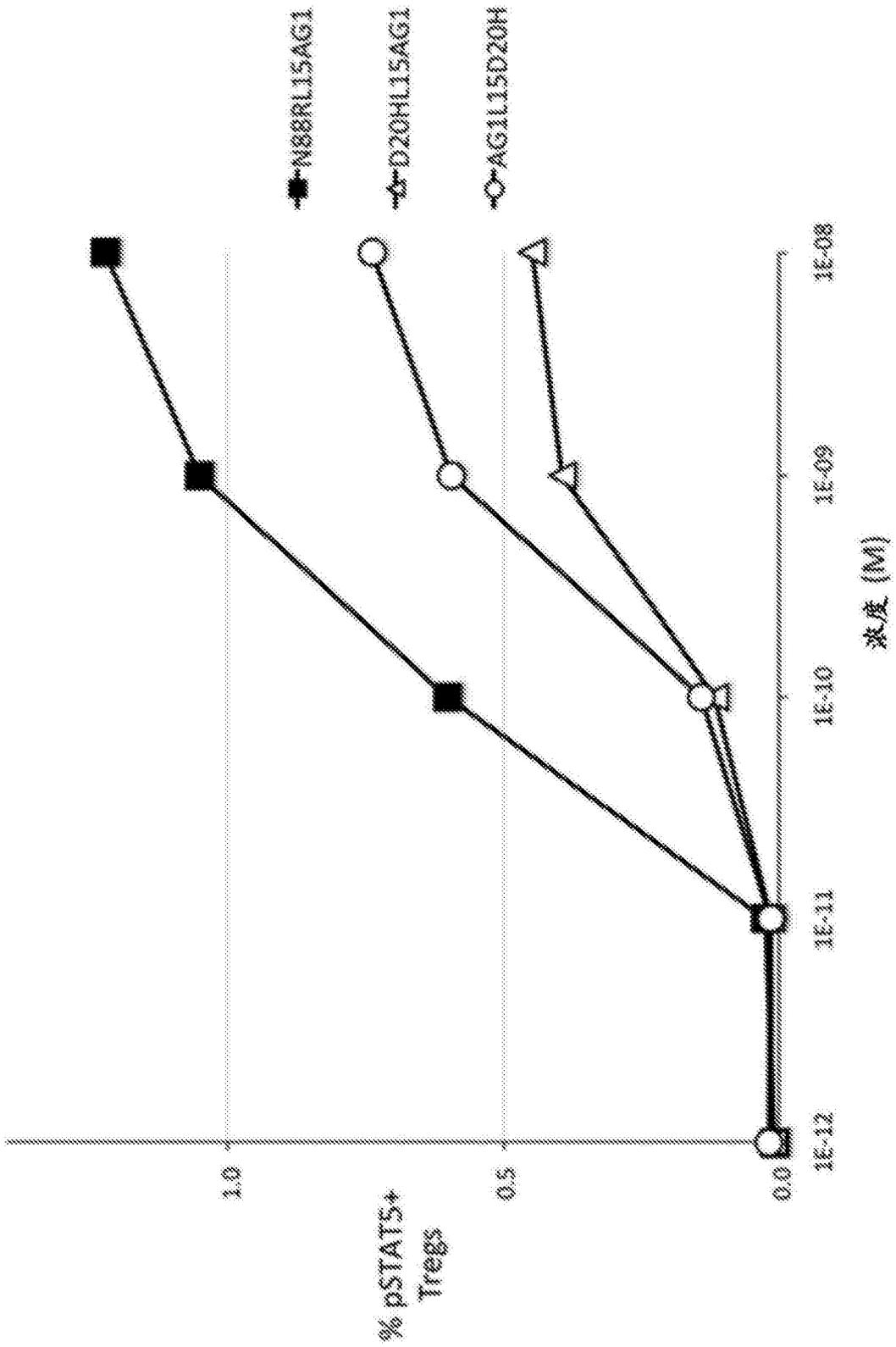


图7

