



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113831402 A

(43) 申请公布日 2021.12.24

(21) 申请号	202111247549.7	C12N 5/10 (2006.01)
(22) 申请日	2021.10.26	A61K 38/20 (2006.01)
(66) 本国优先权数据		A61K 47/60 (2017.01)
	202110868409.5 2021.07.30 CN	A61K 47/68 (2017.01)
(71) 申请人	西安龙腾景云生物科技有限公司	A61P 3/10 (2006.01)
地址	710075 陕西省西安市高新区锦业路	A61P 11/06 (2006.01)
	38号粤汉国际1幢10707室	A61P 17/00 (2006.01)
(72) 发明人	陆雍涛 刘建光	A61P 19/02 (2006.01)
(74) 专利代理机构	北京戈程知识产权代理有限公司	A61P 25/00 (2006.01)
	11314	A61P 35/00 (2006.01)
代理人	程伟 程云	A61P 35/04 (2006.01)
		A61P 37/02 (2006.01)
		A61P 37/06 (2006.01)
(51) Int.Cl.		
	C07K 14/55 (2006.01)	
	C12N 15/26 (2006.01)	
	C12N 15/85 (2006.01)	

权利要求书2页 说明书12页
序列表12页 附图2页

(54) 发明名称
一种人白细胞介素2变体及其用途

(57) 摘要
本公开涉及一种人白细胞介素2变体及其用途。具体而言,本公开涉及一种IL-2变体(或其衍生物),其对高亲和力受体IL-2R α / β / γ 具有消除或降低的亲合力,并保留对中等亲和力受体IL-2R β / γ 的亲合力。

1. 一种人白细胞介素2 (IL-2) 变体, 相对于成熟野生型人IL-2, 所述IL-2变体在第31至45中的一个或多个位点处包含氨基酸突变;

优选地, 其中所述突变是选自以下的任一项或其组合:

成熟野生型人IL-2第31至45位氨基酸残基突变为SEQ ID No.9所示序列;

成熟野生型人IL-2第35至41位氨基酸残基突变为SEQ ID No.10所示序列;

成熟野生型人IL-2第31至32位氨基酸残基突变为GG;

成熟野生型人IL-2第43至45位氨基酸残基突变为G。

2. 根据权利要求1所述的IL-2变体, 其中所述IL-2变体是选自以下任一序列所示: SEQ ID No.1至8、12至17。

3. 根据权利要求1至2中任一项所述的IL-2变体, 其中:

所述IL-2变体与IL-2R α 的亲合力降低; 和/或

所述IL-2变体维持与IL-2R β 的亲合力; 和/或

所述IL-2变体维持与IL-2R γ 的亲合力;

优选地, 所述IL-2变体与IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$ 的亲合力降低, 并且维持所述IL-2变体对IL-2R β/γ 的亲合力。

4. 一种IL-2变体的衍生物, 其包含权利要求1至3中任一项所述的IL-2变体, 所述IL-2变体具有选自以下任一项目的修饰或其组合:

PEG化、糖基化、缀合至白蛋白、缀合至Fc、羟乙基化、去O-糖基化;

所述PEG化是指PEG连接至所述IL-2变体的N端;

优选地, PEG的分子量为5kD至80kD;

更优选地, PEG的分子量为10kD至20kD。

5. 一种缀合物, 其包含:

第一组件, 和

第二组件;

其中: 所述第一组件直接缀合至、或通过接头间接缀合至所述第二组件;

所述第一组件是权利要求1至3中任一项所述的IL-2变体或权利要求4所述的IL-2变体的衍生物;

优选地, 所述第二组件是抗体或其抗原结合片段;

更优选地, 所述抗体或其抗原结合片段靶向肿瘤抗原。

6. 一种药物组合物, 其含有:

- 权利要求1至3中任一项所述的IL-2变体、或权利要求4所述的IL-2变体的衍生物、或权利要求5所述的缀合物;

- 药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

7. 一种核酸分子, 其编码权利要求1至3中任一项所述的IL-2变体、或权利要求5所述的缀合物。

8. 一种表达载体, 其包含权利要求7所述的核酸分子。

9. 一种宿主细胞, 其包含或表达选自以下的任一项:

包含权利要求8所述的表达载体、

表达权利要求1至3中任一项所述的IL-2变体、

表达权利要求5所述的缀合物；

优选地，所述宿主细胞为原核或真核细胞；

更优选地，所述宿主细胞选自以下任一项：细菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞；

最优选地，所述宿主细胞为酿酒酵母细胞或大肠杆菌细胞。

10. 选自以下任一项在制备药物中的用途：

权利要求1至3中任一项所述的IL-2变体、权利要求4所述的IL-2变体的衍生物、权利要求5所述的缀合物；

所述药物用于预防或治疗选自以下任一项：增生性疾病、增生性疾病的转移、免疫性疾病；

优选地，所述增生性疾病是肿瘤或癌症；

优选地，所述免疫性疾病选自：糖尿病、类风湿性关节炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮、湿疹、哮喘、自身免疫疾病、器官移植后的自身免疫反应；

更优选地，所述肿瘤或癌症选自：上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌、乳头状瘤病毒引起的癌、腺癌、黑素瘤、肉瘤、畸胎瘤、肺癌、转移性肺癌、淋巴瘤、转移性肾细胞癌。

一种人白细胞介素2变体及其用途

[0001] 本申请要求2021年7月30日提交的专利申请(申请号2021108684095,一种人白细胞介素2变体及其用途)的优先权。

技术领域

[0002] 本公开涉及具有一个或多个氨基酸突变的人白细胞介素-2 (IL-2) 变体或其衍生物。所述IL-2变体或衍生物具有消除或降低的对高亲和力受体 (IL-2R α / β / γ) 的亲和力,并保留对中等亲和力受体 (IL-2R β / γ) 的亲和力。本公开还涉及包含所述人IL-2变体的免疫缀合物、编码多核苷酸、载体、宿主细胞、药物组合物、制备方法及其用途。

背景技术

[0003] 人白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2), 也称为T细胞生长因子 (TCGF)。IL-2基因位于4号染色体 (4q27), 包括共约7kb的序列。IL-2由约133个氨基酸组成, 分子量约15kD。Doris Morgan等人1976和1977分别发现活化后的T细胞培养液可以促进T细胞增殖。培养液中的刺激因子被纯化并被鉴定为IL-2。

[0004] 最初的体外细胞实验表明T细胞在通过TCR和CD28活化之后, 可以分泌IL-2并在细胞表面表达IL-2受体 (IL-2R)。IL-2和IL-2R的结合可以引起T细胞的增殖和使T细胞产生效应。IL-2是T细胞免疫反应中起到中心作用的分子。体内实验发现在敲除IL-2或其受体后, 动物产生了自身免疫。IL-2不仅可以激活效应细胞 (如T细胞和NK细胞), 还可以激活调节性T细胞, 从而抑制过量针对自身的免疫。

