

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(10) 国际公布号

WO 2021/185361 A1

(43) 国际公布日

2021 年 9 月 23 日 (23.09.2021)

(51) 国际专利分类号:

C07K 14/55 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)
C12N 15/26 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/081840

(22) 国际申请日: 2021 年 3 月 19 日 (19.03.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202010197740.4 2020年3月19日 (19.03.2020) CN
202110266549.5 2021年3月11日 (11.03.2021) CN

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(71) 申请人: 信达生物制药(苏州)有限公司 (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.)
[CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区东
平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 何开杰(HE, Kaijie); 中国江苏省苏州市苏
州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。
付凤根(FU, Fenggen); 中国江苏省苏州市苏州工
业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。周
帅祥(ZHOU, Shuaixiang); 中国江苏省苏州市苏州
工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。伍
伟伟(WU, Weiwei); 中国江苏省苏州市苏州工业
园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所(ZHONGZI LAW
OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街26
号新时代大厦7层, Beijing 100034 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,

(54) Title: INTERLEUKIN-2 MUTANT AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 白介素2突变体及其用途

(57) Abstract: The present invention provides an interleukin-2 (IL-2) mutant protein. Also provided are a fusion protein, dimer molecule, and immunoconjugate containing the IL-2 mutant protein, a nucleic acid encoding same, a vector and host cell containing the nucleic acid, as well as a pharmaceutical composition containing same and therapeutic use. The present invention further provides a method for preparing the IL-2 mutant protein, fusion protein, dimer molecule, and immunoconjugate.

(57) 摘要: 本发明提供了白介素2(IL-2)突变蛋白。还提供包含该IL-2突变蛋白的融合蛋白、二聚体分子、免疫缀合物, 以及编码其的核酸、包含该核酸的载体和宿主细胞, 以及包含其的药物组合物和治疗用途。本发明进一步提供制备该IL-2突变蛋白、融合蛋白、二聚体分子、免疫缀合物的方法。



WO 2021/185361 A1

白介素 2 突变体及其用途

技术领域

本发明涉及新型白介素 2(IL-2)突变蛋白及其用途。具体地,本发明涉及,与野生型 IL-2 相比,具有改善的性质,例如,改善的 IL-2 受体结合性质和改善的成药性的 IL-2 突变蛋白。本发明还提供包含该 IL-2 突变蛋白的融合蛋白、二聚体、免疫缀合物,以及编码该 IL-2 突变蛋白、二聚体、免疫缀合物的核酸、包含该核酸的载体和宿主细胞。本发明进一步提供制备该 IL-2 突变蛋白、融合蛋白、二聚体和免疫缀合物的方法、包含其的药物组合物和治疗用途。

背景技术

白介素-2(IL-2),也称作 T 细胞生长因子(TCGF),是一种主要由活化的 T 细胞,尤其是 CD4⁺ T 辅助细胞产生的多功能细胞因子。在真核细胞中,人 IL-2 (uniprot:P60568)作为 153 个氨基酸的前体多肽合成,在去除 N 端 20 个氨基酸后,产生成熟的分泌性 IL-2。其它物种的 IL-2 的序列也已经公开,参见 NCBI Ref Seq No. NP032392(小鼠)、NP446288(大鼠)或 NP517425(黑猩猩)。

白介素 2 具有 4 个反平行的、两亲性 α 螺旋,此 4 个 α 螺旋形成其功能必不可少的四级结构(Smith,Science 240,1169-76(1988); Bazan,Science257,410-413(1992))。在大多数情况下,IL-2 通过三种不同受体起作用:白介素 2 受体 α (IL-2R α ; CD25)、白介素 2 受体 β (IL-2R β ; CD122)和白介素 2 受体 γ (IL-2R γ ; CD132)。IL-2R β 和 IL-2R γ 对于 IL-2 的信号传导至关重要,而 IL-2R α (CD25)对于信号传导不是必需的,但可以赋予 IL-2 对受体的高亲和力结合(Krieg 等,Proc Natl Acad Sci 107,11906-11(2010))。由 IL-2R α , β , 和 γ 联合形成的三聚体受体(IL-2 $\alpha\beta\gamma$)为 IL-2 高亲和力受体(KD 约 10pM),由 β 和 γ 组成的二聚体受体(IL-2 $\beta\gamma$)为中间亲和力受体(KD 约 1nM),单独由 α 亚基形成的 IL-2 受体为低亲和力受体。

免疫细胞表达二聚体或三聚体 IL-2 受体。二聚体受体在细胞毒性 CD8⁺ T 细胞和天然杀伤细胞(NK)上表达,而三聚体受体主要在激活的淋巴细胞和 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ 抑制性调节 T 细胞(Treg)上表达(Byman, O. 和 Sprent. J. Nat. Rev. Immunol. 12, 180-190(2012))。由于静息状态的效应 T 细胞和 NK 细胞在细胞表面上没有 CD25,故对于 IL-2 相对不敏感。而 Treg 细胞在体内一贯表达最高水平的 CD25,因此,正常情况下 IL-2 会优先刺激 Treg 细胞增殖。

IL-2 通过与不同细胞上 IL-2 受体的结合,在免疫反应中介导多重作用。一方面,IL-2 具有免疫系统刺激作用,可以刺激 T 细胞和天然杀伤(NK)细胞增殖和分化。因此,IL-2 已经被批准作为免疫治疗剂用于癌症和慢性病毒感染的治疗。而另一方面,IL-2 也可以促进免疫抑制性 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(即, Treg 细胞)的维持(Fontenot 等,Nature Immunol 6,1142-51(2005); D'Cruz 和 Klein,Nature Immunol 6,1152-59(2005); Maloy 和 Powrie,Nature Immunol6,1171-72(2005)),在患者中引起由激活的 Treg 细胞导致的免疫抑制。

此外,多年的临床实践经验发现,尽管高剂量 IL-2 能在癌症例如黑色素瘤和肾癌治疗中带来显著的临床药效,但是同时也会造成药物相关的严重毒副作用,包括血管渗漏综合征和低血压等心血管系统毒性。研究表明,这些毒性很有可能是由于 IL-2 对淋巴细胞(尤其是 T 细

胞和 NK 细胞)的过度激活, 刺激释放炎症因子所致。例如, 这会导致血管内皮细胞收缩, 增大细胞间的间隙, 造成组织液外流, 从而引起血管渗漏副作用。

临床上使用 IL-2 的另外一个限制性问题是其极短的半衰期导致给药的困难。由于 IL-2 分子量只有 15KDa, 会主要通过肾小球的过滤作用进行清除, 人体半衰期只有 1 小时左右。为了达到足够高的人体暴露量, 在临床上需要每隔 8 小时输注一次大剂量 IL-2。然而, 频繁的给药不仅给病人带来很重的负担, 更重要的是大剂量输注 IL-2 会造成很高的峰值血药浓度 (Cmax), 这很可能是造成药物毒性的另外一个关键因素。Rodrigo Vazquez-Lombardi 等人 (Nature Communications, 8:15373, DOI: 10.1038/ncomms15373) 提出通过制备白介素 2-Fc 融合物来改善白介素的药效学性质, 但是该融合蛋白的表达量低且易于形成聚集体。

在 IL-2 的生产方面, 天然 IL-2 分子由于其氨基酸序列的特性, 在哺乳动物细胞 (CHO 或者 HEK293) 中表达非常困难, 而且分子稳定性也较差。因此, 目前批准上市的 IL-2 分子 Proleukin 在原核细菌表达系统中生产。但是, IL2-Fc 融合蛋白无法用细菌系统进行表达。因此, 本领域存在改善 IL-2 分子和 IL-2-Fc 分子在哺乳动物细胞中表达的需要。

在本领域中已经提出了一些 IL-2 分子的改造方案。例如, Helen R.Mott 等公开了具有消除的 IL-2R α 结合能力的人 IL-2 的突变蛋白 F42A。Rodrigo Vazquez-Lombardi 等人 (Nature Communications, 8:15373, DOI: 10.1038/ncomms15373) 也提出一种具有消除的 IL-2R α 结合能力的三重突变人 IL-2 突变蛋白 IL-2^{3X}, 该蛋白在氨基酸残基位置 38, 43 和 61 分别具有残基突变 R38D+K43E+E61R。CN1309705A 公开了导致 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ 结合降低的 D20、N88 和 Q126 位置的突变。这些突变蛋白在药代动力学和/或药效学性质方面仍有缺陷, 并且在哺乳动物细胞中表达时也存在表达量低和/或分子稳定性较差的问题。

鉴于与 IL-2 免疫治疗和生产相关的上述问题, 本领域仍需要进一步开发具有改善性质的新 IL-2 分子, 特别是展现出有利生产、纯化、具有改善的药代动力学和药效学性质的 IL-2 分子。

发明概述

本发明通过提供具有改善的成药性质和/或改善的 IL-2 受体结合性质的长效 IL-2 突变蛋白分子, 满足了上述的需求。

因此, 在一个方面, 本发明提供了新的 IL-2 突变蛋白。在一些实施方案中, 本发明的 IL-2 突变蛋白具有以下的一个或多个特性, 优选地至少具有性质(i)和(ii):

- (i) 改善的成药性, 尤其是在哺乳动物细胞中表达时改善的表达量和/或纯化性能,
- (ii) 弱化与 IL-2R $\beta\gamma$ 的结合;
- (iii) 降低或消除与 IL-2R α 的结合。

在一些实施方案中, 本发明 IL-2 突变蛋白具有性质(i)和(ii), 并相对于野生型 IL-2 蛋白, 保持与 IL-2R α 的结合。在另一些实施方案中, 本发明 IL-2 突变蛋白具有性质(i)至(iii)。

在一些实施方案中, 本发明提供包含 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变, 且还包含 IL-2R α 结合界面突变和/或缩短的 B'C'环区的 IL-2 突变蛋白。在一些优选实施方案中, 本发明提供包含 IL-

2R β γ 结合界面突变和缩短的 B'C' 环区, 但不包含 IL-2R α 结合界面突变的 IL-2 突变蛋白。

此外, 本发明提供了包含 IL-2 突变蛋白的融合蛋白、二聚体蛋白、免疫缀合物, 药物组合物和组合产品; 编码其的核酸, 包含所述核酸的载体和宿主细胞; 以及产生本发明的 IL-2 突变蛋白、融合蛋白二聚体蛋白、和免疫缀合物的方法。

再有, 本发明也提供了利用本发明的 IL-2 突变蛋白、融合蛋白、二聚体蛋白和免疫缀合物治疗疾病的方法和刺激受试者免疫系统的方法和用途。

在下面的附图和具体实施方案中进一步说明本发明。然而, 这些附图和具体实施方案不应被认为限制本发明的范围, 并且本领域技术人员容易想到的改变将包括在本发明的精神和所附权利要求的保护范围内。

附图说明

图 1 显示 IL-2 与 IL-2R α 复合物的晶体结构(PDB:1Z92)。

图 2 显示 IL-2 晶体结构(PDB:2ERJ)(A), 和人 IL-2 与人 IL15 的 B'C'loop 结构 superpose (B)。

图 3 显示从突变文库 IBYDL029 筛选出的 IL-2 突变蛋白及其序列。

图 4 显示 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ 的晶体结构(PDB:2ERJ)以及它们的接触界面。

图 5 显示 IL-2-Fc 二聚体蛋白的分子模式图。

图 6 显示本发明一些示例性 IL-2 弱化分子的结构。

图 7 显示, 选择并构建的 IL-2^{mutant}-Fc 二聚体蛋白, 在未经活化的正常 T 淋巴细胞 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞上(A-E)以及在活化的 T 淋巴细胞 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞上(F), 激活 p-STAT5 的信号曲线。

图 8 显示, 相对于对照 rhIL-2 蛋白, 弱化 IL-2^{mutant}-Fc 二聚体蛋白在不同淋巴细胞亚群上激活 p-STAT5 的信号曲线。

图 9 显示, 由降低 CD25 结合亲和力的弱化 IL-2^{mutant} 分子构建的 IL-2-Fc 二聚体蛋白, 在荷瘤 C57 小鼠中施用, 对肿瘤体积的影响(A); 以及对动物体重以及体重变化的影响(B 和 C)。

图 10 显示, 由保持 CD25 结合亲和力的弱化 IL-2^{mutant} 分子构建的 IL-2-Fc 二聚体蛋白, 在荷瘤 C57 小鼠中施用, 对肿瘤体积的影响(A); 以及对动物体重以及体重变化的影响(B 和 C)。

图 11 显示, 在 IL-2^{mutant}-Fc 二聚体蛋白给药前以及给药后第 3 天和第 7 天, 小鼠体重和体重变化的检测结果(A 和 B)、以及血液中 Treg、NK、CD4⁺、以及 CD8⁺ T 细胞的检测结果(C-F)。

图 12 显示了野生型 IL-2 蛋白 IL-2^{WT} (SEQ ID NO: 1) 的氨基酸序列及其氨基酸残基编号, 并显示了与突变蛋白 IL-2^{3X} 的序列比对。

发明详述

除非另有定义，否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本领域一般技术人员通常所理解的含义相同的含义。为了本发明的目的，下文定义了以下术语。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5%的下限和比指定数字数值大 5%的上限的范围内的数字数值。

术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项中的任意两项或多项的组合。

如本文中所用，术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任何其他要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”或“包括”某个突变或突变组合的 IL-2 突变蛋白时，也旨在涵盖仅具有所述突变或突变组合的 IL-2 突变蛋白。