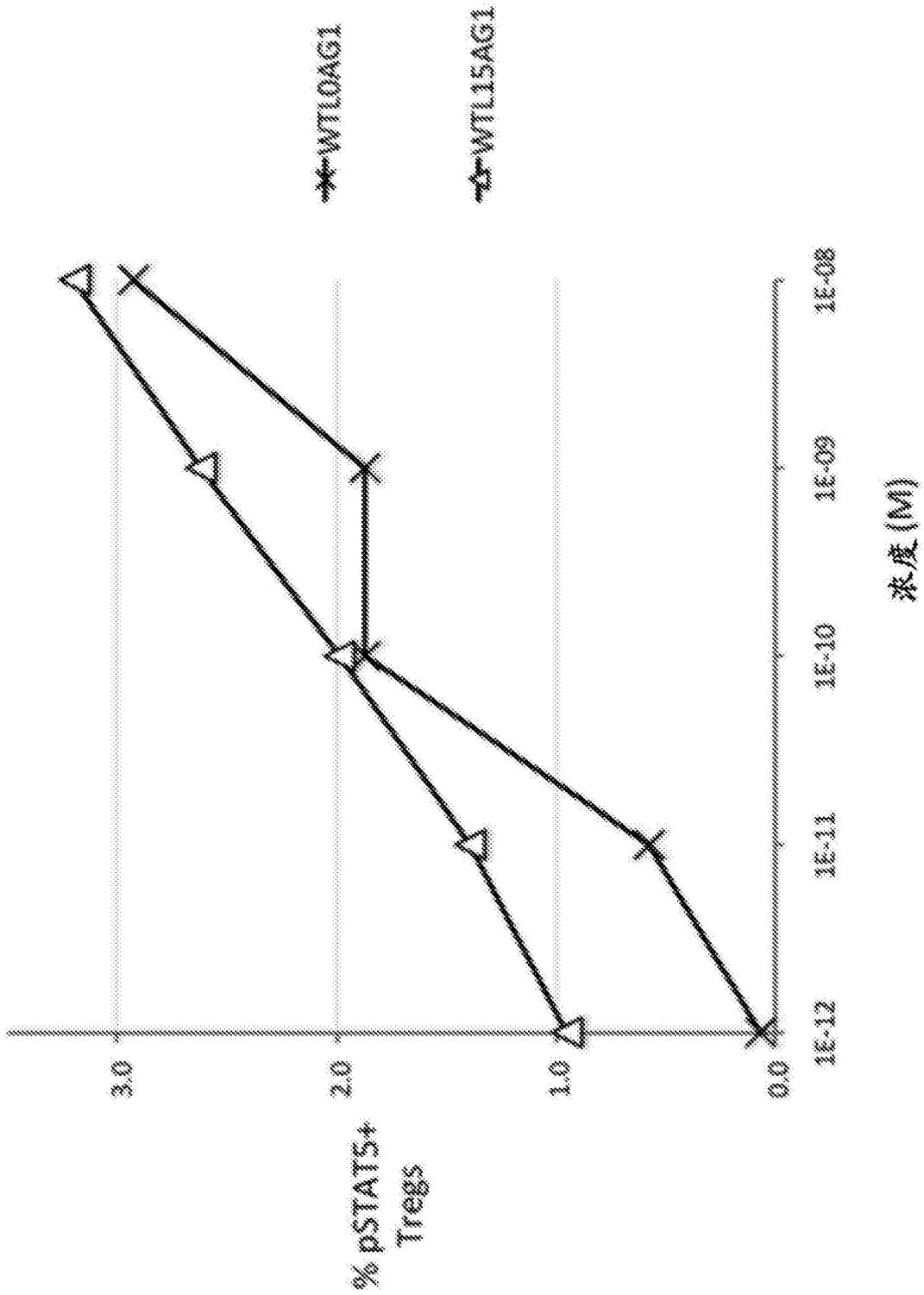


图8A