[0005] IL-2通过IL-2R发生作用。IL-2R包括三个亚基: IL-2R α (即CD25)、IL-2R β (即CD122) 和IL-2R γ (即CD132)。三个亚基可以形成三种受体形式: 高亲和力受体包含所有三个亚基IL-2R α / β / γ , 中亲和力受体包含IL-2R β / γ 和低亲和力受体IL-2R α 。IL-2R β 和IL-2R γ 是IL-2激活下游信号通路所必需的, 当IL-2同时结合IL-2R β 和IL-2R γ 时, 两个受体亚基形成异源二聚体, 磷酸化细胞内的STAT5, 进入细胞核导致相应的基因转录和表达; IL-2R α 并非信号所必需, 但可以促进IL-2与IL-2R β 和IL-2R γ 的结合。

[0006] IL-2R γ 在所有免疫细胞中均有表达; IL-2R β 在CD8 $^{+}$ T细胞、NK细胞、调节性T细胞中均有表达, 而且在T细胞被激活后还会提升表达水平; IL-2R α 在调节性T细胞持续高表达, 在被激活的CD8 $^{+}$ T细胞中会有短暂表达, 随即下调表达水平。

[0007] IL-2主要由活化的T细胞, 尤其是CD4 $^{+}$ 辅助T细胞合成。它刺激T细胞的增殖和分化, 诱导细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 的生成以及外周血淋巴细胞分化成细胞毒性细胞和淋巴因子激活的杀伤 (LAK) 细胞, 促进T细胞表达细胞因子和细胞溶解分子, 促进B细胞的增殖和分化以及通过B细胞的免疫球蛋白合成, 并刺激天然杀伤 (NK) 细胞的生成、增殖和活化。IL-2在体内扩充淋巴细胞群体和提高这些细胞的效应器功能的能力使得其具有抗肿瘤效果, IL-2免疫疗法成为某些转移性癌症患者的治疗选择。目前, 高剂量IL-2已被批准用于治疗转移性肾细胞癌和恶性黑色素瘤。

[0008] W02009135615公开的IL-2变体在20、88或126位具有突变。W02012062228公开的

IL-2变体在38、42、45、62、68或88中的至少一个位置上具有突变。US8906356公开的IL-2变体在91、126位具有突变。US9732134公开的IL-2变体在15、16、22、84、88或95中的至少一个位置上具有突变。US7803361和US8124066公开的IL-2变体包含R38W突变。

发明内容

[0009] 本公开涉及具有一个或多个氨基酸突变的IL-2变体(或其衍生物)、及其缀合物;还涉及所述IL-2变体的用途、制备方法。

[0010] IL-2变体或其衍生物

[0011] 第一方面,本公开提供一种IL-2变体(或其衍生物),其与成熟野生型人IL-2 (SEQ ID No.11)相比包含一个或多个氨基酸突变。

[0012] “白介素-2”或“IL-2”指来自任何哺乳动物(如灵长类(如人)、啮齿动物(例如小鼠和大鼠))的任何天然的IL-2。该术语涵盖未加工的IL-2以及源自细胞中任何加工形式的IL-2。该术语还涵盖天然存在的IL-2变体(例如剪接变体或等位变体)。

[0013] “野生型人IL-2”在其它方面与IL-2变体相同,只是在IL-2变体的每个氨基酸位置具有野生型氨基酸的IL-2形式。术语“野生型”意图涵盖:包含一处或多处不影响对IL-2受体结合能力的天然存在的氨基酸突变。

[0014] “成熟野生型人IL-2”是指野生型人IL-2的成熟形式。未加工的人IL-2额外包含N端约20个氨基酸的信号肽,在成熟IL-2分子中缺乏信号肽。示例性成熟野生型人IL-2的氨基酸序列例如但不限于:数据库登录号INSDC的CAA25742.1、Swiss-Prot的P60568.1、Genbank中NP_000577.2的21-153段。在一些实施方案中,成熟野生型人IL-2是SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列。应当注意的是,SEQ ID NO.11和数据库中的成熟人IL-2相比,出于重组表达的目的在N端额外包含甲硫氨酸M。然而,技术人员应当理解,无论有无首位M,均属于本申请中“成熟野生型人IL-2”的范畴。

[0015] 一些实施方案中,与成熟野生型人IL-2相比,本申请所进行的氨基酸突变使得IL-2上与IL-2R α 相结合的区域(位于氨基酸约26至约47的位置)其长度变短。

[0016] 一些实施方案中,氨基酸突变包括氨基酸的取代、缺失、插入、修饰及其任意组合。为了改变例如IL-2的结合特性,可以用氨基酸(例如,用具有不同结构和/或化学特性的氨基酸)取代另一种氨基酸替换。氨基酸的取代包括由非天然氨基酸或20种标准氨基酸。可以使用本领域中公知的方法生成氨基酸突变(包括定点诱变、PCR、基因合成、化学修饰等)。

[0017] 一些实施方案中,根据本公开的IL-2变体(或其衍生物)与IL-2R α 的亲合力降低,维持与IL-2R β 和/或IL-2R γ 的亲合力。

[0018] “亲合力”指分子的结合位点与其配体之间的非共价相互作用总强度。除非另外指示,本文的“亲合力”指反映结合对的成员(例如受体和配体)之间1:1相互作用的内在结合亲合力。亲合力通常可以用解离常数(K_D)来表述,其为解离与结合速率常数(分别为 $K_{解离}$ 和 $K_{结合}$)的比率。亲合力可以通过本领域常规的方法来测量,包括本文中所描述的方法。

[0019] 一些实施方案中,根据本公开的IL-2变体(或其衍生物)与高亲合力受体(IL-2R α / β / γ)的亲合力是降低的或缺失,但维持对中等亲合力受体(IL-2R β / γ)的亲合力。

[0020] 一些实施方案中,“高亲合力IL-2受体”指IL-2受体的异三聚体形式,其由受体 γ 亚基(也称为通用细胞因子受体 γ 亚基、 γ_c 或CD132)、受体 β 亚基(也称为CD122或p70)和受

体 α 亚基(也称为CD25或p55)组成。

[0021] 一些实施方案中,“中等亲和力IL-2受体”指仅包含 γ 亚基和 β 亚基的IL-2受体,而无 α 亚基(参见Olejniczak和Kasprzak,MedSci Monit14,RA179-189,2008)。

[0022] 一些实施方案中,根据本公开的IL-2变体(或其衍生物)对调节性T细胞(Treg)的激活降低,和/或对免疫效应细胞(例如T细胞,NK细胞)的激活不受影响或增高。

[0023] 一些实施方案中,根据本公开的IL-2变体(或其衍生物),其中所述突变发生在选自第31至45位中任一个或多个位点(连续或不连续)(从SEQ ID NO:11的第2位开始计数):

[0024] 31位酪氨酸(Y)、32位赖氨酸(K)、33位天冬酰胺(N)、

[0025] 34位脯氨酸(P)、35位赖氨酸(K)、36位亮氨酸(L)、

[0026] 37位苏氨酸(T)、38位精氨酸(R)、39位甲硫氨酸(M)、

[0027] 40位亮氨酸(L)、41位苏氨酸(T)、42位苯丙氨酸(F)、

[0028] 43位赖氨酸(K)、44位苯丙氨酸(F)突变、45位酪氨酸(Y)。

[0029] 一些实施方案中,根据本公开的IL-2变体(或其衍生物),其中所述突变发生在第31至32位的任一个或多个位点(连续或不连续)(从SEQ ID NO:11的第2位开始计数)。