在本文中，野生型“白介素-2”或“IL-2”是指作为引入本发明突变或突变组合的模板的亲本 IL-2 蛋白，优选天然存在的 IL-2 蛋白，例如来源于人、小鼠、大鼠、非人灵长类动物的天然 IL-2 蛋白，包括未经加工的(例如未去除信号肽)的形式和经加工的(例如去除了信号肽)的形式。包含信号肽的一个全长天然人 IL-2 序列显示于 SEQ ID NO: 2 中，其成熟蛋白的序列显示于 SEQ ID NO: 3 中。此外，该表述也包括天然存在的 IL-2 等位基因变体和剪接变体、同种型、同源物、和物种同源物。该表述也包括天然 IL-2 的变体，例如，所述变体可以与天然 IL-2 具有至少 95%-99%或更高同一性或具有不超过 1-10 个或 1-5 个氨基酸突变(例如，保守取代)，并优选与天然 IL-2 蛋白具有基本相同的 IL-2R α 结合亲合力和/或 IL2R $\beta\gamma$ 结合亲合力。因此，在一些实施方案中，野生型 IL-2 相比于天然 IL-2 蛋白可以包含不影响其对 IL-2 受体结合的氨基酸突变，例如，在 125 位引入了突变 C125S 的天然人 IL-2 蛋白(uniprot:P60568)属于本发明的野生型 IL-2。一个包含 C125S 突变的野生型人 IL-2 蛋白的实例显示于 SEQ ID NO: 1 中。在一些实施方案中，野生型 IL-2 序列可以与 SEQ ID NO: 1 或 2 或 3 的氨基酸序列具有至少 85%，95%，甚至至少 96%，97%，98%，或 99%或更高的氨基酸序列同一性。

在本文中，氨基酸突变可以是氨基酸取代、缺失、插入和添加。可以进行取代、缺失、插入和添加的任意组合来获得具有期望性质(例如降低的 IL-2R α 结合亲合力和/或改善的成药性和/或弱化的 IL-2R $\beta\gamma$)的最终突变蛋白构建体。氨基酸缺失和插入包括在多肽序列的氨基和/或羧基末端的缺失和插入，也包括在多肽序列内部的缺失和插入。例如，可以在全长人 IL-2 位置 1 缺失丙氨酸残基，或在 B'C' 环区缺失一个或数个氨基酸以缩短该环区的长度。在一些实施方案中，优选的氨基酸突变是氨基酸取代，例如单氨基酸取代的组合或氨基酸序列区段的置换。例如，可以是将野生型 IL-2 的 B'C' 环区序列整体或部分替换为不同的序列，优选地以获得长度缩短的 B'C' 环区序列。

在本发明中，当提及 IL-2 蛋白或 IL-2 序列区段中的氨基酸位置时，通过参考野生型人 IL-2 蛋白(也称作 IL-2^{WT})的氨基酸序列 SEQ ID NO: 1，予以确定(如图 8 所示)。可以通过与 SEQ ID NO: 1 进行氨基酸序列比对，鉴定在其它 IL-2 蛋白或多肽(包括全长序列或截短片段)上的对应氨基酸位置。因此，在本发明中，除非另有说明，否则 IL-2 蛋白或多肽的氨基酸位置为根据 SEQ ID NO: 1 编号的氨基酸位置。例如，当提及“F42”时，是指 SEQ ID NO: 1 的第 42 位苯丙氨酸残基 F，或经比对在其它 IL-2 多肽序列上的对应位置的氨基酸残基。为进行氨基酸位置确定而实施的序列比对，可以使用可从 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 获得的 Basic Local Alignment Search Tool，采用默认参数进行。

在本文中，在提及 IL-2 突变蛋白时，以如下方式来描述单氨基酸取代：[原始氨基酸残基/位置/取代的氨基酸残基]。例如，位置 35 的赖氨酸取代为谷氨酸，可以表示为 K35E。当在一个给定位置(例如 K35 位)可以有多种可选氨基酸取代方式(例如 D,E)时，该氨基酸取代可以表示为：K35D/E。相应地，可以通过加号“+”或“-”将各单氨基酸取代连接起来，以表示在多个给定位置的组合突变。例如 K35E、T37E、R38E 和 F42A 位置的组合突变，可以表示为：K35E+T37E+R38E+F42A，或 K35E-T37E-R38E-F42A。

在本文中，可以通过在比较窗内比较两条最佳比对的序列来确定“序列同一性百分比”。优选地，在参考序列(例如 SEQ ID NO: 1)的全长上确定序列同一性。用于比较的序列比对方法是本领域内公知的。适用于确定序列同一性百分比的算法包括例如 BLAST 和 BLAST 2.0 算法(参见 Altschul 等, Nuc. Acids Res.25: 3389-402,1977 和 Altschul 等 J.Mol. Biol. 215: 403-10, 1990)。可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公众获取用于进行 BLAST 分析的软件。出于本申请的目的，同一性百分比采用可从 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 获得的 Basic Local Alignment Search Tool，利用默认参数来确定。

如本文中使用的，术语“保守取代”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的生物学功能的氨基酸取代。例如，可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和 PCR 介导的诱变引入保守取代。典型的保守型氨基酸取代是指将一种氨基酸取代为具有相似的化学性质(例如电荷或疏水性)的另一种氨基酸。功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。在本发明中，保守取代残基来自以下的保守替代表 X，尤其是表 X 中的优选保守氨基酸取代残基。

表 X

原始残基	示例性取代	优选保守氨基酸取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe

Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu
---------	-------------------------------	-----

例如,野生型 IL-2 蛋白可以相对于 SEQ ID NO: 1-3 之一具有保守氨基酸取代,或仅具有保守氨基酸取代,且在一个优选实施方案中,保守取代不超过 10 个氨基酸残基,如 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 个残基。再例如,本发明的突变 IL-2 蛋白可以相对于本文中具体给出的 IL-2 突变蛋白序列(例如 SEQ ID NO: 37-638 之任一)具有保守氨基酸取代,或仅具有保守氨基酸取代且在一个优选实施方案中,保守取代不超过 10 个氨基酸残基,如 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 个残基。

“亲和力”或“结合亲和力”可以用于反映结合对子的成员之间相互作用的内在结合能力。分子 X 对其结合配偶体 Y 的亲和力可以由平衡解离常数(K_D)表示,平衡解离常数是解离速率常数和结合速率常数(分别是 k_{dis} 和 k_{on})的比值。结合亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是本文中的 ForteBio 亲和力测定技术。

在本文中,抗原结合分子是可以特异性结合抗原的多肽分子,例如,免疫球蛋白分子、抗体或抗体片段,例如 Fab 片段和 scFv 片段。

在本文中,抗体 Fc 片段是指含有至少一部分的恒定区的免疫球蛋白重链的 C-端区域,并且可以包括天然序列 Fc 片段和变体 Fc 片段。天然序列 Fc 片段涵盖天然存在的各种免疫球蛋白 Fc 序列,例如各种 Ig 亚型以及其同种异型的 Fc 区 (Gestur Vidarsson 等, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.) 在一个实施方案中,人 IgG 重链 Fc 片段从重链的 Cys226 或从 Pro230 延伸至羧基端。在另一实施方案中,Fc-片段的 C-端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。在另一些实施方案中,Fc 片段是包含突变的变体 Fc 片段,例如包含 L234A-L235A 突变。除非本文中另外指出,Fc 片段中的氨基酸残基的编号根据 EU 编号系统,也称为 EU 索引,如 Kabat, E.A.等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242 中所述。在一些实施方案中,抗体 Fc 片段可以在 N 端带有 IgG1 铰链序列或部分 IgG1 铰链序列,例如根据 EU 编号, E216 到 T225 的序列或 D221 到 T225 的序列。在所述铰链序列中可以含有突变。

IL-2 蛋白属于具有四个 α 螺旋束(A,B,C,D)结构的短链 I 型细胞因子家族成员。在本文中,术语“B'C' Loop”或“B'C'环区”或“B'C'环序列”可互换使用,是指 IL-2 蛋白的 B 螺旋和 C 螺旋之间的连接序列。通过 IL-2 的晶体结构分析(例如 PDB:2ERJ),可以确定一个 IL-2 蛋白的 B'C'环序列。为了本发明的目的,根据 SEQ ID NO: 1 的编号,该 B'C'环序列是指 IL-2 多肽中连接位置 72 的残基和位置 84 的残基的序列。在 SEQ ID NO: 1、2 和 3 的野生型 IL-2 蛋白中,该连接序列包括 A73-R83 共 11 个氨基酸。相应地,在本文中,术语“缩短的环区”或“缩短的 B'C'环区”是指相对于野生型 IL-2 蛋白,突变蛋白具有长度减小的 B'C'环序列,即,根据 SEQ ID NO: 1 的编号,氨基酸残基 aa72 和 aa84 之间的连接序列长度缩短。“缩短的环区”可以通过环序列的替换或截短来实现。所述替换或截短可以发生在 B'C'环序列的任何区域或部分。例如,替换或截短可是环区 A73-R83 序列的替换或自该序列 C 端的一个或多个氨基酸残基截短。再例如,替换或截短可是环区 Q74-R83 序列的替换或自该序列 C 端的一个或多个氨基酸残基截短。在进行所述替换或截短后,如果需要,可以进一步在环区序列中

引入单氨基酸替代,例如用于消除糖基化的氨基酸替代,和/或回复突变,以进一步改善突变蛋白的性能,例如成药性能。因此,在本文中,经突变后的缩短B'C'环区可以通过在引入突变后连接位置72的残基和位置84的残基之间的序列来描述。

在本文中,“IL-2R α 结合界面”突变是指,发生在IL-2与IL-2R α (即,CD25)相互作用的氨基酸位点上的突变。可以通过分析IL-2与其受体复合物的晶体结构(例如PDB:1Z92),确定这些相互作用位点。在一些实施方案中,所述突变尤其是指IL-2的氨基酸残基35-72区域的突变,特别是在如下氨基酸位点上的突变:35;37;38;41;42;43;45;61;62;68;72。优选地,与引入所述突变前的对应蛋白相比,包含所述突变的IL-2蛋白具有降低或消除的IL-2R α 结合。

在本文中,“IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面”突变是指,发生在IL-2与IL-2R $\beta\gamma$ (即,CD122和CD132)相互作用的氨基酸位点上的突变。可以通过IL-2与其受体复合物的晶体结构分析(例如PDB:2ERJ),确定这些相互作用氨基酸位点。在一些实施方案中,所述突变尤其是指IL-2的氨基酸残基12-20、氨基酸残基84-95、和氨基酸残基126区域的突变,特别是在如下氨基酸位点上的突变:12,15,16,19,20,84,87,88,91,92,95,126。优选地,与引入所述突变前的对应蛋白相比,包含所述突变的IL-2蛋白具有减弱的IL-2R $\beta\gamma$ 结合。

在本文中,对IL-2R $\beta\gamma$ 受体结合而言,“弱化”IL-2蛋白分子是指,在IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面引入突变,其中相对于引入此突变前的对应IL-2蛋白,所述突变导致降低的对IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合亲和力。进一步优选地,相对于对应蛋白,所述弱化分子具有降低的T细胞(例如CD25-T细胞或CD25+T细胞)和/或NK细胞激活活性。例如通过检测所述弱化分子和对应蛋白激活T细胞pSTAT5信号的EC50值比值,下降倍数可达到例如5倍以上,例如10倍以上,或50倍以上,或100倍以上,或甚至1000倍以上。例如,相对于对应蛋白,弱化分子对T细胞的激活活性可以下降10-50倍,或50-100倍,或100-1000倍,或更高倍数。因此,在本发明中,在一些实施方案中,本发明的弱化分子具有“弱化”的对IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合亲和力和“弱化”的T细胞激活活性。

本发明的各方面将在下面各小节中进一步详述。

1. 本发明的IL-2突变蛋白

本发明IL-2突变蛋白的有利生物学性质

本发明人经长期研究发现,可以组合实施如下分子突变和改造,来同时改善IL-2的药效、降低IL-2的毒副作用、和实现良好的生产性能:

(i) 在IL-2与IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合界面引入特定的残基突变,弱化与IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合,一定程度地下调IL-2的活性。通过包含弱化IL-2R $\beta\gamma$ 受体结合的此类突变,本发明的IL-2突变蛋白可以在激活淋巴细胞杀伤肿瘤的同时,避免由淋巴细胞过度激活导致的大量炎症因子释放,和由此带来的药物相关毒性。此外,该弱化突变还可以通过减低本发明IL-2突变蛋白与广泛存在于淋巴细胞上的IL-2受体的结合亲和力,减少由IL-2受体介导的IL-2突变蛋白清除,延迟IL-2突变蛋白的作用时效;

(ii) 将本发明的突变IL-2蛋白构建成IL-2-Fc二聚体。该二聚体的形成可以增加本发明

IL-2 突变蛋白的分子量，极大地减小肾清除，并通过 FcRn 介导的体内循环回收，进一步延长 IL-2-Fc 融合蛋白的半衰期。从而，克服由 IL-2 的短半衰期和高频大剂量施用带来的高峰值血药浓度问题；

(iii) 对 IL-2 的 B'C' loop 结构进行改造，例如分别使用 IL-15 分子的 loop 进行替换或者将 IL-2 分子 B'C' loop 进行截短。该 B'C' 环突变可以显著地增强本发明 IL-2 突变蛋白中 B'C' loop 结构的稳定性，显著地提升 IL-2 突变蛋白和由其构建的 IL-2-Fc 二聚体分子的生产性能，例如显著提升的表达量和纯度。