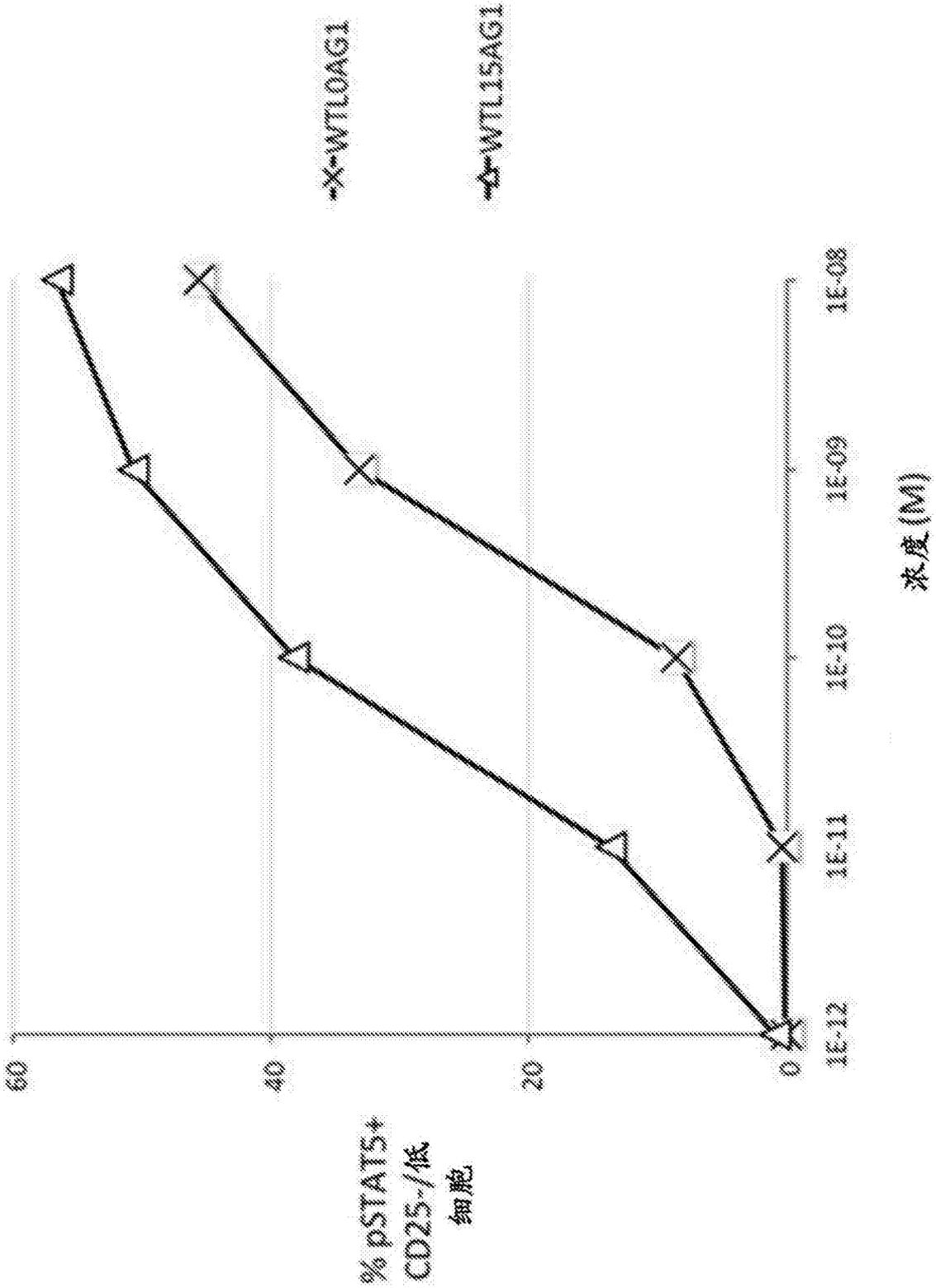


图8B