[0030] 一些实施方案中,根据本公开的IL-2变体(或其衍生物),其中所述突变发生在第35至41位的任一个或多个位点(连续或不连续)(从SEQ ID NO:11的第2位开始计数)。

[0031] 一些实施方案中,根据本公开的IL-2变体(或其衍生物),其中所述突变发生在第43至45位的任一个或多个位点(连续或不连续)(从SEQ ID NO:11的第2位开始计数)。

[0032] 一些实施方案中,当SEQ ID NO:11作为野生型成熟IL-2时,氨基酸突变位点是从SEQ ID NO:11的第2位开始计数(相当于,不考虑因重组表达而人为引入的甲硫氨酸)。

[0033] 另一些实施方案中,当以公共数据库或公知文献中记载的天然序列作为野生型成熟IL-2时,氨基酸突变位点是从第1位氨基酸A开始计数。

[0034] 一些具体的实施方案中,提供一种IL-2变体,其包含以下任一突变或其组合:

[0035] 第31-45位突变为Gly-Gly-Asn-Pro-Met-His-Gly-Leu-Asp-Gly-Phe-Gly (SEQ ID No.9);

[0036] 第31-32位突变为Gly-Gly;

[0037] 第35-41位突变为Met-His-Gly-Leu-Asp-Gly (SEQ ID No.10);

[0038] 第43-45位突变为Gly。

[0039] 一些具体的实施方案中,当IL-2变体包含选自以下突变或组合时,IL-2变体对IL-2R α 的亲和力降低,对IL-2R β / γ 亲和力维持:

[0040] 31-32位的YK突变为GG;突变后的序列为SEQ ID No.3或7。

[0041] 一些具体的实施方案中,当IL-2变体包含选自以下突变或组合时,IL-2变体对IL-2R α 的亲和力降低,对IL-2R β / γ 亲和力维持:

[0042] 35-41位的KLTRMLT突变为MHGLDG;突变后的序列为SEQ ID No.2或6。

[0043] 一些具体的实施方案中,当IL-2变体包含选自以下突变或组合时,IL-2变体对IL-2R α 的亲和力降低,对IL-2R β / γ 亲和力维持:

[0044] 43-45位的KFY突变为G;突变后的序列为SEQ ID No.4或8。

[0045] 一些具体的实施方案中,当IL-2变体包含选自以下突变或组合时,IL-2变体对IL-2R α 的亲和力降低,对IL-2R β / γ 亲和力维持:

- [0046] (1) 31-32位的YK突变为GG;且
- [0047] (2) 35-41位的KLTRMLT突变为MHGLDG;
- [0048] 突变后的序列为SEQ ID No.12或13。
- [0049] 一些具体的实施方案中,当IL-2变体包含选自以下突变或组合时,IL-2变体对IL-2R α 的亲合力降低,对IL-2R β / γ 亲合力维持:
- [0050] (1) 35-41位的KLTRMLT突变为MHGLDG;且
- [0051] (2) 43-45位的KFY突变为G;
- [0052] 突变后的序列为:SEQ ID No.14或15。
- [0053] 一些具体的实施方案中,当IL-2变体包含选自以下突变或组合时,IL-2变体对IL-2R α 的亲合力降低,对IL-2R β / γ 亲合力维持:
- [0054] (1) 31-32位的YK突变为GG;且
- [0055] (2) 43-45位的KFY突变为G;
- [0056] 突变后的序列为SEQ ID No.16或17。
- [0057] 一些具体的实施方案中,当IL-2变体包含选自以下突变或组合时,IL-2变体对IL-2R α 的亲合力降低,对IL-2R β / γ 亲合力维持:
- [0058] (1) 31-32位的YK突变为GG;且
- [0059] (2) 35-41位的KLTRMLT突变为MHGLDG;且
- [0060] (3) 43-45位的KFY突变为G;
- [0061] 突变后的序列为SEQ ID No.1或5。
- [0062] 在一些具体的实施方案中,所述的IL-2变体(或其衍生物)的氨基酸序列选自SEQ ID No.N0:1-8和12-17。
- [0063] 表1.人IL-2野生型及变体序列

名称	序列	SEQ ID No
成熟 IL-2-WT 野生型	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNY KNPKLTRMLTFFK FYMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIST LT	SEQ ID No. 11
IL-2-1 (31-45)	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNG GNPMHGLDGF GMPKKATELKHLQCLEEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	SEQ ID No. 1
IL-2-2 (35-41)	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NP MHGLDG FKFYMPKKATELKHLQCLEEEELK PLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	SEQ ID No. 2
IL-2-3 (31-32)	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNG GNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL T	SEQ ID No. 3

[0065]

IL-2-4 (43-45)	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NPKLTRMLTF <u>G</u> MPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	SEQ ID No. 4
IL-2-1(-M)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNG <u>G</u> N <u>PMHGLDG</u> F <u>G</u> MPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	SEQ ID No. 5
IL-2-2(-M)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN <u>PMHGLDG</u> FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	SEQ ID No. 6
IL-2-3(-M)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNG <u>G</u> N PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	SEQ ID No. 7
IL-2-4(-M)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTF <u>G</u> MPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	SEQ ID No. 8
IL-2-5 (31-32+35 -41)	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNG <u>G</u> N <u>PMHGLDG</u> FKFYMPKKATELKHLQCLEEEL KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGETTTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIST LT	SEQ ID No. 12
IL-2-5(-M)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNG <u>G</u> N <u>PMHGLDG</u> FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	SEQ ID No. 13
IL-2-6 (35-41+43 -45)	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYK NP <u>PMHGLDG</u> F <u>G</u> MPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	SEQ ID No. 14
IL-2-6(-M)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN <u>PMHGLDG</u> F <u>G</u> MPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	SEQ ID No. 15
IL-2-7 (31-32+43 -45)	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNG <u>G</u> NPKLTRMLTF <u>G</u> MPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKG SETTTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	SEQ ID No. 16
IL-2-7(-M)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNG <u>G</u> N PKLTRMLTF <u>G</u> MPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	SEQ ID No. 17
31-45 突变 序列	GGNPMHGLDGFG	SEQ ID No. 9
35-41 突变 序列	MHGLDG	SEQ ID No. 10

[0066] 天然表达的人IL-2共153个氨基酸,1-20位氨基酸是信号肽。切除信号肽后共133个氨基酸(即成熟人IL-2),对应于本公开SEQ ID No.1的2-134位。出于重组表达目的,人工

生产的IL-2首位额外带有甲硫氨酸(对应起始密码子AUG)。因此,本公开的突变位点编号实际上从SEQ ID No.1的第二位计数,即从氨基酸A开始计数。

[0067] 作为一个示例,表述“第31-32位的氨基酸突变为GG”是指:

[0068] 在人IL-2成熟蛋白的序列MAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID No.1共计133个氨基酸)中的第31-32位的YK突变为GG。

[0069] 一些实施方案中,IL-2变体是单体形式。

[0070] 第二方面,本公开提供一种IL-2变体的衍生物,其包含本公开的IL-2变体,所述IL-2变体具有选自以下任一项所述的修饰或其组合:PEG化、糖基化、缀合至白蛋白、缀合至Fc、羟乙基化、去O-糖基化。

[0071] 一些实施方案中,IL-2变体的衍生物包括本公开IL-2变体的全长、部分、或在本公开IL-2变体的基础上进一步获得的功能性衍生物、功能性片段、生物活性肽、融合蛋白、同种型或其盐。例如,包含IL-2变体的融合蛋白,所述IL-2变体的二聚物或三聚物或多聚物。所述IL-2变体的各种修饰形式(如PEG化、糖基化、缀合至白蛋白、缀合至Fc、羟乙基化、去除O-糖基化等)。

[0072] 一些实施方案中,IL-2变体的衍生物是PEG化的(可以表示为PEG-IL-2)。

[0073] 在另一些实施方案中,PEG-IL-2变体包含甲氧基-PEG-醛(mPEG-ALD)接头。在某些实施方案中,PEG的平均分子量在约5kD至约50kD;具体地5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50kD;或约5kD至约40kD;或约10kD至约30kD;或约10kD至约30kD之间;或约15kD至约20kD之间。

[0074] 某些具体实施方案中,mPEG-ALD接头包括具有选自下列平均分子量的PEG分子:约5kDa、约10kDa、约12kDa、或约20kDa。在某些实施方案中,mPEG-ALD的醛基可以是乙醛、丙醛或丁醛等。

[0075] 在一个实施方案中,IL-2变体的衍生物,相比于成熟野生型人IL-2具有延长的血清半衰期。

[0076] 缀合物

[0077] 第三方面,本公开提供一种缀合物,其包含第一组件和第二组件;其中第一组件直接缀合至(或通过接头间接缀合至)第二组件;第一组件是本公开的IL-2变体(或其衍生物);第二组件不是IL-2,不是IL-2变体(或其衍生物)。

[0078] 一些实施方案中,IL-2变体(或其衍生物)连接于至少一个第二组件。

[0079] 一些实施方案中,IL-2变体(或其衍生物)通过肽键和第二组件形成融合蛋白。

[0080] 一些具体的实施方案中,IL-2变体(或其衍生物)缀合至(或通过接头间接缀合至)第二组件的羧基端。

[0081] 一些具体的实施方案中,IL-2变体(或其衍生物)缀合至(或通过接头间接缀合至)第二组件的氨基端。

[0082] 一些实施方案中,第二组件为抗原结合组件。抗原结合组件指:特异性结合表位的多肽分子。

[0083] 在一些实施方案中,抗原结合组件能指导与其连接的部分(例如,本公开的IL-2、其变体或衍生物)到达靶位点(例如到达肿瘤细胞或具有抗原决定簇的肿瘤间质)。所述抗

原结合组件可以是抗体或抗原结合片段。

[0084] 抗体在本文中以最广义使用,并且涵盖各种抗体结构,只要它们展现出抗原结合活性,所述抗体包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗原结合片段。抗体可以包括鼠源抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、骆驼抗体。

[0085] 一些具体实施方案中,抗体或其抗原结合片段选自:包含抗体重链可变区和抗体轻链可变区的多肽复合物、Fab、Fv、sFv、F(ab')₂、线性抗体、单链抗体、scFv、sdAb、sdFv、纳米抗体、肽抗体(peptibody)、结构域抗体和多特异性抗体(双特异性抗体、diabody、triabody和tetrabody、串联二-scFv、串联三-scFv)。

[0086] 一些实施方案中,IL-2变体(或其衍生物)连接于超过一个抗原结合组件时,每个抗原结合组件可以独立地选自抗体和抗原结合片段;例如,第一抗原结合组件可以是Fab分子,而第二抗原结合组件可以是scFv分子。例如,第一抗原结合组件可以是scFv分子,而第二抗原结合组件也是scFv分子。一些实施方案中,第一和第二抗原结合组件独立地针对不同的抗原或针对同一抗原。一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段靶向肿瘤抗原。

[0087] 一些实施方案中,肿瘤抗原例如但不限于:MAGE家族(如MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2、MAGE-B2、MAGE-Xp3、MAGE-B3、MAGE-Xp4、MAGE-B4、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、GAGE家族(如GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、MART-1/Melan-A、gp75、gp100、DPPIV、ADAbp、亲环素(cyclophilin)、CEA、CAP-1、CAP-2、etv6、aml1、PSA(PSA-1、PSA-2和PSA-3)、PSMA、T细胞受体、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 α -胎蛋白、E-钙粘蛋白、 α -连环蛋白(catenin)、 β -连环蛋白、 γ -连环蛋白、p120ctn、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、SSX-1、SSX-2、SSX-3、SSX-4、SSX-5、SCP-1、CT-7。

[0088] 药物组合物

[0089] 第四方面,本公开提供一种药物组合物,其含有根据本公开的IL-2变体(或其衍生物)、或缀合物,任选地可包含药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。所述药物组合物可以为冻干制剂或可注射溶液。

[0090] 在一些具体实施方案中,药物组合物单位计量中可含有0.01重量%至99重量%的IL-2变体(或其衍生物)或缀合物;或药物组合物单位剂量中含有的IL-2变体(或其衍生物)或缀合物的量为0.1-2000mg(例如1-1000mg;1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、5、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000mg)。

[0091] 多核苷酸

[0092] 第五方面,本公开提供编码本公开的IL-2变体(或其衍生物)的多核苷酸。

[0093] 技术人员理解,编码相同氨基酸序列的核苷酸序列可以不同,由于密码子的兼并性和不同宿主的密码子偏好性,不同的核苷酸序列能够编码相同的氨基酸序列,这些序列均属于本公开的范畴内。

[0094] 表达载体

[0095] 第六方面,本公开提供一种表达载体,其含有根据本公开的多核苷酸。表达载体可以是真核表达载体、原核表达载体或穿梭表达载体。

[0096] 宿主细胞

[0097] 第七方面,本公开提供一种宿主细胞,其包含根据本公开的表达载体、或表达根据本公开的IL-2变体、或表达根据本公开的缀合物。

[0098] 一些实施方案中,宿主细胞包含(如已被转化或转染有)表达载体,所述表达载体包含根据本公开的多核苷酸。

[0099] 一些实施方案中,所述宿主细胞是原核或真核细胞。

[0100] 一些具体实施方案中,宿主细胞为细菌、酵母菌或哺乳动物细胞,具体可以为巴斯德毕赤酵母或酿酒酵母。

[0101] 一些具体实施方案中,宿主细胞是原核微生物(如大肠杆菌)。

[0102] 一些具体实施方案中,宿主细胞真核生物细胞。

[0103] 一些实施方案中,使用表达糖基化多肽的宿主细胞,例如植物和昆虫细胞。脊椎动物细胞也可以用作宿主细胞,例如,悬浮生长的哺乳动物细胞系、猴肾CV1系(COS-7)、人胚胎肾系(293或293T细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4细胞)、猴肾细胞(CV1)、VERO-76、人宫颈癌细胞(HELA)、犬肾细胞(MDCK)、buffalo大鼠肝细胞(BRL3A)、人肺细胞(W138)、人肝细胞(Hep G2)、小鼠乳房肿瘤细胞(MMT060562)、MRC5细胞、FS4细胞、CHO细胞、骨髓瘤细胞系(如YO、NS0、P3X63和Sp2/0)。