而且，本发明人发现，在本发明的突变蛋白中，在保持上述优良性质的同时，还可以根据需要，调节 IL-2 突变蛋白与 IL-2R α 的结合活性，以满足 IL-2 在抗肿瘤或自身免疫疾病治疗等多方面不同的成药需求，从而，进一步赋予本发明突变蛋白优良的药效性质。

例如，本发明突变蛋白可以保持与野生型 IL-2 基本上相当的 IL-2R α 结合活性；或可以进一步组合如下突变：(iv) 在 IL-2 与 IL-2R α 受体的结合界面的一个或多个特定的突变，以改变 IL-2 突变蛋白对 IL-2R α 的结合性能。

由此，通过对序列的改造，本发明的 IL-2-Fc 系列分子，一方面弱化与其受体 IL-2R β/γ 的结合亲和力，实现了更优秀的药代动力学实验结果和药效结果，另一方面在成药性例如蛋白表达量和纯度方面得到了显著的提升。

因此，本发明提供了具有改善的成药性质和改善的 IL-2 受体结合性质的 IL-2 突变蛋白。包含本发明 IL-2 突变蛋白的 IL-2-Fc 分子可以有效地避免对淋巴细胞的强激动造成的炎症因子的过度释放，具有更加平稳长效的药代特性。因此，可以用较低的单次给药剂量来达到足够高的人体药物暴露量，避免 C_{max} 过高导致的药物相关毒性。此外，更有意义的是，虽然本发明的长效 IL-2-Fc 分子相对于天然 IL-2 具有弱化的淋巴细胞免疫刺激活性，但是因为药代动力学性质的显著改善，本发明分子的体内有效药物浓度持续的时间更长，可以发挥较长时间的对淋巴细胞的持续刺激，达到与天然 IL-2 分子相当甚至更好的药效动力学效果，在动物中实现更好的抗肿瘤药效和耐受性。

改善的成药性质

在一些实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白具有改善的成药性质，例如，当在哺乳动物细胞例如 HEK293 或 CHO 细胞中表达时，尤其是以 Fc 融合蛋白表达时，具有选自以下的一项或多项性质：(i) 优于野生型 IL-2 蛋白的表达量；和(ii) 易于纯化至更高的蛋白纯度。

在本发明的一些实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白与野生 IL-2 相比表现出表达水平的增加。在本发明的一些实施方案中，增加的表达发生在哺乳动物细胞表达系统中。表达水平可通过允许定量或半定量分析细胞培养上清液（优选一步亲和层析纯化后的上清液）中的重组 IL-2 蛋白量的任何合适方法来测定。例如，可以通过蛋白质印迹或 ELISA，评估样品中的重组 IL-2 蛋白量。在一些实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白，与野生型 IL-2 相比，在哺乳动物细胞中的表达量增加至少 1.1 倍，或至少 1.5 倍，或至少 2 倍、3 倍或 4 倍以上，或至少 5、6、7、8 或 9 倍，或甚至 10 倍以上，例如大约 10、15、20、25、30 和 35 倍。

在一些实施方案中,如通过测定蛋白 A 亲和层析后纯化蛋白的纯度所显示的,本发明 IL-2 突变蛋白-Fc 融合物,相对于野生型 IL-2 蛋白融合物,表现出更高的纯度。在一些实施方案中,蛋白纯度通过 SEC-HPLC 技术检测。在一些优选的实施方案中,在一步蛋白 A 亲和层析纯化后,本发明 IL-2 突变蛋白-Fc 融合物的纯度可以达到 70%,或 80%,或 90%以上,优选地 92%,93%,94%,95%,98%或 99%以上。

在一些实施方案中,如通过测定蛋白 A 亲和层析后纯化蛋白的纯度所显示的,本发明 IL-2-Fc 二聚体蛋白,相对于由野生型 IL-2 蛋白形成的对应 IL-2-Fc 二聚体蛋白,表现出更高的纯度。在一些实施方案中,蛋白纯度通过 SEC-HPLC 技术检测。在一些优选的实施方案中,在一步蛋白 A 亲和层析纯化后,本发明 IL-2-Fc 二聚体蛋白的纯度可以达到 70%,或 80%,或 90%以上,优选地 92%,93%,94%,95%,98%或 99%以上。

弱化的 IL-2 $\beta\gamma$ 受体结合性

通过在 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面引入突变,在一些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白,相对于引入所述突变前的对应蛋白,具有弱化的 IL-2 $\beta\gamma$ 结合亲和力。

在一些实施方案中,相对于引入 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变进行弱化前,本发明的 IL-2 突变蛋白对 IL-2R β 和/或 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合亲和力降低。在一些实施方案中,相对于进行弱化前,本发明的 IL-2 突变蛋白对 IL-2R β 受体的结合亲和力降低,例如降低 1-20 倍或更高,包括在一些实施方案中,去除对 IL-2R β 受体的结合。在一些实施方案中,相对于进行弱化前,本发明的 IL-2 突变蛋白对 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合亲和力降低,例如降低 1-100 倍或更高。在一些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白不与 IL-2R β 受体的结合,但仍能够与 IL-2R $\beta\gamma$ 受体结合,优选地其中所述与 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合,相比于进行弱化前,可以例如降低 1-100 倍,如大约 20-80 倍。可以通过 ForteBio 亲和测定技术,测定本发明 IL-2 突变蛋白,例如与 Fc 片段融合的本发明 IL-2 突变蛋白或其二聚体分子,与受体 IL-2R β 或 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的平衡解离常数 (K_D) 来确定结合亲和力。

通过在 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面引入突变,在一些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白,相对于引入所述突变前的对应蛋白,具有弱化的 IL-2 活性,例如选自以下至少一项的 IL-2 活性:

- 相比于弱化前,降低对 T 细胞(例如 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞,例如 CD4⁺/CD8⁺ CD25⁻ T 细胞, CD4⁺ CD25⁺ T 细胞)的激活;
- 相比于弱化前,降低对 NK 细胞的激活;
- 相比于弱化前,降低由 IL-2 刺激的 T 细胞/NK 细胞炎症因子释放。

在一个实施方案中,相对于弱化前,本发明 IL-2 突变蛋白导致减少的由 IL-2 介导的淋巴细胞(例如 T 细胞和/或 NK 细胞)激活和/或增殖。在一个实施方案中,淋巴细胞是 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞,例如 CD25⁻ T 细胞。在一个实施方案中,在 STAT5 磷酸化测定试验中,通过检测 IL-2 突变蛋白在淋巴细胞例如 T 细胞或 NK 细胞中对 STAT5 磷酸化信号的激活,来鉴定 IL-2 突变蛋白激活 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞的能力。例如,如本申请实施例中所述,可以通过流式细胞术分析细胞中的 STAT5 磷酸化,确定半最大有效浓度(EC50)。例如通过检测所述本发明的 IL-2 弱化分子和对应蛋白激活 T 细胞 STAT5 磷酸化信号的 EC50 值的比值,本发明的 IL-2 突变分子具有“弱化”的 T 细胞激活活性。根据该比值,本发明 IL-2 突变分子的 T 细胞激活活性下降可达到例如 5 倍以上,例如 10 倍以上,或 50 倍以上,或 100 倍以上,或甚

至 1000 倍以上。例如，相对于对应蛋白，本发明 IL-2 突变分子对 T 细胞的激活活性可以下降 10-50 倍，或 50-100 倍，或 100-1000 倍，或更高倍数。在一些优选实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2，具有减少的由细胞表面 IL-2 受体介导的 IL-2 清除，表现出增加的体内半衰期。

在一些优选实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2 具有减小的由 IL-2 与其受体介导的体内毒性。

保持或改变的 IL-2R α 受体结合

IL-2 蛋白通过与 IL-2 受体相互作用来引发信号传导和发挥功能。野生型 IL-2 对不同 IL-2 受体显示出不同的亲合力。在静息效应细胞(包括 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞)上表达与野生型 IL-2 具有较低亲合力的 IL-2 β 和 γ 受体。在调节性 T 细胞(Treg)细胞和激活的效应细胞上表达与野生型 IL-2 具有高亲合力的 IL-2R α 。由于高亲合力的原因，野生型 IL-2 会优先结合细胞表面的 IL-2R α ，再招募 IL-2R $\beta\gamma$ ，通过 IL-2R $\beta\gamma$ 释放下游 p-STAT5 信号，刺激 Treg 细胞和激活的效应细胞。不受理论的束缚，改变 IL-2 对 IL-2R α 受体的亲合力，将改变 IL-2 优先激活 CD25⁺细胞的偏向性，改变 IL-2 介导的 Treg 细胞的免疫下调作用。

在一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白，相对于野生型 IL-2，具有保持或改变的 IL-2R α 受体结合能力。

在一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白，相对于野生型 IL-2，保持对 IL-2 R α 受体的结合。在本文中，表述“保持对 IL-2 R α 受体的结合”是指 IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2 蛋白与 IL-2 R α 受体具有相当的结合活性。优选地，“相当的结合活性”为，当采用相同的测量方式测定时，IL-2 突变蛋白与野生型 IL-2 蛋白的结合活性数值（例如结合亲和力 K_D）之间的比值在 1:20 至 20:1 之间，优选地，1:10 至 10:1 之间。优选地，IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2，不具有 IL-2R α 结合界面突变。

在一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白是弱化 IL-2 突变分子，且保持对 IL-2R α 受体的结合。在再一些实施方案中，本发明的弱化 IL-2 突变蛋白，相对于野生型 IL-2，不具有 IL-2R α 结合界面突变。优选地，所述弱化 IL-2 突变分子具有改善的 Treg 选择性和/或改善的 NK 细胞(例如，CD3⁺CD56⁺NK 细胞)选择性。在一个实施方案中，在 STAT5 磷酸化测定试验中，通过检测 IL-2 突变蛋白在不同淋巴细胞例如 Treg 细胞、NK 细胞、CD4⁺和 CD8⁺效应 T 细胞中对 STAT5 磷酸化信号的激活，来鉴定 IL-2 突变蛋白对淋巴细胞的选择性。在一个实施方案中，在 STAT5 磷酸化测定试验中，IL-2 突变蛋白的选择性可以通过选择性激活特定的(一种或多种)淋巴细胞而不实质性激活其它淋巴细胞的 IL-2 突变蛋白剂量窗口来反映。例如，在一些实施方案中，本发明的弱化 IL-2 突变蛋白可以表现出改善的 Treg 选择性和/或改善的 NK 细胞(CD3⁺CD56⁺NK 细胞)选择性，所述选择性相对于效应 T 细胞，例如 CD25^{-/low} CD4⁺和/或 CD8⁺效应 T 淋巴细胞而言。在再一些实施方案中，改善的选择性可以反映为 IL-2 突变蛋白的低药物相关毒性。

在另一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白，相对于野生型 IL-2，引入 IL-2R α 结合界面突变，所述突变导致 IL-2 突变蛋白具有降低或消除的 IL-2R α 受体结合。

在再一些实施方案中，本发明的该 IL-2 突变蛋白，相对于野生型 IL-2，降低 IL-2 优先激

活 CD25⁺细胞的偏向性。在再一些实施方案中，本发明的该 IL-2 突变蛋白，相对于野生型 IL-2，降低 IL-2 介导的 Treg 细胞的免疫下调作用。

在另一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白具有免疫下调作用。在再一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白可以用于自身免疫疾病的治疗。

因此，在一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白具有选自例如以下的一项或多项的改善性质：

- 与野生型 IL-2 相比，保持或改变(例如降低或增加)对高亲和力 IL-2R 受体(IL-2R $\alpha\beta\gamma$)的结合亲和力；

- 与野生型 IL-2 相比，保持或改变(例如降低或增加)对 CD25⁺ 细胞(例如 CD8⁺T 细胞和 Treg 细胞)的激活；

- 与野生型 IL-2 相比，保持或改变(例如去除或降低，或增加)IL-2 优先激活 CD25⁺ 细胞(例如 Treg 细胞)的偏向性；

- 与野生型 IL-2 相比，保持或改变(例如降低或增加)由 IL-2 诱导的经 Treg 细胞引起的免疫反应下调作用。

在一些实施方案中，相对于野生型 IL-2(例如 SEQ ID NO:1 中所示 IL-2^{WT})，本发明 IL-2 突变蛋白对 IL-2R α 受体的结合亲和力降低至少 5 倍、至少 10 倍、或至少 25 倍，尤其是至少 30 倍、50 倍或 100 倍以上。在优选的实施方案中，本发明的突变蛋白不结合 IL-2 受体 α 。可以通过 ForteBio 亲和测定技术，测定本发明 IL-2 突变蛋白，例如与 Fc 片段融合的本发明 IL-2 突变蛋白或其二聚体分子，与受体 IL-2R α 受体的平衡解离常数 (K_D) 来确定结合亲和力。

在一个实施方案中，相对于野生型 IL-2，本发明 IL-2 突变蛋白导致减少的由 IL-2 介导的 CD25⁺细胞激活和/或增殖。在一个实施方案中，CD25⁺细胞是 CD25⁺CD8⁺T 细胞。在另一实施方案中，CD25⁺细胞是 Treg 细胞。在一个实施方案中，在 STAT5 磷酸化测定试验中，通过检测 IL-2 突变蛋白在 CD25⁺细胞中对 STAT5 磷酸化信号的激活，来鉴定 IL-2 突变蛋白激活 CD25⁺细胞的能力。例如，如本申请实施例所述，可以通过流式细胞术分析细胞中的 STAT5 磷酸化，确定半最大有效浓度(EC50)。