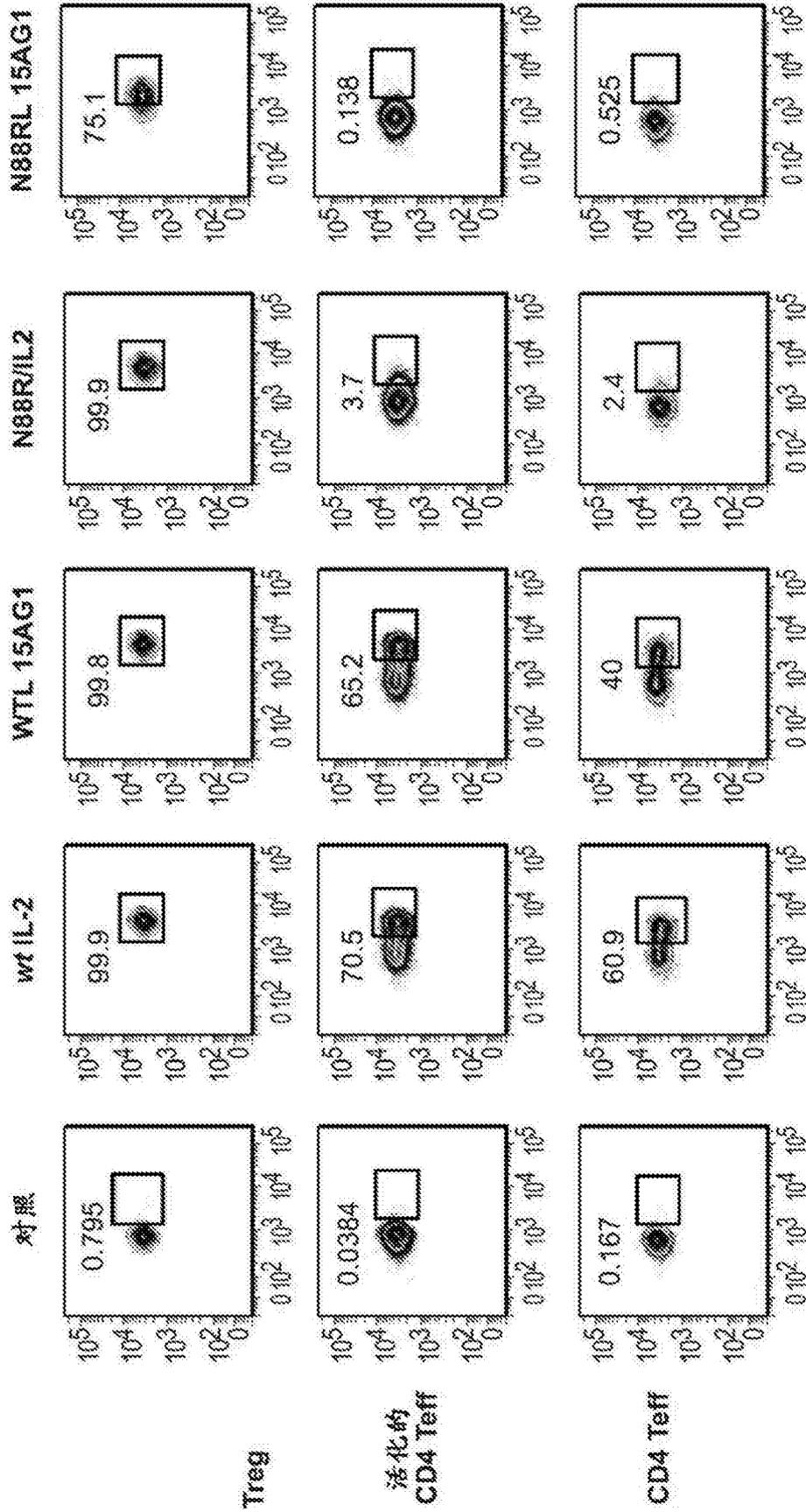


图9