[0104] 用途、治疗方法

[0105] 第八方面,本公开提供根据本公开的IL-2变体(或其衍生物)、缀合物、药物组合物的制药用途。

[0106] 一些实施方案中,提供了IL-2变体(或其衍生物)用于治疗增生性疾病、免疫性疾病、调节T细胞介导的免疫应答、刺激个体免疫系统的用途。

[0107] 一些实施方案中,所述增生性疾病可以是肿瘤或癌(例如转移性肿瘤或癌),可以是实体瘤。

[0108] 一些实施方案中,本公开的IL-2变体(或其衍生物)、缀合物、药物组合物可用于治疗刺激宿主的免疫系统(特别是增强细胞免疫应答)。

[0109] 一些实施方案中,增强细胞免疫应答可以包括但不限于:T细胞功能升高、B细胞功能升高、淋巴细胞功能的恢复、IL-2受体表达提高、T细胞应答性提高、天然杀伤细胞活性或淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞活性升高。

[0110] 一些实施方案中,本公开的IL-2变体(或其衍生物)、缀合物、药物组合物用于治疗增殖性病症(例如癌症)。癌症的非限制性例子包括膀胱癌、脑癌、头和颈癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、子宫内膜癌、食道癌、结肠癌、结肠直肠癌、直肠癌、胃癌、前列腺癌、血液癌、皮肤癌、鳞状细胞癌、骨癌和肾癌。

[0111] 一些实施方案中,本公开的IL-2变体(或其衍生物)、缀合物、药物组合物用于治疗位于以下位置的赘生物:腹部、骨、乳房、消化系统、肝、胰、腹膜、内分泌腺(肾上腺、副甲状腺、垂体、睾丸、卵巢、胸腺、甲状腺)、眼、头和颈、神经系统(中枢和外周)、淋巴系统、骨盆、皮肤、软组织、脾、胸部、和泌尿生殖系统。

[0112] 一些实施方案中,本公开的IL-2变体(或其衍生物)、缀合物、药物组合物用于治疗癌前状况或癌症转移。癌症选自以下:肾细胞癌、皮肤癌、肺癌、结肠直肠癌、乳腺癌、脑癌、头和颈癌。

[0113] 一些实施方案中,本公开的IL-2变体(或其衍生物)、缀合物、药物组合物用于治疗:高丙种球蛋白血症(hypergammaglobulinemia)、淋巴增生性病症、病变蛋白血症(paraproteinemias)、紫癜(purpura)、结节病、塞扎里综合征(Sezary Syndrome)、Waldenström's巨球蛋白血症、高歇氏病(Gaucher's Disease)、组织细胞增多病(histiocytosis)。

[0114] 一些实施方案中,本公开的IL-2变体(或其衍生物)、缀合物、药物组合物用于治疗自身免疫疾病、移植排斥、外伤后免疫应答和传染性疾病。

[0115] 一些实施方案中,自身免疫性疾病可以是选自:I型糖尿病(type I diabetes mellitus)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)、多发性硬化症(multiple sclerosis)、慢性胃炎(chronic gastritis)、克罗恩病(Crohn's disease)、巴塞多病(Basedow disease)、别赫捷列夫病(Bechterew disease)、银屑病(psoriasis)、重症肌无力(myasthenia gravis)、自身免疫肝炎(autoimmune hepatitis)、APECED、变应性肉芽肿血管炎(Churg-Strauss syndrome)、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)、肾小球肾炎(glomerulonephritis)、吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barré syndrome)、桥本甲状腺炎(Hashimoto thyroiditis)、硬化萎缩性苔藓(lichen sclerosus)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematoses)、PANDAS、风湿热(rheumatic fever)、结节病(sarcoidosis)、舍格伦综合征(syndrome)、僵人综合症(Stiff-Man syndrome)、硬皮病(scleroderma)、韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、白斑(vitiligo)、自身免疫性肠病(autoimmune enteropathy)、肺出血肾炎综合征(Goodpastures syndrome)、皮炎(dermatomyositis)、多发性肌炎(polymyositis)、自身免疫性过敏症(autoimmune allergy)、哮喘(asthma)。

[0116] 在一些实施方案中,IL-2变体(或其衍生物)可以与免疫抑制剂联用。

[0117] 一些实施方案中,免疫抑制剂选自:糖皮质激素(glucocorticoid);硫唑嘌呤(azathioprine);环孢素A(cyclosporin A);吗替麦考酚酯(mycophenolatemofetil);他克莫司(tacrolimus);抗CD3抗体;抗CD25抗体;抗TNF- α 抗体;甲氨蝶呤(methotrexate);环孢素(cyclosporin);西罗莫司(sirolimus);依维莫司(everolimus);芬戈莫德(fingolimod);以及环磷酰胺(cyclophosphamide)。

[0118] 在一些实施方案中,向受试者施用治疗有效量的:本公开的IL-2变体(或其衍生物)、缀合物、药物组合物。

[0119] 一些实施方案中,需要治疗的受试者(如患者或个体)通常为哺乳动物,例如人。

[0120] 一些实施方案中,每日至少2次、每日至少1次、每48小时至少1次、每72小时至少一次、每周至少一次、每2周至少一次、每个月至少一次、每2个月至少一次、或每3个月至少一次向受试者施用本公开的IL-2变体(或其衍生物)、缀合物、药物组合物。

[0121] 一些实施方案中,通过任何途径施用本公开的IL-2变体(或其衍生物)、缀合物、药物组合物。例如,通过肠胃外注射(例如,皮下、静脉注射)施用。

附图说明

[0122] 图1.野生型人IL-2和IL-2受体 α 的相互作用曲线。

[0123] 图2.IL-2变体和IL-2受体 α 的相互作用曲线。

[0124] 图3.野生型人IL-2和IL-2R β / γ 的相互作用曲线。

[0125] 图4.IL-2变体和IL-2R β / γ 的相互作用曲线。

具体实施方式

[0126] 以下结合实施例用于进一步描述本公开,但这些实施例并非限制本公开的范围。

[0127] 实施例1.野生型人IL-2及IL-2变体的重组表达与制备

[0128] 合成、表达和纯化IL-2变体的核酸序列。

[0129] 1.采用密码子优化软件MaxCodon™ Optimization Program V13对编码野生型人IL-2及变体的序列进行优化。合成用全基因,并通过双酶切法将IL2的编码序列亚克隆到表达载体pcDNA3.1中;通过酶切法和测序确认最终表达载体的准确性,最终转到DH5 α 克隆菌株中。通过质粒提取试剂盒提取转染级质粒,将质粒通过转染试剂转染到哺乳动物细胞HEK293中进行瞬时表达,通过亲和层析纯化IL2蛋白。