在一个实施方案中，相对于野生型 IL-2，本发明 IL-2 突变蛋白去除或降低 IL-2 对 CD25⁺细胞优先激活的偏向性。在一个实施方案中，CD25⁺细胞是 CD25⁺CD8⁺T 细胞。在另一实施方案中，CD25⁺细胞是 Treg 细胞。在一个实施方案中，在 STAT5 磷酸化测定试验中，通过检测 IL-2 突变蛋白分别在 CD25⁻细胞中和在 CD25⁺细胞中激活 STAT5 磷酸化信号的 EC50 值，来鉴定 IL-2 突变蛋白激活 CD25⁻细胞的能力。例如，通过计算在 CD25⁻和 CD25⁺T 细胞上激活 STAT5 磷酸化信号的 EC50 值的比值，确定 IL-2 突变蛋白对 CD25⁺细胞的激活偏向性。优选地，相对于野生型蛋白，突变蛋白对 CD25⁺的偏向性降低了至少 10 倍，优选至少 100 倍，150 倍，200 倍，300 倍或更高。

本发明的突变蛋白

一方面，本发明提供一种 IL-2 突变蛋白，其中所述突变蛋白，与野生型 IL-2(优选人 IL-2，更优选包含 SEQ ID NO: 1 序列的 IL-2)相比，包含突变：

(i) 在 IL-2 与 IL-2R α 结合界面上, 尤其是在选自位置 35, 37, 38, 41, 42, 43, 45, 61, 68 和 72 的至少一个位置上, 具有消除或降低对 IL-2R α 受体的结合亲和力的突变;

和/或

(ii) 缩短的 B'C' 环区 (即, 连接氨基酸残基 aa72 和 aa84 的序列), 优选地, 所述缩短的环区具有小于 10, 9, 8, 7, 6, 或 5 个的氨基酸长度, 且优选 7 个氨基酸长度; 优选地, 所述缩短的 B'C' 环区导致改善的蛋白表达量和/或纯度,

且包含突变:

(iii) 在 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面上, 尤其是在选自位置 12, 15, 16, 19, 20, 84, 87, 88, 91, 92, 95, 126 的至少一个位置上, 具有弱化对 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合的突变;

其中氨基酸位置根据 SEQ ID NO: 1 编号,

优选地, 所述突变蛋白包含突变(i)和(iii) 或包含突变(ii)和(iii)或包含(i)、(ii)和(iii)。

IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变

适用于本发明突变蛋白的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变, 可以是任何能够与本发明其他突变组合并导致弱化的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合亲和力和/或弱化的淋巴细胞(例如 T 细胞/NK 细胞)激活活性的突变。

这样的突变的例子包括, 但不限于: 在 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面上, 尤其是在选自位置 12, 15, 16, 19, 20, 84, 87, 88, 91, 92, 95, 126 的至少一个位置上, 导致弱化的 IL-2R $\beta\gamma$ 受体结合的突变。

在一些实施方案中, IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变包含选自以下的突变:

L12R; L12K; L12E; L12Q; E15Q; E15R; E15A; E15S; H16N; H16T; H16Y; H16A; H16E; H16D; H16R; L19D; L19E; L19R; L19S; D20N; D20Q; D20E; D20A; D20R; D20S; D84N; D84E; D84Q; D84T; D84S; D84R; D84G; D84M; D84F; D84L; D84K; D84H; S87T; S87R; S87K; S87L; S87M; S87H; N88D; N88T; N88Q; N88R; N88E; N88K; N88H; N88M; N88S; N88L; V91I; V91L; V91D; V91E; V91N; V91Q; V91S; V91H; I92E; I92T; I92K; I92R; I92L; E95Q; E95G; E95D; E95N; Q126E; Q126D; Q126A; Q126S; D84N+E95Q; D84E+E95Q; D84T+E95Q; D84Q+E95Q ; D84T+H16T; D84N+V91I; D84T+Q126E; D84N+Q126E; H16T+D84Q; H16T+V91I。

在一些优选实施方案中, 所述 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变包含选自以下的突变:

D20N; D84E; D84N; D84N+E95Q; D84N+Q126E; D84N+V91I; D84Q; D84T; D84T+H16T; D84T+Q126E; E15Q; E95N; E95Q; H16N; H16N+D84N; H16T; H16T+D84Q; H16T+V91I; N88R; N88D; N88Q; N88T; Q126E; V91I。

在再一些优选实施方案中, 所述 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变包含

- 选自以下的突变: D84N; E95Q; H16N; 或

- 选自以下的突变: D84Q; H16T+V91I; 或

- 选自以下的突变: D84T; Q126E; D84N+V91I; D84N+E95Q; 或

- 选自以下的突变: N88D; N88R; D20N; D84N+E95Q; D84T+H16T; D84T+Q126E; D84N+Q126E; H16T+D84Q。

在再一些优选实施方案中，所述 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变包含选自以下的突变：D20N 或 N88D 或 N88R。

B'C' 环区突变

在一个方面，本发明的 IL-2 突变蛋白，相对于野生型 IL-2，包含 B'C' 环区突变，优选地所述突变导致稳定性增加的 B'C' 环区；更优选地，所述突变导致本发明 IL-2 突变蛋白具有改善的成药性，例如，增加的表达量和/或纯度。

在一些实施方案中，所引入的突变导致，与野生型 IL-2(优选人 IL-2，更优选包含 SEQ ID NO: 1 序列的 IL-2)相比，突变蛋白包含缩短的 B'C' 环区 (即，氨基酸残基 aa72 和 aa84 之间的连接序列长度缩短)。

优选地，所述缩短的环区具有小于 10，9，8，7，6 个或 5 个氨基酸长度，且优选 7 个氨基酸长度，其中氨基酸残基根据 SEQ ID NO: 1 编号。

在本文中，适用于本发明的 B'C' 环区突变包括 B'C' 环区的截短和替换。在一个实施方案中，所述突变包括 B'C' 环区氨基酸残基 aa73 至 aa83 的截短或替换，例如截短为 A(Q/G)SKN(F/I)H，或替换为 SGDASIH。在另一实施方案中，所述突变包括 B'C' 环区氨基酸残基 aa74 至 aa83 的截短或替换，例如截短为 (Q/G)SKN(F/I)H，或替换为 GDASIH。

在一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白包含 B'C' 环嵌合突变。相对于野生型 IL-2，所述突变蛋白包含对连接 aa72 至 aa84 的序列的全部或部分替代，例如替代为来自其它四螺旋短链细胞因子家族成员的短 B'C' 环序列。可以通过晶体结构的 superpose，从其它四螺旋短链细胞因子 IL 家族成员，例如 IL-15，IL-4，IL-21，或来自非人物种(如小鼠)的 IL 家族成员，鉴定适用于替代野生型 IL-2 的短 B'C' 环。在一个实施方案中，用于替代的序列为来自白介素 IL-15 (尤其是人 IL-15) 的 B'C' 环序列。在一个实施方案中，所述替代包括 B'C' 环区氨基酸残基 aa73 至 aa83 的替代。在另一实施方案中，所述替代包括 B'C' 环区氨基酸残基 aa74 至 aa83 的替代。优选地，经替代后，本发明 IL-2 突变蛋白具有选自以下的 B'C' 环序列(即，连接 aa72 至 aa84 的序列)：SGDASIH 或 AGDASIH。

在一些实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白包含 B'C' 环截短突变。相对于野生型 IL-2，所述突变蛋白包含对连接 aa72 至 aa84 的序列的截短。在一个实施方案中，所述截短包括 B'C' 环区氨基酸残基 aa73 至 aa83 的截短。在另一实施方案中，所述截短包括 B'C' 环区氨基酸残基 aa74 至 aa83 的截短。例如，可以自 C 端截短 1、2、3 或 4 个氨基酸。优选地，经截短后，本发明 IL-2 突变蛋白的 B'C' 环区具有序列 A(Q/G)SKN(F/I)H。优选地，经截短后，本发明 IL-2 突变蛋白具有选自以下的 B'C' 环序列(即，连接 aa72 至 aa84 的序列)：

B'C'loop 序列
AQSKNFH
AGSKNFH
AQSANFH
AQSANIH

在一个优选的实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白包含选自以下的 B'C' 环区序列(即，连接 aa72 至 aa84 的序列)：AQSKNFH 或 SGDASIH 或 AGDASIH。

关于适用于本发明的 B'C' 环突变，也可以参见本申请人的共同待决申请 PCT/CN2019/107054。该申请整体并入本文作为参考。

IL-2R α 结合界面突变

在一个方面，本发明的 IL-2 突变蛋白，相对于野生型 IL-2，在 IL-2R α 结合界面，优选地在位置 35, 37, 38, 41, 42, 43, 45, 61, 68 和 72 上，包含一个或多个突变。优选地，所述突变消除或降低对 IL-2R α 受体的结合亲和力。

在一些实施方案中，本发明的 IL-2R α 结合界面突变包含选自以下组合(1)-(9)之一的突变组合：

组合	突变
1	K35D/E+T37E/D+R38Y/W+F42N/Q+Y45R/K+E61R/K+E68K/R, 优选 K35D/E+T37E/D+R38W+F42Q+Y45R/K+E61R/K+E68K/R, 更优选 K35D/E+T37E/D+R38W+F42Q+Y45K+E61K+E68R
2	K35D/E+T37D/E+R38D/E+F42V/L/I/A, 优选 K35D/E+T37D/E+R38D/E+F42V/A, 更 优选 K35D/E+T37D/E+R38D/E+F42A
3	K35E/D+R38D/E+T41D/E+K43D/E, 优选地 K35E/D+R38D/E+T41E+K43E
4	K35E/D+T37D/E+R38E/D+K43F/Y+Y45R/K+L72Y/F, 更优选 K35E/D+T37D/E+R38E/D+K43Y+Y45K+L72F
5	K35D/E+R38D/E+T41D/E+K43F/Y+Y45R/K+L72Y/F, 更优选 K35D/E+R38D/E+T41D/E+K43Y+Y45K+L72F
6	K35E/D+T37D/E+R38E/D+T41D/E+K43D/E+L72Y/F, 更优选 K35E/D+T37D/E+R38E/D+T41D/E+K43D/E+L72F
7	K35E/D+T37D/E+R38E/D+K43D/E+L72Y/F, 更优选 K35E/D+T37D/E+R38E/D+K43D/E+L72F
8	K35D/E+T37E/D+R38E/D+K43D/E+L72Y/F, 更优选 K35D/E+T37E/D+R38E/D+K43D/E+L72F
9	K35D/E+R38E/D+T41D/E+K43D/E+E61R/K+L72Y/F, 更优选 K35D/E+R38E/D+T41D/E+K43D/E+E61K+L72F

在一些优选的实施方案中，本发明的 IL-2R α 结合界面突变包含突变组合 K35E+T37E+R38E+F42A，或由所述突变组合组成。

在另一些优选的实施方案中，本发明的 IL-2R α 结合界面突变包含突变组合 K35E+T37E+R38E，或由所述突变组合组成。

在另一些优选的实施方案中，本发明的 IL-2R α 结合界面突变包含突变组合 F42A，或由所述突变组成。

在另一些实施方案中，包含本发明的 IL-2R α 结合界面突变的本发明 IL-2 突变蛋白具有改变的 IL-2R α 结合，例如采用 ForteBio 亲和力测定，改变的 IL-2R α 结合。

关于适用于本发明的 IL-2R α 结合界面突变，也可以参见本申请人的共同待决申请 PCT/CN2019/107055。该申请整体并入本文作为参考。

优选的示例性突变组合

在一些优选实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白具有弱化的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合，且具有选自以下一项或全部两项的改善性质：(i)降低的(或消除的)IL-2R α 结合；和(ii)改善的表达水平和纯度。

在一些实施方案中，本发明提供 IL-2 突变蛋白，其中所述突变蛋白，相对于野生型 IL-2，包含：

(a) 突变组合 K35E+T37E+R38E+F42A；

(b) 选自以下的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变：

D20N；D84E；D84N；D84N+E95Q；D84N+Q126E；D84N+V91I；D84Q；D84T；
D84T+H16T；D84T+Q126E；E15Q；E95N；E95Q；H16N；H16N+D84N；H16T；H16T+D84Q；
H16T+V91I；N88D；N88R；N88Q；N88T；Q126E；V91I

以及任选地，(iv) 突变 T3A。

在一些实施方案中，本发明提供 IL-2 突变蛋白，其中所述突变蛋白，相对于野生型 IL-2，包含：

(a) 突变组合 K35E+T37E+R38E；

(b) 选自以下的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变：

D20N；D84E；D84N；D84N+E95Q；D84N+Q126E；D84N+V91I；D84Q；D84T；
D84T+H16T；D84T+Q126E；E15Q；E95N；E95Q；H16N；H16N+D84N；H16T；H16T+D84Q；
H16T+V91I；N88D；N88R；N88Q；N88T；Q126E；V91I

以及任选地，(iv) 突变 T3A。

在一些实施方案中，本发明提供 IL-2 突变蛋白，其中所述突变蛋白，相对于野生型 IL-2，包含：

(a) 突变组合 F42A；

(b) 选自以下的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变：

D20N；D84E；D84N；D84N+E95Q；D84N+Q126E；D84N+V91I；D84Q；D84T；
D84T+H16T；D84T+Q126E；E15Q；E95N；E95Q；H16N；H16N+D84N；H16T；H16T+D84Q；
H16T+V91I；N88D；N88R；N88Q；N88T；Q126E；V91I