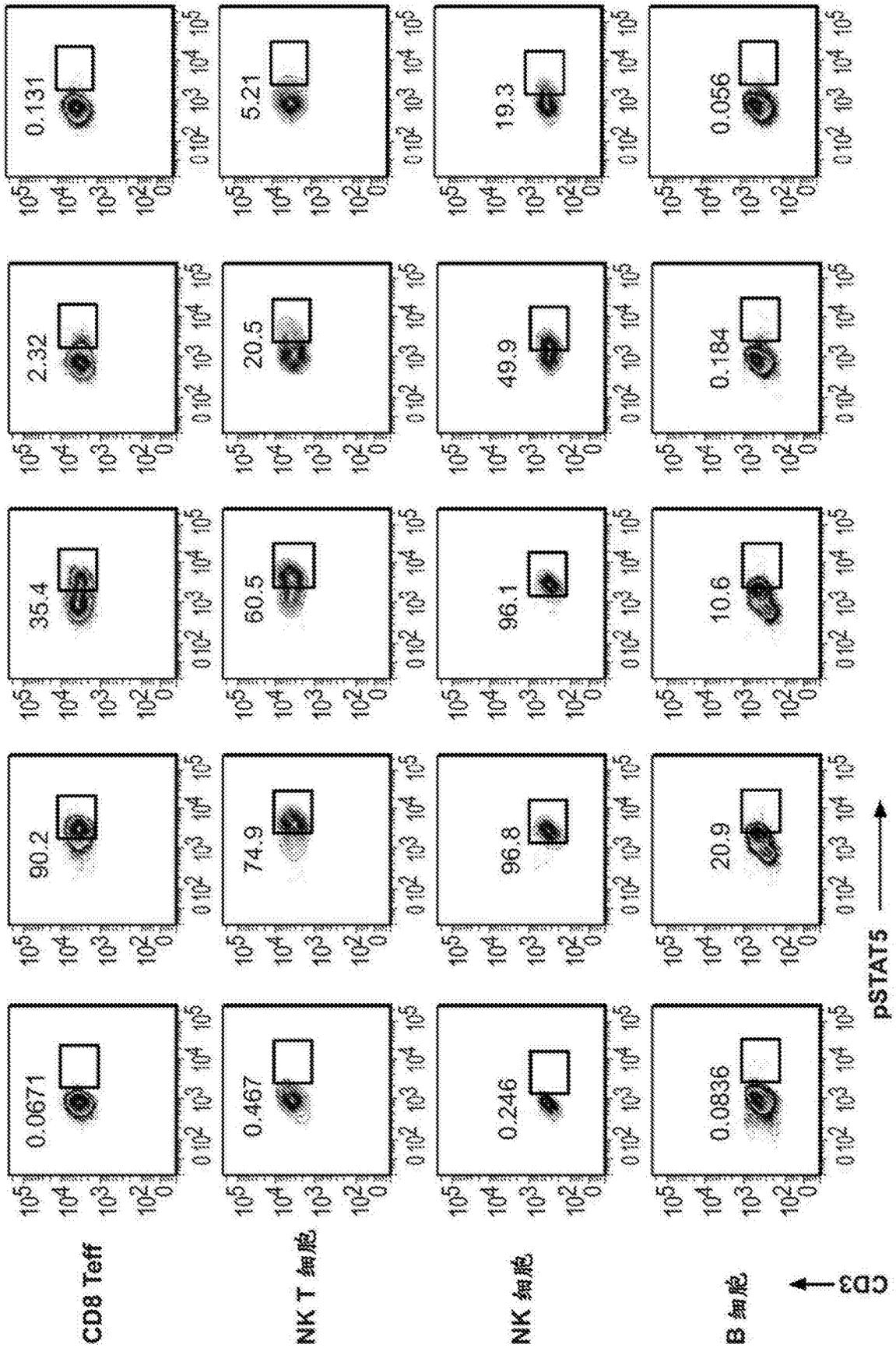


图9(续)