[0130] 2.质粒转化DH5 α

[0131] 吸取含有IL2编码序列的表达质粒80-100ng加入已制备的DH5 α 感受态细胞中。将加入质粒后的感受态细胞通过热激进行转化。

[0132] 将转化后的感受态细胞加入LB液体培养基,放入摇床37℃,200rpm震荡培养约30min。将培养后的感受态细胞取出,吸取部分悬液涂在含有氨苄抗性的平板上,放入培养箱37℃过夜培养。

[0133] 从新鲜的培养板中挑取单克隆于2-5mL LB培养基,37℃ 200rpm培养8h。按1/500比例接种于200mL LB培养基中,37℃ 200rpm培养16h。收集培养后的菌液离心,去掉上清。

[0134] 3.HEK293细胞复苏与传代

[0135] 将水浴调节至37℃;培养基在37℃预热。

[0136] 从液氮罐中取出HEK293细胞,立即投入37℃水浴中,轻微摇动使其快速融化(约1min)。

[0137] 用75%乙醇消毒管外壁,放入生物安全柜内;将细胞转移到含10mL培养基的15mL离心管中,离心800rpm 5min。离心后的细胞去掉上清,取少许新鲜培养基重悬细胞,再转移到培养瓶中;加入新鲜培养基轻轻摇动,使细胞分散均匀,取细胞计数及活力检测。使密度控制在 3×10^5 至 4×10^5 细胞/mL,活力>95%。

[0138] 将细胞置于培养箱中110rpm,37℃5%CO₂培养。细胞培养2-3天,密度达到 2.0×10^6 /mL时,通过补加新鲜培养基对细胞进行传代。对细胞密度及活力检测进行监测。

[0139] 4.质粒转染HEK293细胞

[0140] 转染前1天,将HEK293细胞悬浮培养至1L,接种密度为 1×10^6 /mL,置于培养箱中110rpm,37℃ 5%CO₂培养。转染当天,使细胞密度控制在 1×10^6 /mL至 1.5×10^6 /mL。

[0141] DNA-转染试剂混合物:向转染缓冲液中加入DNA和转染试剂混匀,37℃温育。将DNA-转染试剂混合物加入待转染细胞中,放入培养箱中110rpm,37℃ 5%CO₂培养。转染后约4-6天,取出细胞培养物,离心,收集上清和细胞。

[0142] 5.蛋白纯化

[0143] 取培养5天后的细胞培养液,离心后取上清用0.22 μ m滤器进行过滤。在4℃下对缓冲液1 $\times$ PBS pH7.4进行透析。透析结束后,用Ni-IDA柱进行纯化,获得目的蛋白。

[0144] 实施例2.测定野生型人IL-2及变体IL-2对IL-2R α 的亲合力

[0145] 通过Octet检测实施例1中获得的野生型人IL-2及其变体IL-2对IL-2R α 的结合特性。Octet平台是基于生物膜干涉技术(Bio-Layer Interferometry, BLI)对生物分子相互作用进行检测分析。

[0146] 1.实验仪器及试剂耗材

[0147] **Octet®**Octet RED96e system(Pall Fortebio Corp, Menlo Park, CA);

[0148] 分析缓冲液SD Buffer (PBS (pH 7.4)+0.01%BSA+0.02%Tween20);

[0149] 醋酸缓冲液(10mM, pH4.0、5.0、6.0);

[0150] AR2G (Fortebio, 货号:18-5092);

[0151] 96-孔板 (Greiner Bio-One part no.655209);

[0152] 2.参考下面的实验设计进行实验,整个实验是在1000rpm, 30℃, 220 μ l/孔的条件下完成。

[0153] 待测物样品为:IL-2RA(即IL-2受体 α),稀释缓冲液为SD Buffer;

[0154] 待测物浓度范围为:1000nM、500nM、250nM、125nM、62.5nM。

[0155] 3.实验数据及处理

[0156] 通过Data Analysis software 9.0对实验数据进行处理。拟合模型选择1:1模型,即1个野生型人IL-2或IL-2变体(具体为IL-2-1变体)结合1个IL-2RA。拟合方式为global;即把5个浓度作为一组进行分析。拟合结果参见图1。

[0157] 实验得到的数据以1:1binding模型进行拟合,得出实施例1中野生型人IL-2或IL2变体对低亲和力受体IL-2R α 的亲合力数值。

[0158] 根据相互作用曲线图1,野生型人IL-2与IL-2RA间的相互作用动力学实验数据,可以看出随着待测物的浓度增加,实验数据中结合信号(Response)数值有明显的统计学正相关性。因此,判定野生型人IL-2与IL-2RA间有相互作用。

[0159] 根据相互作用曲线图2,IL-2-1变体同IL-2RA间的相互作用动力学实验数据,可以看出随着待测物的浓度增加,实验数据中结合信号的数值无明显的统计学正相关性。因此,判定IL-2-1变体同IL-2RA间的相互作用降低或缺失。

[0160] IL-2-1(-M)、IL-2-2、IL-2-3、IL-2-4、IL-2-5、IL-2-6、IL-2-7、IL-2-2(-M)、IL-2-3(-M)、IL-2-4(-M)、IL-2-5(-M)、IL-2-6(-M)、IL-2-7(-M)同IL-2RA间无相互作用(曲线未显示)。

[0161] 实施例3.野生型人IL-2及IL-2变体对IL-2R β / γ 的亲合力测定

[0162] 通过Octet实验来检测实施例1中野生型人IL-2及其变体对IL-2R β / γ 的亲合力。

[0163] 1.实验仪器及试剂耗材

[0164] **Octet®**Octet RED96e system(Pall Fortebio Corp, Menlo Park, CA);

[0165] 分析缓冲液SD Buffer (PBS (pH 7.4)+0.01%BSA+0.02%Tween20);

[0166] 醋酸缓冲液(10mM, pH4.0、5.0、6.0);

[0167] AR2G (Fortebio, 货号:18-5092);

[0168] 96-孔板 (Greiner Bio-One part no.655209)。

[0169] 对IL-2R β 和IL-2R γ 亚基分别进行克隆、融合到Fc hole和Fc knob上,用于制备IL-2R β / γ -Fc异源二聚体。IL-2R β -Fc-hole和IL-2R γ -Fc-knob同时转染到HEK293细胞中。

异源二聚体用Protein A和分子筛Superdex 200纯化。

[0170] 2. 整个实验是在1000rpm, 30℃, 220μl/孔条件下完成。

[0171] 待测物样品为IL-2Rβ/γ, 稀释缓冲液为SD Buffer。待测物浓度范围为1000nM、500nM、250nM、125nM、62.5nM。

[0172] 3. 实验数据及处理

[0173] 通过Data Analysis software 9.0对实验数据进行处理。拟合模型选择1:1模型, 即1个野生型人IL-2或IL-2变体(IL-2-1)结合1个IL-2Rβ/γ。拟合方式global, 即把5个浓度作为一组进行分析。拟合结果如图3。