以及任选地，(iv) 突变 T3A。

在一些实施方案中，本发明提供 IL-2 突变蛋白，其中所述突变蛋白，相对于野生型 IL-2，包含：

(a) B'C'环区序列 AQSKNFH；

(b) 选自以下的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变：

D20N；D84E；D84N；D84N+E95Q；D84N+Q126E；D84N+V91I；D84Q；D84T；
D84T+H16T；D84T+Q126E；E15Q；E95N；E95Q；H16N；H16N+D84N；H16T；H16T+D84Q；
H16T+V91I；N88D；N88R；N88Q；N88T；Q126E；V91I

以及任选地，(iv) 突变 T3A。优选地，所述 IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2 蛋白保持 IL-2R α 受体结合能力。

在一些实施方案中，本发明提供 IL-2 突变蛋白，其中所述突变蛋白，相对于野生型 IL-2，包含：

(a) B'C'环区序列 SGDASIH 或 AGDASIH；

(b) 选自以下的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变：

D20N; D84E; D84N; D84N+E95Q; D84N+Q126E; D84N+V91I; D84Q; D84T;
D84T+H16T; D84T+Q126E; E15Q; E95N; E95Q; H16N; H16N+D84N; H16T; H16T+D84Q;
H16T+V91I; N88D; N88R; N88Q; N88T; Q126E; V91I

以及任选地, (iv) 突变 T3A。优选地, 所述 IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2 蛋白保持 IL-2R α 受体结合。

在一些实施方案中, 本发明的 IL-2 突变蛋白, 相对于野生型 IL-2, 包含:

- (i) 突变组合 K35E+T37E+R38E+F42A、或突变组合 K35E+T37E+R38E、或突变 F42A;
- (ii) B'C'环区序列: AQSKNFH; 或 SGDASIH 或 AGDASIH;
- (iii) 选自以下的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变:

D20N; D84E; D84N; D84N+E95Q; D84N+Q126E; D84N+V91I; D84Q; D84T;
D84T+H16T; D84T+Q126E; E15Q; E95N; E95Q; H16N; H16N+D84N; H16T; H16T+D84Q;
H16T+V91I; N88D; N88R; N88Q; N88T; Q126E; V91I

以及任选地, (iv) 突变 T3A。

在一些实施方案中, 本发明的 IL-2 突变蛋白, 相对于野生型 IL-2, 包含:

- (i) 突变组合 K35E+T37E+R38E+F42A;
- (ii) B'C'环区序列: AQSKNFH;
- (iii) 选自以下的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变:

D20N; D84E; D84N; D84N+E95Q; D84N+Q126E; D84N+V91I; D84Q; D84T;
D84T+H16T; D84T+Q126E; E15Q; E95N; E95Q; H16N; H16N+D84N; H16T; H16T+D84Q;
H16T+V91I; N88D; N88R; N88Q; N88T; Q126E; V91I

以及任选地, (iv) 突变 T3A。

在一些实施方案中, 本发明的 IL-2 突变蛋白, 相对于野生型 IL-2, 包含:

- (i) 突变组合 K35E+T37E+R38E+F42A;
- (ii) B'C'环区序列: SGDASIH 或 AGDASIH;
- (iii) 选自以下的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变:

D20N; D84E; D84N; D84N+E95Q; D84N+Q126E; D84N+V91I; D84Q; D84T;
D84T+H16T; D84T+Q126E; E15Q; E95N; E95Q; H16N; H16N+D84N; H16T; H16T+D84Q;
H16T+V91I; N88D; N88R; N88Q; N88T; Q126E; V91I

以及任选地, (iv) 突变 T3A。

在一些实施方案中, 本发明的 IL-2 突变蛋白, 相对于野生型 IL-2, 包含:

- (i) **突变组合 K35E+T37E+R38E;**
- (ii) B'C'环区序列: AQSKNFH;
- (iii) 选自以下的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变:

D20N; D84E; D84N; D84N+E95Q; D84N+Q126E; D84N+V91I; D84Q; D84T;
D84T+H16T; D84T+Q126E; E15Q; E95N; E95Q; H16N; H16N+D84N; H16T; H16T+D84Q;
H16T+V91I; N88D; N88R; N88Q; N88T; Q126E; V91I

以及任选地, (iv) 突变 T3A。

在一些实施方案中, 本发明的 IL-2 突变蛋白, 相对于野生型 IL-2, 包含:

- (i) **突变组合 K35E+T37E+R38E;**
- (ii) B'C'环区序列 SGDASIH 或 AGDASIH;
- (iii) 选自以下的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变:

D20N; D84E; D84N; D84N+E95Q; D84N+Q126E; D84N+V91I; D84Q; D84T;
D84T+H16T; D84T+Q126E; E15Q; E95N; E95Q; H16N; H16N+D84N; H16T; H16T+D84Q;
H16T+V91I; N88D; N88R; N88Q; N88T; Q126E; V91I

以及任选地, (iv) 突变 T3A。

在一些优选实施方案中, 本发明的 IL-2 突变蛋白, 相对于野生型 IL-2, 包含:

(i) **突变组合 K35E+T37E+R38E+F42A;**

(ii) B'C'环区序列 SGDASIH 或 AGDASIH;

(iii) IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变: D84N 或 D84N+E95Q;

以及任选地, (iv) 突变 T3A。更优选地, 本发明的 IL-2 突变蛋白, 相对于野生型 IL-2, 包含: (i) **突变组合 K35E+T37E+R38E+F42A;** (ii) B'C'环区序列 AGDASIH; (iii) IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变: D84N+E95Q。

在再一些优选实施方案中, 本发明的 IL-2 突变蛋白, 相对于野生型 IL-2 蛋白, 保持对 IL-2R α 受体的结合, 且包含:

(i) B'C'环区序列 AQSKNFH; SGDASIH 或 AGDASIH;

(ii) 选自以下的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变: D20N, N88R, 和 N88D;

以及任选地(iii)突变 T3A。优选地, IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2, 不具有 IL-2R α 结合界面突变。

在另一些优选实施方案中, 本发明的 IL-2 突变蛋白, 相对于野生型 IL-2 蛋白, 保持对 IL-2R α 受体的结合, 且包含:

(i) B'C'环区序列 SGDASIH 或 AGDASIH;

(ii) IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变: D20N, 或 N88R, 或 N88D;

以及任选地(iii)突变 T3A。优选地, IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2, 不具有 IL-2R α 结合界面突变。

在另一些优选实施方案中, 本发明的 IL-2 突变蛋白, 相对于野生型 IL-2 蛋白, 保持对 IL-2R α 受体的结合, 且包含:

(i) B'C'环区序列 AGDASIH;

(ii) IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变: D20N, 或 N88R, 或 N88D;

以及任选地(iii)突变 T3A。优选地, IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2, 不具有 IL-2R α 结合界面突变。

在再一些优选实施方案中, 本发明的 IL-2 突变蛋白, 相对于野生型 IL-2(例如 SEQ ID NO: 1) 对 IL-2R α 受体的结合; 且包含:

(i) B'C'环区序列 AGDASIH;

(ii) IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变: N88R;

以及 (iii)突变 T3A。优选地, IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2, 不具有 IL-2R α 结合界面突变。在一个实施实施方案中, 本发明的 IL-2 突变蛋白在氨基酸序列上与 SEQ ID NO: 1-3 之一中所列出的野生型 IL-2 蛋白的成熟区具有至少 85% 或 90% 同一性的成熟区。

在一些优选实施方案中, 本发明的 IL-2 突变蛋白包含, 与选自 SEQ ID NO: 37-638 (尤其是 SEQ ID NO: 469-553 或 554-638, 优选地 SEQ ID NO: 148 或 197, 更优选地 SEQ ID NO: 489, 513、516) 之一的氨基酸序列具有至少 90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、或

98%、99%的同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述突变蛋白包含选自 SEQ ID NO: 37-638 的氨基酸序列或由其组成。在一些优选实施方案中，所述突变蛋白包含选自 SEQ ID NO: 469-553 或 554-638，优选地 SEQ ID NO: 148 或 197，更优选地 SEQ ID NO: 489, 513、516 的氨基酸序列或由其组成。

其它突变

除了上述“IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变”、“B'C'环区突变”和“IL-2R α 结合界面突变”，本发明的 IL-2 突变蛋白还可以在其它区域或位置上具有 1 个或多个突变，只要其保留本发明 IL-2 突变蛋白的上述一个或多个有益性质即可。例如，本发明 IL-2 突变蛋白还可以包含在位置 125 的取代，例如 C125S, C125A, C125T, 或 C125V，以提供额外的优点，例如改善的表达或同质性或稳定性(参见例如，美国专利号 4,518,584)。再例如，本发明 IL-2 突变蛋白还可以包含在位置 3 的取代，例如 T3A，以去除 IL2N 末端的 O 糖修饰。本领域技术人员知晓如何确定可以并入本发明 IL-2 突变蛋白中的额外突变。

IL-2 突变蛋白与野生型蛋白之间的序列差异性可以用序列同一性表述，也可以用两者之间差异氨基酸的数量来表达。在一个实施方案中，IL-2 突变蛋白与野生型蛋白之间具有至少 85%，86%，87%，88%，89%同一性，优选 90%以上同一性，优选 95%，但优选不超过 97%，更优选不超过 96%同一性。在另一实施方案中，除了本发明的上述三种突变外，IL-2 突变蛋白与野生型蛋白之间还可以具有不超过 15 个，例如 1-10 个，或 1-5 个突变，例如，0, 1, 2, 3, 4 个突变。在一个实施方案中，所述其余突变可以是保守取代。

2. 融合蛋白和 IL-2-Fc 二聚体蛋白

在一个方面，本发明还提供包含本发明 IL-2 突变蛋白的融合蛋白。在一个优选的实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白与可以赋予改善的药代动力学性质的另一多肽融合，例如清蛋白，更优选抗体 Fc 片段。

在一个实施方案中，本发明提供 IL-2 突变蛋白融合蛋白，其包含与抗体 Fc 片段融合的本发明 IL-2 突变蛋白。

用于本发明的 Fc 片段可以包含减小或去除效应子功能的突变。在一个优选的实施方案中，Fc 片段具有减少的由 Fc 区介导的效应子功能，例如减少的或消除的 ADCC 或 ADCP 或 CDC 效应子功能。例如，在一些特别的实施方案中，用于本发明的 Fc 片段具有降低与 Fc γ 受体结合的 L234A/L235A 突变或 L234A/L235E/G237A。

在再一优选的实施方案中，Fc 片段可以具有导致增加的血清半衰期的突变，例如改善 Fc 片段与 FcRn 结合的突变。

在一些实施方案中，与 IL-2 突变蛋白融合的 Fc 片段为人的 IgG Fc，例如，人 IgG1 Fc，人 IgG2 Fc，或人 IgG4 Fc。在一个实施方案中，Fc 片段包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 12 或与其具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性。

在一些实施方案中，IL-2 突变蛋白通过接头与 Fc 融合。在一些实施方案中，可以选择接头以提高 Fc 融合蛋白对于 CD25⁺T 细胞的激活作用。在一个实施方案中，接头是 GSGS，更优选为 (G4S)₂。

在再一方面,本发明也提供包含与Fc片段融合的本发明IL-2突变蛋白的二聚体分子。这样的二聚体分子将分子量提高到60-80KDa,极大地减小了肾清除,而且通过FcRn介导的体内循环回收,能进一步的延长IL2-Fc融合蛋白的半衰期。优选地,所述二聚体分子,相比于包含野生型IL-2-Fc融合蛋白的相应二聚体分子,具有以下特性之一或多项:

- 在哺乳动物细胞(例如CHO或HEK293细胞)中表达时,表达量和/或纯度增加;
- 降低或避免因IL-2导致的淋巴细胞过度激活和/或炎症因子释放;
- 更优的药代动力学性质,例如延迟的体内半衰期;
- 体内施用低毒性,例如低的心血管系统毒性(例如低的血管渗漏副作用)。

优选地,本发明IL-2突变蛋白的二聚体分子在动物中施用,表现出良好的抗肿瘤效果和耐受性。抗肿瘤效果可以通过实施例所述的荷瘤动物实验中测定抑瘤率来确定。耐受性可以通过实施例所述检测给药后动物模型的体重及其体重变化情况来确定。

在一些实施方案中,本发明提供IL-2-Fc二聚体蛋白,其是同二聚体,其中第一单体和第二单体分别由自N端到C端包含:i)IL-2突变蛋白;ii)接头;和iii)Fc片段。

在另一些实施方案中,本发明提供IL-2-Fc二聚体蛋白,其是异二聚体,包含:

- a)第一单体,其中所述第一单体自N端到C端包含:i)IL-2突变蛋白;ii)接头;和iii)第一Fc片段;和
- b)第二单体,其中所述第二单体包含第二Fc片段。

在一些实施方案中,第一Fc片段和第二Fc片段分别包含促进第一单体与第二单体形成异二聚体的第一和第二异二聚化突变。在一些优选实施方案中,第一和第二异二聚化突变包含Knob:Hole突变组合,例如突变组合T366W/S354C:Y349C/T366S/L368A/Y407V。

在一些优选实施方案中,第一Fc片段上的第一异二聚体突变包含Knob突变,第二Fc片段的第二异二聚体突变包含Hole突变;或者,第一Fc片段上的第一异二聚体突变包含Hole突变,第二Fc片段的第二异二聚体突变包含Knob突变。

如本领域技术人员理解的,适用于本发明融合蛋白和二聚体分子的Fc片段可以是任何抗体Fc片段。在一个实施方案中,本发明的Fc片段是效应物功能沉默的。

在一个实施方案中,在一个或多个选自以下的特性上修饰Fc片段:Fc区的效应子功能和Fc区的补体激活功能。在一个实施方案中,所述效应子功能或补体激活功能相对于相同同种型的野生型Fc区已经被降低或消除。在一个实施方案中,通过选自以下的方法来降低或消除效应子功能:降低Fc区的糖基化、使用天然具有降低或消除的效应子功能的Fc同种型、和Fc区修饰。

在一个实施方案中,通过降低Fc区的糖基化来降低或消除效应子功能。在一个实施方案中,通过选自以下的方法来降低Fc区的糖基化:在不允许野生型糖基化的环境中生产本发明的融合蛋白或二聚体分子;除去Fc区上已经存在的碳水化合物基团;和修饰Fc区使得不发生野生型糖基化。在一个实施方案中,通过修饰使得不发生野生型糖基化的方法来降低Fc区的糖基化,如在Fc区的位置297包含突变,使得该位置的野生型天冬酰胺残基被另一个干扰该位置糖基化的氨基酸替代,例如N297A突变。

在一个实施方案中,通过至少一个Fc区修饰来降低或消除效应子功能。在一个实施方案中,至少一个Fc区修饰选自:选自以下位置的、损害与一个或多个Fc受体的结合的Fc区点突变:238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、297、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438和439;选自以下位置的损害C1q结

合的 Fc 区点突变：270、322、329 和 321；以及 CH1 结构域的位置 132 的点突变。在一个实施方案中，所述修饰是选自以下位置的损害 Clq 结合的 Fc 区点突变：270、322、329 和 321。在另一个实施方案中，所述修饰是消除一些 Fc 区。

如本领域技术人员理解的，为了促进本发明的异二聚体形成，本发明二聚体分子的 Fc 片段可以包含利于第一单体与第二单体二聚化的突变。优选地，基于 Knob-in-Hole 技术，在第一单体和第二单体中引入相应的 Knob 突变和 Hole 突变。

因此，在一个实施方案中，本发明的二聚体分子包含：

- i) 任选具有突变 P329G、L234A 和 L235A 的、人 IgG1 亚类的同二聚 Fc-区，或
- ii) 任选具有突变 P329G、S228P 和 L235E 的、人 IgG4 亚类的同二聚 Fc-区，或
- iii) 异二聚 Fc-区，其中
 - a) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A 和 Y407V，或
 - b) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W 和 Y349C，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 S354C，或
 - c) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W 和 S354C，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C，

或

- iv) 人 IgG4 亚类的异二聚 Fc-区，其中两个 Fc-区多肽都包含突变 P329G、L234A 和 L235A，
且

- a) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A 和 Y407V，或
- b) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W 和 Y349C，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 S354C，或
- c) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W 和 S354C，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C，

或

- v) 人 IgG4 亚类的异二聚 Fc-区，其中两个 Fc-区多肽都包含突变 P329G、S228P 和 L235E，
且

- a) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A 和 Y407V，或
- b) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W 和 Y349C，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 S354C，或
- c) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W 和 S354C，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C。

在一些实施方案中，Fc 区还包含其他利于异二聚体纯化的突变。例如，可以将 H435R 突变 (Eric J. Smith, Scientific Reports | 5:17943 | DOI: 10.1038/srep17943) 引入异二聚体的 Fc 区

之一中（例如，带 Hole 突变的 Fc 区），以利于使用蛋白 A 纯化异二聚体。在另一些实施方案中，对于包含铰链区的异二聚体单体，也可以在铰链区中引入突变，例如 C220S，以利于异二聚体的形成。

如本领域技术人员明了的，适用于本发明融合蛋白和二聚体分子中连接 IL-2 突变蛋白和 Fc 片段的接头可以是本领域已知的任何接头。在一些实施方案中，接头可以包含 IgG1 铰链，或可以包含选自以下的接头序列：(GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGGS)_n, and (GGGS)_n，其中 n 是至少 1 的整数。优选地，接头包含(G4S)₂，即 GGGGSGGGGS。

因此，在一个优选实施方案中，本发明二聚体中的每个单体均包含在 C 端通过接头(G4S)₂ 连接 SEQ ID NO: 12 氨基酸序列的、选自 SEQ ID NO: 37-638（尤其是 SEQ ID NO: 469-553 或 554-638，优选地 SEQ ID NO: 489, 513、516）的 IL-2 突变蛋白。在一些优选实施方案中，二聚体分子的第一单体包含在 C 端通过接头(G4S)₂ 连接 SEQ ID NO: 9 氨基酸序列的、选自 SEQ ID NO: 37-638（尤其是 SEQ ID NO: 469-553 或 554-638，优选地 SEQ ID NO: 489, 513、516）的 IL-2 突变蛋白；且第二单体包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列。

3. 免疫缀合物

本发明还提供免疫缀合物，其包含本发明的 IL2 突变蛋白和抗原结合分子。优选地，抗原结合分子是免疫球蛋白分子，特别是 IgG 分子，或抗体或抗体片段，特别是 Fab 分子和 scFv 分子。在一些实施方案中，所述抗原结合分子特异性结合肿瘤细胞上或肿瘤环境中呈现的抗原，例如选自以下的抗原：成纤维细胞活化蛋白(FAP)、生腱蛋白 C 的 A1 域(TNC A1)、生腱蛋白 C 的 A2 域(TNC A2)、纤连蛋白的外域 B(Extra Domain B,EDB)、癌胚抗原(CEA)、和黑素瘤有关的硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP)。由此，本发明免疫缀合物在施用于受试者体内后可以靶向肿瘤细胞或肿瘤环境，从而提供进一步的治疗益处，例如以更低的剂量进行治疗的可行性和由此带来的低副作用；增强的抗肿瘤效应等。

在本发明的免疫缀合物中，本发明 IL-2 突变蛋白可以直接或通过接头与另一分子或抗原结合分子连接，且在一些实施方案中，在两者之间包含蛋白水解切割位点。

4. 多核苷酸、载体和宿主

本发明提供编码以上任何 IL-2 突变蛋白或融合蛋白或二聚体分子或缀合物的核酸。可以采用本领域熟知的方法，通过从头固相 DNA 合成或通过 PCR 诱变编码野生型 IL-2 的现有序列，产生编码本发明突变蛋白的多核苷酸序列。此外，本发明的多核苷酸和核酸可以包含编码分泌信号肽的区段，并与编码本发明突变蛋白的区段可操作连接，从而可以指导本发明突变蛋白的分泌性表达。

本发明也提供包含本发明核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在优选的实施方案中，本发明的表达载体是 pYDO_017 表达载体。

本发明也提供包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。适用于复制并支持突变 IL-2 蛋白或融合物或二聚体或免疫缀合物表达的宿主细胞是本领域中公知的。可以用特定的表达载体转染或转导这类细胞，并且可以生长大量的含载体细胞以用于接种大规模发酵罐，从而获得充

足量的 IL-2 突变体或融合物或二聚体或免疫缀合物用于临床应用。在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞或 293 细胞)。可用的哺乳动物宿主细胞系的例子是由 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)；人胚胎肾系(293 或 293T 细胞，如例如记载于 Graham 等, JGen Virol 36, 59(1977))、幼仓鼠肾细胞(BHK)、小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4 细胞，如例如记载于 Mather, Biol Reprod 23, 243-251(1980))、猴肾细胞(CV1)、非洲绿猴肾细胞(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(HepG2)、小鼠乳房肿瘤细胞(MMT060562)、TRI 细胞(如例如记载于 Mather 等, Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68(1982))、MRC5 细胞和 FS4 细胞。其它可用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞，包括 dhfr-CHO 细胞(Urlaub 等, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216(1980))；和骨髓瘤细胞系如 YO、NS0、P3X63 和 Sp2/0。在一个实施方案中，宿主细胞是真核生物细胞，优选为哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚胎肾(HEK)细胞或淋巴细胞(例如 YO、NS0、Sp20 细胞)。

5. 制备方法

再一方面，本发明提供制备本发明 IL-2 突变蛋白或融合物或二聚体或缀合物的方法，其中所述方法包括，在适合 IL-2 突变蛋白或融合物或二聚体或缀合物表达的条件下，培养包含编码所述蛋白或融合物或二聚体或缀合物的核酸的宿主细胞，如上文所提供的，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述蛋白或融合物或二聚体或缀合物。

6. 测定法

可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供 IL-2 突变蛋白进行鉴定，筛选，或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

一方面，可以对本发明的 IL-2 突变蛋白，测试其与 IL-2 受体的结合活性。例如，可以通过本领域已知的方法，诸如 ELISA，Western 印迹等，或本文实施例公开的例示性方法，来测定与人 IL-2R α 或 β 蛋白或 IL-2R $\beta\gamma$ 或 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 的结合。例如，可以使用流式细胞术进行测定，其中使经转染在细胞表面上表达突变蛋白的细胞例如酵母展示细胞，与标记的(例如生物素标记的)IL-2R α 或 β 蛋白或 IL-2R $\beta\gamma$ 或 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 复合物进行反应。备选地，突变蛋白与受体的结合，包括结合动力学(例如 K_D 值)，可以使用 IL-2-Fc 融合物或二聚体分子形式，在 ForteBio 测定法中测定。

再一方面，可以通过测定在受体结合下游发生的信号传导和/或免疫激活效应。来间接测量 IL-2 突变蛋白结合 IL-2 受体的能力。

因此，在一些实施方案中，提供了用于鉴定具有生物学活性的突变 IL-2 蛋白的测定法。生物学活性可以包括，例如诱导具有 IL-2 受体的 T 和/或 NK 细胞和/或 Treg 细胞增殖的能力、诱导具有 IL-2 受体的 T 和/或 NK 细胞和/或 Treg 细胞中 IL-2 信号传导的能力、降低的诱导 T 细胞中细胞凋亡的能力、诱导肿瘤消退和/或改善存活的能力、和降低的体内毒性性质，例如降低的血管通透性。本发明也提供体内和/或体外具有这类生物学活性的突变 IL-2 蛋白、其 Fc 融合物和包含其二聚体分子。

本领域中公知多种方法可以用于测定 IL-2 的生物学活性。例如，用于测试本发明 IL-2 突变蛋白(例如以二聚体分子形式)刺激 NK 细胞生成 IFN- γ 的能力的合适测定法，可以包括

如下步骤：将培养的NK细胞与本发明的突变IL-2蛋白温育，并随后通过ELISA测量培养基中的IFN- γ 浓度。IL-2信号传导诱导数个信号传导途径，并且牵涉JAK(Janus激酶)和STAT(信号转导物和转录的激活剂)信号传导分子。

IL-2与受体 β 和 γ 亚基的相互作用导致受体以及JAK1和JAK3(分别与 β 和 γ 亚基结合)的磷酸化。然后，STAT5与磷酸化受体结合，并自身在非常重要的酪氨酸残基上磷酸化。这导致STAT5从受体解离、STAT5二聚化以及STAT5二聚体移位至细胞核，在该处它们促进靶基因的转录。由此，可以例如通过测量STAT5的磷酸化，评估突变体IL-2多肽经由IL-2受体诱导信号传导的能力。此方法的详情已经披露在实施例1中。例如，可以将PBMC用本发明的突变体IL-2多肽或融合物或二聚体或免疫缀合物处理，并通过流式细胞术测定磷酸化STAT5的水平。

再有，可以在多种本领域中已知的动物肿瘤模型中评估突变的IL-2对肿瘤生长和存活的影响。例如，可以将癌症细胞系的异种移植物植入免疫缺陷型小鼠，并用本发明的突变体IL-2多肽或融合物或二聚体或免疫缀合物处理。可以基于肿瘤抑制率(例如，相对于同种型对照抗体计算)，检测本发明的突变体IL-2多肽、融合物、二聚体分子和免疫缀合物的体内抗肿瘤效应。此外，可以基于动物的体重变化(例如，相对于给药前，绝对体重的变化或体重变化百分比)来测定本发明的突变体IL-2多肽、融合物、二聚体分子和免疫缀合物在体内的毒性。也可以基于死亡率、生命期观察(不良作用的可见症状，例如行为、体重、体温)以及临床和解剖病理学(例如测量血液化学值和/或组织病理学分析)来测定所述体内毒性。

再一方面，可以通过本领域已知的方法，表征本发明突变蛋白的成药性能，例如，表达量和产品的纯度。对于表达量的测定，当突变蛋白自培养细胞中分泌达到培养上清液中时，可以对离心收集的细胞培养液进行蛋白含量的测定。或者，可以在对收集的细胞培养液进行一个步骤的纯化后，例如在一步亲和层析纯化后，进行测定。对于产品纯度的测定，可以在对收获的生产细胞的培养上清液实施一步亲和层析纯化后，进行纯度确定，以检测突变蛋白的纯化性能。优选地，本发明突变蛋白，按照此一步亲和层析纯化后，具有显著优于野生型蛋白的纯度，表明本发明突变蛋白具有更好的纯化性能。纯度确定方法可以是本领域已知的任何常规方法，包括但不限于，SEC-HPLC法。

再一方面，可以通过本领域已知的方法，表征本发明突变蛋白、融合物和二聚体分子的药代动力学性质，例如半衰期。

7. IL-2蛋白改造方法

在一方面，本发明提供用于获得具有改善性质的IL-2突变蛋白的方法和由此方法获得的IL-2突变蛋白。

在一个实施方案中，本发明的方法包括如下步骤：

(1) 在IL-2的B'C'环区通过突变以缩短该环区序列，以及任选地在IL-2与IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面引入一个或多个突变和/或在IL-2与IL-2Ra的结合界面引入一个或多个突变，