[0174] 实验得到的数据以1:1binding模型进行拟合, 得出实施例1中野生型人IL-2或IL2变体与中亲和力受体IL-2Rβ/γ的亲和力数值。

[0175] 根据相互作用曲线图3, 野生型人IL-2与IL-2Rβ/γ间的相互作用动力学实验数据, 可以看出随着待测物的浓度增加, 实验数据中结合信号的数值有明显的统计学正相关性。因此, 判定野生型人IL-2与IL-2Rβ/γ间有相互作用。

[0176] 根据相互作用曲线图4, IL-2变体与IL-2Rβ/γ间的相互作用动力学实验数据, 可以看出随着待测物的浓度增加, 实验数据中结合信号的数值有明显的统计学正相关性。因此, 判定IL-2变体与IL-2Rβ/γ之间相互作用维持。

[0177] IL-2-1(-M)、IL-2-2、IL-2-3、IL-2-4、IL-2-5、IL-2-6、IL-2-7、IL-2-2(-M)、IL-2-3(-M)、IL-2-4(-M)、IL-2-5(-M)、IL-2-6(-M)、IL-2-7(-M)同IL-2Rβ/γ间维持了相互作用(曲线未显示)。

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> VARIANT

<222>

<223> IL-2变体

<400> 2

```

Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1           5           10           15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
          20           25           30
Lys Asn Pro Met His Gly Leu Asp Gly Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
          35           40           45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
          50           55           60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65           70           75           80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
          85           90           95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
          100          105          110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
          115          120          125
Ile Ser Thr Leu Thr
          130

```

<210> 3

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> VARIANT

<222>

<223> IL-2变体

<400> 3

```

Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1           5           10           15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Gly
          20           25           30
Gly Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
          35           40           45

```

Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu
50						55					60				
Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His
65					70					75					80
Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu
				85					90					95	
Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr
			100					105					110		
Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser
		115					120					125			
Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr										
130															
<210>	4														
<211>	132														
<212>	PRT														
<213>	人工序列 (artificial sequence)														
<220>															
<221>	VARIANT														
<222>															
<223>	IL-2变体														
<400>	4														
Met	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu
1				5				10						15	
His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr
			20					25					30		
Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Gly	Met	Pro	Lys	Lys
	35						40					45			
Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro
	50					55					60				
Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg
65					70					75					80
Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys
				85					90					95	
Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr
			100					105					110		
Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	Ile
		115					120					125			
Ser	Thr	Leu	Thr												
130															

<210> 5

<211> 130

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> VARIANT

<222>

<223> IL-2变体

<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	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Gly	Gly
			20					25					30		
Asn	Pro	Met	His	Gly	Leu	Asp	Gly	Phe	Gly	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr
			35				40						45		
Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu
			50			55							60		
Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro	Arg
65				70					75					80	
Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser
			85					90						95	
Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val
			100					105						110	
Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr
			115				120							125	
Leu	Thr														

<210> 6

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> VARIANT

<222>

<223> IL-2变体

<400> 6

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 Met His Gly Leu Asp Gly Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys		
35	40	45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro		
50	55	60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg		
65	70	75
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys		
85	90	95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr		
100	105	110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile		
115	120	125
Ser Thr Leu Thr		
130		
<210> 7		
<211> 133		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (artificial sequence)		
<220>		
<221> VARIANT		
<222>		
<223> IL-2变体		
<400> 7		
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His		
1	5	10
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Gly Gly		
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
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
85	90	95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
100	105	110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile		

115	120	125
Ile Ser Thr Leu Thr		
130		
<210> 8		
<211> 131		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (artificial sequence)		
<220>		
<221> VARIANT		
<222>		
<223> IL-2变体		
<400> 8		
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 Gly Met Pro Lys Lys Ala		
35 40 45		
Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu		
50 55 60		
Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro		
65 70 75 80		
Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly		
85 90 95		
Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile		
100 105 110		
Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser		
115 120 125		
Thr Leu Thr		
130		
<210> 9		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (artificial sequence)		
<220>		
<221> VARIANT		
<222>		
<223> 突变序列		
<400> 9		

Gly Gly Asn Pro Met His Gly Leu Asp Gly Phe Gly

1 5 10

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> VARIANT

<222>

<223> 突变序列

<400> 10

Met His Gly Leu Asp Gly

1 5

<210> 11

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu

50 55 60

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His

65 70 75 80

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu

85 90 95

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

100 105 110

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser

115 120 125

Ile Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 12

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> VARIANT

<222>

<223> IL-2变体

<400> 12

```

Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1           5           10           15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Gly
          20           25           30
Gly Asn Pro Met His Gly Leu Asp Gly Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
          35           40           45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
          50           55           60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65           70           75           80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
          85           90           95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
          100          105          110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
          115          120          125
Ile Ser Thr Leu Thr
          130

```

<210> 13

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> VARIANT

<222>

<223> IL-2变体

<400> 13

```

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1           5           10           15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Gly Gly
          20           25           30
Asn Pro Met His Gly Leu Asp Gly Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
          35           40           45

```

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro		
50	55	60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg		
65	70	75 80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys		
	85	90 95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr		
	100	105 110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile		
	115	120 125
Ser Thr Leu Thr		
130		
<210> 14		
<211> 131		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (artificial sequence)		
<220>		
<221> VARIANT		
<222>		
<223> IL-2变体		
<400> 14		
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu		
1	5	10 15
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr		
	20	25 30
Lys Asn Pro Met His Gly Leu Asp Gly Phe Gly Met Pro Lys Lys Ala		
	35	40 45
Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu		
	50	55 60
Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro		
65	70	75 80
Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly		
	85	90 95
Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile		
	100	105 110
Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser		
	115	120 125
Thr Leu Thr		
130		

<210> 15

<211> 130

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> VARIANT

<222>

<223> IL-2变体

<400> 15

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 Met His Gly Leu Asp Gly Phe Gly Met Pro Lys Lys Ala Thr
35 40 45

Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
50 55 60

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

Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
85 90 95

Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
100 105 110

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

Leu Thr

130

<210> 16

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<221> VARIANT

<222>

<223> IL-2变体

<400> 16

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

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Gly

<210> 17
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (artificial sequence)
 <220>
 <221> VARIANT
 <222>
 <223> IL-2变体
 <400> 17