(2) 在哺乳动物细胞(例如HEK293或者CHO细胞)中表达IL-2突变蛋白，例如以Fc融合物形式(例如FcLALA融合物)。

在再一实施方案中，本发明的方法包括如下步骤：

(1) 在IL-2与IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面引入一个或多个突变，以及任选地在IL-2的B'C'环区通

过突变以缩短该环区序列和/或在 IL-2 与 IL-2Ra 的结合界面引入一个或多个突变，优选地在实施方案中，不在 IL-2 与 IL-2Ra 的结合界面引入突变，

(2) 在哺乳动物细胞(例如 HEK293 或者 CHO 细胞)中表达 IL-2 突变蛋白，例如以 Fc 融合物形式(例如 FcLALA 融合物)。

在上述任何实施方案中，优选地，所述缩短的环区具有小于 10, 9, 8, 7, 6, 或 5 个的氨基酸长度，且优选 7 个氨基酸长度，

更优选地所述 B'C'环区突变包括：

(a) 对 B'C'环区的 aa74 至 aa83 的替代，例如替代为来自四螺旋短链细胞因子 IL 家族成员的短 B'C'环序列，如 IL15 的 B'C'环序列，优选地替代为序列 GDASIH；或

(b) 对 B'C'环区的 aa74 至 aa83 的截短，例如自 C 端截短 1、2、3 或 4 个氨基酸；优选地截短为序列(Q/G)SKN(F/I)H，更优选地，截短为选自以下的序列：

B'C'loop 序列
QSKNFH
GSKNFH
QSANFH
QSANIH

优选地，所述 IL-2R β γ 结合界面突变包括前面描述的 IL-2R β γ 结合界面突变；

优选地，所述 IL-2R α 结合界面突变包括前面描述的 IL-2R α 结合界面突变；

优选地，所述突变蛋白具有如下改善的性质：(i)改善的表达量和/或蛋白纯度 (例如，通过 SEC-HPLC 检测，一步亲和层析后的纯度)；和任选地(ii) 弱化的 IL2R β 结合和/或(iii)改变的 IL-2Ra 结合。

在一个实施方案中，本发明的方法还包括步骤：在步骤(1)和(2)后，鉴定突变蛋白的如下性质：(i) 表达量和/或纯化后的蛋白纯度 (例如，通过 SEC-HPLC 检测，一步亲和层析后的纯度)；和任选地(ii) 弱化的 IL2R β 结合，和/或(iii) 改变的 IL2R α 结合。在再一实施方案中，本发明的方法还包括步骤：在步骤(1)和(2)后，鉴定突变蛋白的如下性质：(i) 表达量和/或纯化后的蛋白纯度 (例如，通过 SEC-HPLC 检测，一步亲和层析后的纯度)；和 (ii) 弱化的 IL2R β 结合，且优选地保持的 IL2R α 结合。

在一个实施方案中，所述方法包括：在进行步骤(1)的突变组合之前，鉴定改善成药性(例如表达量和/或产品稳定性和/或同质性，例如一步 Fc 亲和层析纯度)的 IL-2 突变。在一个优选实施方案中，通过将 B'C'loop 环替代为或截短为缩短的 B'C'loop 环，来改善突变蛋白的成药性。

在一个实施方案中，所述方法包括：在进行步骤(1)的突变组合之前，鉴定相对于野生型 IL-2，赋予弱化的 IL2R β 结合和/或改变的 IL-2Ra 结合能力的 IL-2R β γ 结合界面突变和/或 IL-2R α 结合界面突变。

如本领域技术人员明了，可以将这些突变与赋予进一步改善成药性或其它改良性质的突变组合，以获得具有多重改良性质的 IL-2 突变蛋白。

在一个实施方案中，将(例如已知的)导致弱化的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变，与(例如已知的)改善成药性的 B'C' 环区突变，组合引入 IL-2 蛋白中，进行性质鉴定。在一个优选实施方案中，所述鉴定包括相对于野生型 IL-2，弱化的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合和改善的成药性(例如改善的表达和/或纯度、和/或产品稳定性和/或同质性)，任选地基本不变的或弱化的或增强的 IL-2R α 结合亲和力。

在一些实施方案中，用作突变模板的亲本野生型 IL-2 蛋白优选与 SEQ ID NO: 1 具有至少 85%，或至少 90%或 95%的同一性，更优选地为来源人的 IL-2 蛋白。

8. 药物组合物和药物制剂

本发明还包括包含 IL-2 突变蛋白或其融合物或二聚体分子或免疫缀合物的组合物(包括药物组合物或药物制剂)和包含编码 IL-2 突变蛋白或其融合物或二聚体分子或免疫缀合物的多核苷酸的组合物。这些组合物还可以任选地包含合适的药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。

9. 组合产品

在一方面，本发明还提供了组合产品，其包含本发明的突变蛋白或其融合物或二聚体分子或免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂(例如化疗剂、其他抗体、细胞毒性剂、疫苗、抗感染活性剂等)。本发明的组合产品可用于本发明的治疗方法中。

在一些实施方案中，本发明提供组合产品，其中所述其它治疗剂为例如有效刺激免疫反应从而进一步增强、刺激或上调受试者的免疫反应的治疗剂如抗体。

在一些实施方案中，所述组合产品用于预防或治疗癌症。在一些实施方案中，癌症为，例如胃肠道癌症，例如直肠癌、结肠癌、结肠直肠癌。在一些实施方案中，所述组合产品用于预防或治疗感染，例如细菌感染、病毒感染、真菌感染、原生动物感染等。

10. 治疗方法和用途

在本文中，术语“个体”或“受试者”可互换地使用，是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如，奶牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类(例如，人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。特别地，受试者是人。

在本文中，术语“治疗”指意欲改变正在接受治疗的个体中疾病之天然过程的临床介入。想要的治疗效果包括但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态，以及缓解或改善预后。

在一方面中，本发明提供刺激受试者免疫系统的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的包含本发明 IL-2 突变蛋白或融合物或二聚体分子或免疫缀合物的药物组合物。

本发明的弱化 IL-2-Fc 分子可以有效避免对淋巴细胞的强激动造成的炎症因子的过度释放，具有更加平稳长效的药代特性。因此，在一个实施方案中，可以用较低的单次给药剂量来达到足够高的人体药物暴露量，以避免 C_{max} 过高导致的药物相关毒性。

因此，在一些实施方案中，本发明涉及在受试者中增强机体的免疫应答的方法，所述方

法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何 IL-2 突变蛋白、或其融合物或免疫缀合物。在一些实施方案，将本发明的 IL-2 突变蛋白或其融合物或免疫缀合物施用于携带肿瘤的受试者，刺激抗肿瘤免疫应答。在另一些实施方案中，将本发明的抗体或其抗原结合部分施用于携带感染的受试者，刺激抗感染免疫应答。

在另一方面中，本发明涉及治疗受试者疾病，如癌症的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何 IL-2 突变蛋白、或其融合物或免疫缀合物。癌症可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌。在一些实施方案中，癌症可以是例如胃肠道癌症，例如直肠癌、结肠癌、结肠直肠癌。

在另一方面中，本发明涉及治疗受试者感染性疾病，例如慢性感染的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何 IL-2 突变蛋白或其片段，或包含所述抗体或片段的免疫缀合物、多特异性抗体，或药物组合物。在一个实施方案中，所述感染是病毒感染。

在另一方面，本发明涉及在受试者中治疗 Treg 调节相关疾病，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何 IL-2 突变蛋白或其片段，或包含所述抗体或片段的免疫缀合物、多特异性抗体，或药物组合物。在一个实施方案中，所述疾病与 IL-2 介导的经由 Treg 细胞的免疫下调相关。在一个实施方案中，所述疾病是自身免疫性疾病。

本发明的突变蛋白(以及包含其的药物组合物或其融合物或二聚体分子或免疫缀合物，和任选地另外的治疗剂)可以通过任何合适的方法给药，包括肠胃外给药，肺内给药和鼻内给药，并且，如果局部治疗需要，病灶内给药。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。在一定程度上根据用药是短期或长期性而定，可通过任何适合途径，例如通过注射，例如静脉内或皮下注射用药。本文中涵盖各种用药时程，包括，但不限于，单次给药或在多个时间点多次给药、推注给药及脉冲输注。

为了预防或治疗疾病，本发明突变蛋白的合适剂量(当单独或与一种或多种其他的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和进程、以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述抗体的应答，和主治医师的判断力。所述抗体以一次治疗或经过一系列治疗合适地施用于患者。

再一方面，本发明也提供本发明 IL-2 突变蛋白、组合物、免疫缀合物、融合物、二聚体分子在制备用于前述方法(例如用于治疗)的药物中的用途。

描述以下实施例以辅助对本发明的理解。不意在且不应当以任何方式将实施例解释成限制本发明的保护范围。

实施例**实施例 1: 白细胞介素 2 的 IL-2R α 结合界面突变体设计和构建****白细胞介素 2 突变文库设计和构建****突变文库设计**

根据白细胞介素 2 (Interleukin-2, 简称 IL-2) 与其 α 受体 CD25 (简称 IL-2R α) 复合物的晶体结构 (PDB:1Z92) (如图 1 所示), 列出相互作用位点的 IL-2 残基按表 1 突变。野生型 IL-2 (uniprot:P60568, aa21-153, C125S, 简称 IL-2^{WT}) 作为突变文库构建的模板。按照各位点原始氨基酸占 50% 比例, 其余 50% 比例由表 1 中“突变氨基酸”均分, 设计并产生针对 IL-2 与 IL-2R α 的相互结合位点的基于酵母的 IL-2^{mutant} 展示文库, 文库命名为 IBYDL029 (Innoventbio Yeast Display Library)。采用流式细胞术 FACS, 从文库中筛选不与 IL-2R α 结合的 IL-2 突变体。

表 1. IBYDL029 文库突变位点表

位点	氨基酸残基	突变氨基酸	多样性
35	Lys(K)	D,E	3
37	Thr(T)	D,E,R,K,F,Y,W	8
38	Arg(R)	D,E,F,Y,W,A,V	8
41	Thr(T)	K,R,M,F,Y,W,Q,E	9
42	Phe(F)	K,R,A,E,Q	6
43	Lys(K)	E,D,F,Y,W	6
45	Tyr(Y)	R,K	3
61	Glu(E)	R,K,W,Y,L	6
62	Glu(E)	R,K,W,Y,L	6
68	Glu(E)	R,K,W,Y	5
72	Leu(L)	R,K,F,Y,W	6

IL-2^{WT} 的序列在本申请中显示于 SEQ ID NO: 1 中, 在该序列的 125 位引入了 C125S 突变, 以避免二硫化物桥接的 IL-2 二聚体形成。

根据已有文献, IL-2 突变体 IL-2^{3X} 与 IL-2R α 不结合, 与 IL-2R β 结合力维持不变(Rodrigo Vazquez-Lombardi 等, Nature Communications, 8:15373, DOI: 10.1038/ncomms15373)。将 IL-2^{3X} 展示于酵母表面, 作为对照使用。IL-2^{3X} 的序列示于 SEQ ID NO:4 中, 该蛋白与 IL-2^{WT} 相同也包含 C125S 突变。

IL-2R α 结合界面突变体鉴定**IL-2 受体的表达和纯化****载体构建**

将 IL-2 受体 IL-2R α (Uiprot:P01589, aa22-217) 与 IL-2R β (Uiprot:P14784, aa27-240) 在序列的 C 末端接上 avi 标签(GLNDIFEAAQKIEWHE, 该标签肽可被 BirA 酶催化发生生物素化) 和 6 个组氨酸标签 (HHHHHH), 分别构建到 pTT5 载体(Addgene)上。构建产生的受体序列示于 SEQ ID NO: 5 和 6。

IL-2 受体 $\beta\gamma$ 复合物是基于 Knobs in holes 的 Fc 异源二聚, IL-2R β 的序列被构建到 Fc-Knob 的 N 端 (SEQ ID NO:7), IL-2R γ 的序列被构建到 Fc-Hole 的 N 端 (SEQ ID NO:8), 分别构建到 pcDNA3.1 载体上, 然后在 Expi293 细胞中共转表达。

质粒转染

根据所需转染体积传代 Expi293 细胞(Invitrogen), 转染前一天将细胞密度调整至 1.5×10^6 个细胞/ml。转染当天细胞密度约为 3×10^6 个细胞/ml。取终体积 1/10 (v/v) 的 Opti-MEM 培养基 (Gibco 货号: 31985-070) 作为转染缓冲液, 加入上述构建的表达质粒, 混匀, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤头过滤备用。加合适的聚乙烯亚胺(PEI) (Polysciences, 23966) 到上一步的质粒中(质粒与 PEI 的质量比例为 1:3), 混匀后室温孵育 10 min, 获得 DNA/PEI 混合物。将 DNA/PEI 混合物轻柔倒入 HEK293 细胞并混匀, 在 37°C , 8% CO_2 的条件下培养 24 h 后, 补加 VPA (Sigma, 货号: P4543-100G) 使终浓度至 2 mM 及 2% (v/v) Feed (1 g/L Phytone Peptone + 1g/L Difco Select Phytone), 继续培养 6 天。