115	120	125
Thr Leu Thr		
130		

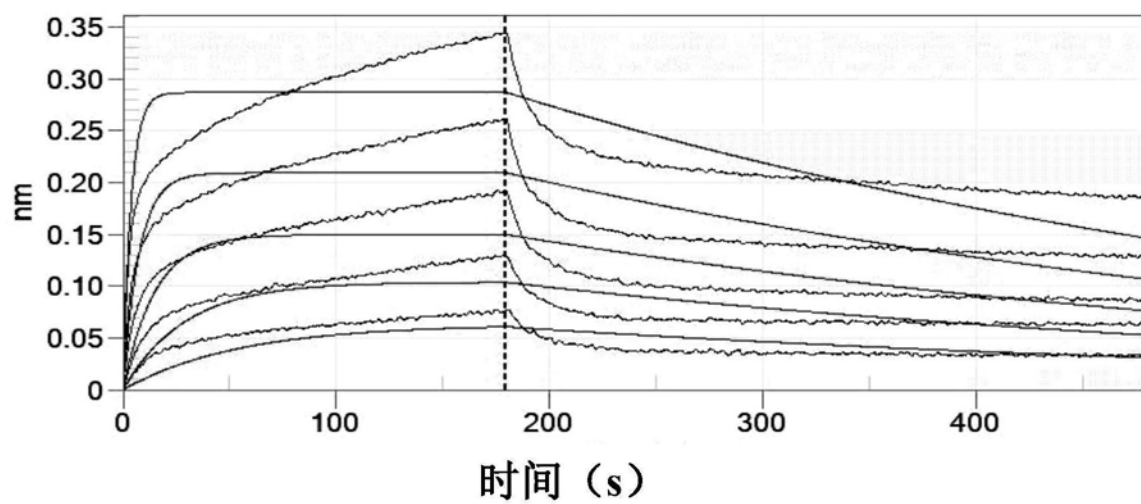


图1

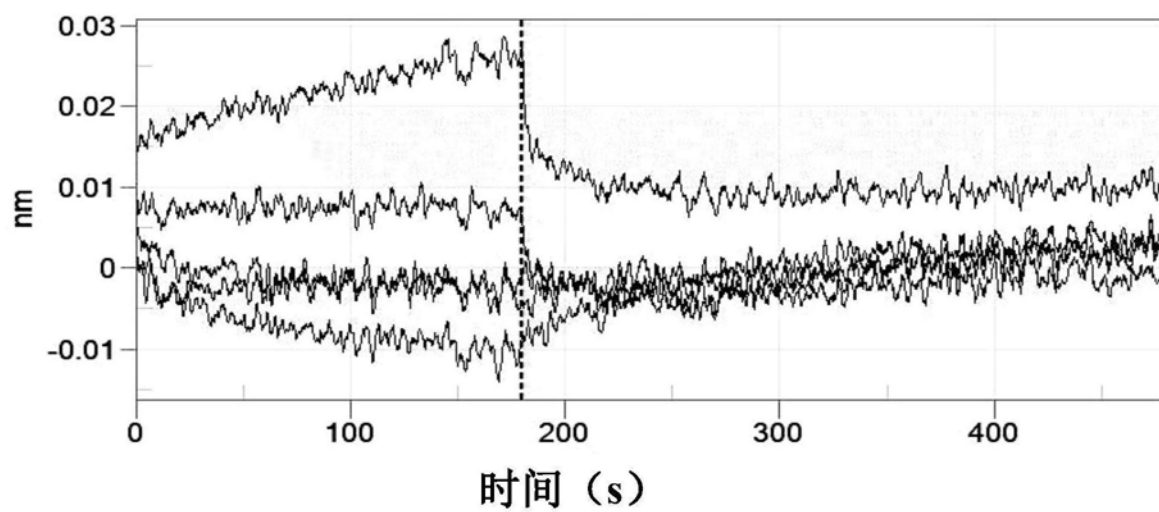


图2

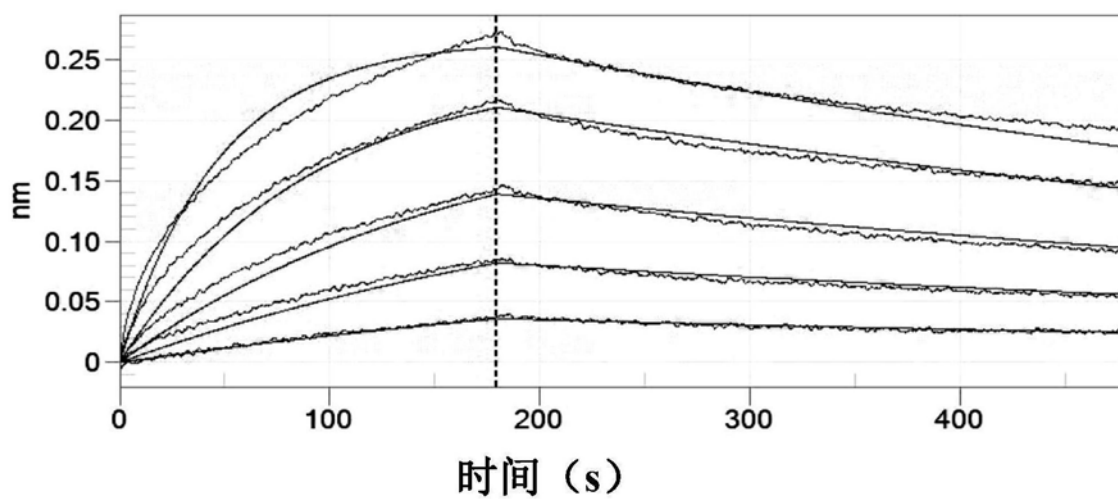


图3

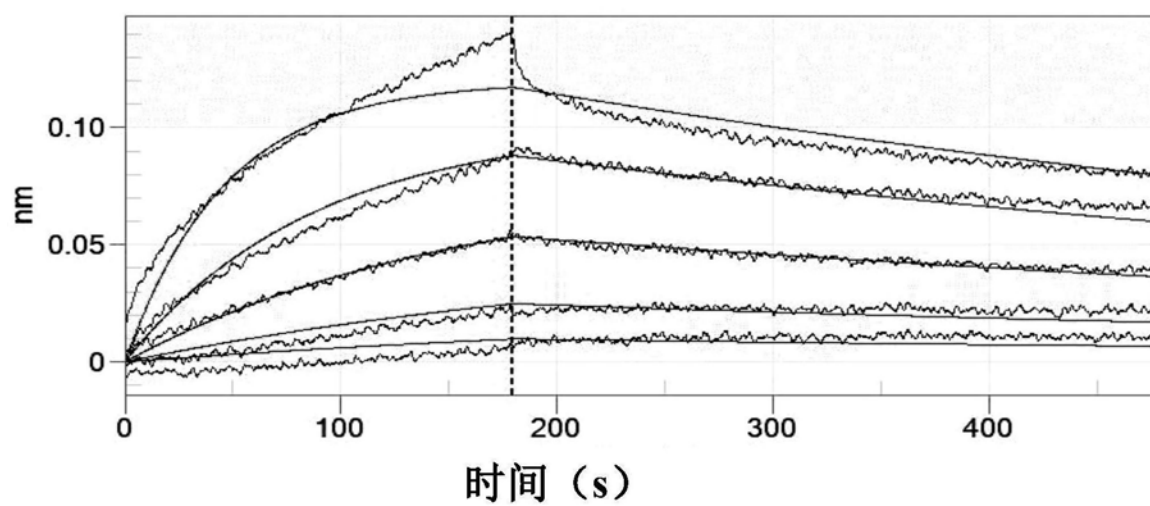


图4