IL-2R α -His 和 IL-2R β -His 蛋白的纯化

纯化前将收集的培养基 4500 rpm 离心 30 min, 弃掉细胞。再将上清使用 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤器过滤。将纯化使用的镍柱 (5 ml HisTrap excel, GE, 17-3712-06) 用 0.1 M NaOH 浸泡 2 h, 然后用 5-10 倍柱体积的超纯水冲洗, 去除碱液。纯化前用 5 倍柱体积的结合缓冲液 (20 mM Tris pH 7.4, 300 mM NaCl) 平衡纯化柱; 将细胞上清通过平衡后的柱子; 用 10 倍柱体积的冲洗缓冲液 (20 mM Tris 7.4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole) 通过柱子, 去除非特异性结合的杂蛋白; 然后用 3-5 倍柱体积洗脱液 (20 mM Tris 7.4, 300 mM NaCl, 100 mM imidazole) 将目标蛋白洗脱下来。将收集的蛋白超滤浓缩交换到 PBS (Gibco, 70011-044) 中, 然后用 superdex200 increase (GE, 10/300GL, 10245605) 进一步分离纯化, 收集单体的洗脱峰, 柱子的平衡和洗脱缓冲液为 PBS (Gibco, 70011-044)。取 $100 \mu\text{g}$ 纯化后的蛋白样品, 使用凝胶过滤色谱柱 SW3000 (TOSOH 货号: 18675) 测定蛋白纯度。

IL-2 受体 $\beta\gamma$ 蛋白的纯化

细胞培养后, 以 13000 rpm 离心 20 min, 收集上清, 用预装柱 Hitrap Mabselect Sure (GE, 11-0034-95) 纯化上清液。操作如下: 纯化前用 5 倍柱体积的平衡液 (0.2 M Tris, 1.5 M NaCl, pH 7.2) 平衡填料柱; 将收集的上清通过柱子, 再用 10 倍柱体积的平衡液清洗填料柱, 去除非特异性结合蛋白; 用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液 (1M sodium citrate, pH 3.5) 冲洗填料, 收集洗脱液; 将收集的蛋白超滤浓缩交换到 PBS (Gibco, 70011-044) 中, 然后用 superdex200 increase (GE, 10/300GL, 10245605) 进一步分离纯化, 收集单一的洗脱峰, 柱子的平衡和洗脱缓冲液为 PBS (Gibco, 70011-044)。取 $100 \mu\text{g}$ 纯化后的蛋白样品, 使用凝胶过滤色谱柱 SW3000 (TOSOH 货号: 18675) 测定蛋白纯度。

IL-2R α , IL-2R β 和 IL-2R $\beta\gamma$ 蛋白的生物素化标记

利用酶催化方法标记生物素, 方法如下: 分别取适量的如上表达和纯化的 IL-2R α , IL-2R β 和 IL-2R $\beta\gamma$ 蛋白溶液, 加入 1/10 (m/m) 质量的 His-BirA 蛋白 (uniprot: P06709), 同时加入终浓度为 2 mM ATP (sigma 货号: A2383-10G), 5 mM MgCl_2 , 0.5 mM D-生物素 (AVIDITY 货号: K0717); 30°C 孵育 1 h, 通过 Superdex200 increase (GE, 10/300GL, 10245605) 纯化, 去

除多余的生物素和 His-BirA；纯化后的样品通过 Fortebio 的 Streptavidin (SA) 传感器 (PALL, 18-5019) 验证，确认生物素标记成功。

IL-2^{mutant}-FC 融合蛋白的表达及纯化和鉴定

表达质粒的构建

从基于酵母的 IL-2^{mutant} 展示文库 IBYDL029，采用流式细胞术 FACS，筛选与 IL-2R α 不结合的 IL-2^{mutant}。将从文库筛选获得的 IL-2^{mutant} 序列通过 2 个 GGGGS 与 FcLALA 连接，并构建到 pCDNA3.1(Addgene) 的载体上，用于表达 IL-2^{mutant}-FC 融合蛋白。

此外，作为对照，将 IL-2^{WT}、IL-2^{3X} 基因序列放入通过 2 个 GGGGS 与 FcLALA 连接，并构建到 pCDNA3.1，用于表达 IL-2^{WT}-FC 与 IL-2^{3X}-FC 融合蛋白。本实施例中使用的 Fc 是指带有突变 L234A 和 L235A 的人 IgG1 的 Fc（简称 FcLALA, SEQ ID NO:12）。

IL-2 与 FC 融合蛋白的表达及纯化

使用化学转染的方法将含有编码融合蛋白基因的载体转入 HEK293 细胞中。使用化学转染试剂 PEI，按厂商提供的方案瞬时转染培养的 HEK293 细胞。首先在超净工作台中准备质粒 DNA 和转染试剂，取 3 mL Opti-MEM 培养基（Gibco 货号：31985-070）加入 50ml 离心管中，加入 30 μ g 对应质粒的 DNA，利用 0.22 μ m 的滤头过滤含有质粒的 Opti-MEM 培养基，随后加入 90 μ g PEI (1g/L)，静置 20 min。将 DNA/PEI 混合物轻柔倒入 27 mL HEK293 细胞并混匀，在 37 °C，8% CO₂ 的条件下培养 20 h 后，补加 VPA 使终浓度至 2 mM 及 2% (v/v) Feed，继续培养 6 天。

细胞培养后，以 13000 rpm 离心 20 min，收集上清，用预装柱 Hitrap Mabselect Sure 纯化上清液。操作如下：纯化前用 5 倍柱体积的平衡液（0.2 M Tris, 1.5 M NaCl, pH7.2）平衡填料柱；将收集的上清通过柱子，再用 10 倍柱体积的平衡液清洗填料柱，去除非特异性结合蛋白；用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液（1M sodium citrate, pH 3.5）冲洗填料，收集洗脱液；每 1 ml 洗脱液加入 80 μ L Tris (2M Tris)，使用超滤浓缩管交换到 PBS 缓冲液中，并测定浓度。取 100 μ g 纯化后蛋白，调整浓度至 1 mg/mL，使用凝胶过滤色谱柱测定 IL-2-Fc-二聚体蛋白纯度。结果如表 2 所示。图 3 显示了表 2 中列出的本发明 IL-2 突变体的序列。

表 2. IL-2-FC 在 293 细胞中表达量和纯度

IL-2	表达量 (mg/L)	纯度 (SEC-HPLC)
IL-2 ^{WT}	18	45%
突变体 IL-2 ^{3X}	34	70%
突变体 Y29A2	37	79%
突变体 Y29A5	12	73%
突变体 Y29A6	1	37%
突变体 Y29B2	77	88%
突变体 Y29C5	10	60%
突变体 Y29D2	17	80%
突变体 Y29D6	23	60%

突变体 Y30B1	20	70%
突变体 Y30E1	60	78%

IL-2^{mutant}-FC 与其受体的亲和力测定

采用生物膜干涉技术 (ForteBio) 测定法测定本发明 IL-2^{mutant}-FC 与其受体的平衡解离常数 (K_D)。

ForteBio 亲和力测定按照现有的方法 (Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): p. 270-8) 进行。简言之, 按如下方式测量候选 IL-2^{mutant}-FC 分别与 IL-2R α , IL-2R β 的亲和力: 传感器在分析缓冲液中线下平衡 20 分钟, 然后线上检测 120 秒建立基线; 加载人生物素化标记的 IL-2R α 或 IL-2R β 至 SA 传感器 (PALL, 18-5019) 上进行 ForteBio 亲和力测量; 将已加载生物素化标记的 IL-2R α 或 IL-2R β 的传感器置于含 100 nM IL-2^{mutant}-FC 的溶液中直至平台期, 之后将传感器转移至分析缓冲液解离至少 2 分钟, 用于结合和解离速率测量。使用 1:1 结合模型进行动力学的分析。

在如以上测定法所述进行的实验中, 由 HEK293-F 表达的 IL-2^{mutant}-FC 与其受体的亲和力 K_D 值如表 3 所示。作为对照, 以相同方法测定的 IL-2^{WT}-FC 与 IL-2^{3X}-FC 融合蛋白的亲和力 K_D 值也显示在表 3 中。

表 3. IL-2^{mutant}-FC 与其受体的亲和力 K_D 值

IL-2	IL-2R α avidity	IL-2R β avidity
IL-2 ^{WT}	1.0E-08	4.1E-08
IL-2 ^{3X}	N.B	1.6E-08
Y29A2	Very weak	4.8E-10
Y29A5	N.B	3.4E-10
Y29A6	N.B	1.8E-09
Y29B2	N.B	3.4E-10
Y29C5	N.B	4.2E-10
Y29D2	Very weak	8.5E-11
Y29D6	N.B	1.9E-10
Y30B1	N.B	1.9E-10
Y30E1	N.B	5.9E-09

N.B: 不结合

从亲和力数据可知, 从 IBYDL029 文库获得的上述突变体都满足了阻断 IL-2R α 的结合。

实施例 2: IL-2 嵌合和截短突变体的构建、筛选及鉴定

IL-2 B'C'loop 嵌合体和截短体的设计

B'C'loop: IL-2 的 B helix 与 C helix 的连接序列 (图 2A), 包括 A73-R83 共 11 个氨基酸。

比较 IL-2 单体(PDB:1M47) 和复合物的晶体结构 (PDB: 2ERJ), 我们发现在 IL-2 单体

的晶体结构中 B'C'loop 是缺失的,这是由于 B'C'loop 在溶液中非常活跃,无法形成相对稳定的构象。

通过对 B'C'loop 进行基因工程改造,增加 B'C'loop 的稳定性,从而增加 IL-2 的稳定性。因此我们比对了人 IL15 晶体结构(PDB:2Z3Q),发现它的 B'C'loop 较短且稳定(图 2B)。因此我们设计了一个 IL-2 嵌合分子(L017)和 4 个截短体分子(L057~L060)(见表 4)。

表 4. IL-2 B'C'loop 优化序列

名称	B'C'loop 序列
L 001(IL-2 ^{WT})	AQSKNFHLRPR
L 017(IL-2 ^{hyb15BCL})	SGDASIH
L 057(IL-2 ^{truncate1})	AQSKNFH
L 058(IL-2 ^{truncate2})	AGSKNFH
L 059(IL-2 ^{truncate3})	AQSANFH
L 060(IL-2 ^{truncate4})	AQSANIH

表达质粒的构建

野生型 IL-2(uniprot:P60568, aa21-153, C125S, 简称 IL-2^{WT}), 以及 IL-2 突变体 IL-2^{3X}(R38D, K43E, E61R)、B'C'loop 嵌合体和截短体,通过 GSGS 连接序列与人 IgG1 的 Fc(L234A, L235A, 简称 FcLALA, SEQ ID NO: 12) 连接, 并构建到 pTT5 载体上, 用以表达如下蛋白:

蛋白名称	结构	SEQ ID NOs
Y001	IL-2 ^{WT} -GSGS-FcLALA	SEQ ID NO: 13
Y002	IL-2 ^{3X} -GSGS-FcLALA	SEQ ID NO: 14
Y017	IL-2 ^{hyb15BCL} -GSGS-FcLALA	SEQ ID NO: 15
Y057	IL-2 ^{truncate1} -GSGS-FcLALA	SEQ ID NO: 16
Y058	IL-2 ^{truncate2} -GSGS-FcLALA	SEQ ID NO: 17
Y059	IL-2 ^{truncate3} -GSGS-FcLALA	SEQ ID NO: 18
Y060	IL-2 ^{truncate4} -GSGS-FcLALA	SEQ ID NO: 19

将 B'C'loop 嵌合体(Y017)或截短体(Y057)与文库筛选得到的突变体 Y30E1 (K35E, T37E, R38E, F42A) 组合, 通过 2 个 GGGGS 与 FcLALA 连接, 并构建到 pCDNA3.1 的载体上, 用于表达以下蛋白。其中, Y092 具有嵌合 B'C'loop 环序列 AGDASIH; Y144 在 Y092 的基础上增加了 T3A 氨基酸取代, 以去除 IL-2 的 N 末端 O 糖修饰。

蛋白名称	结构	SEQ ID NOs
Y089	IL-2 ^{Y30E1.truncate1} -2*(G4S)-FcLALA	SEQ ID NO: 20
Y092	IL-2 ^{Y30E1.15BCL} -2*(G4S)-FcLALA	SEQ ID NO: 21
Y144	IL-2 ^{Y30E1.15BCL.T3A} -2*(G4S)-FcLALA	SEQ ID NO: 22

此外, 也将 IL-2^{WT} 和 IL-2^{3X} 通过 2 个 GGGGS 与 FcLALA 连接, 并构建到 pCDNA3.1 的

载体上，用以表达以下蛋白：

蛋白名称	结构	SEQ ID NOs
Y040	IL-2 ^{3X} -2*(G4S)-FcLALA	SEQ ID NO: 23
Y045	IL-2 ^{WT} -2*(G4S)-FcLALA	SEQ ID NO: 24

上述蛋白分子的具体序列信息见序列表。

融合蛋白的表达纯化

上述蛋白分子分别在 293 细胞和 CHO 细胞中表达。在 HEK293 细胞中的表达按实施例 1 中用于 IL-2-Fc 融合蛋白表达的方法进行。在 CHO 细胞中的表达按如下进行。

根据所需细胞体积传代 ExpiCHO 细胞 (Invitrogen)，转染前一天将细胞密度调整至 3.5×10^6 个细胞/ml。转染当天检测细胞密度 (约为 $8 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/ml)，活力达到 95% 以上，用 ExpiCHO™ Expression Medium (Gibco 货号：A29100-01) 将细胞密度调整至 6×10^6 个细胞/ml。取终体积 8% (v/v) 的 OptiPRO™ SFM (Gibco 货号：12309-019) 作为转染缓冲液，加入对应量 (0.8 µg/mL 细胞) 的质粒，混匀，用 0.22 µm 滤膜过滤除菌，按照 3.2 µL/mL 细胞比例加入 ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit (Gibco, 货号：A29130) 里的 reagent。将转染试剂与质粒 DNA 形成的复合物室温放置孵育 1~5 min，然后缓慢加到细胞中，在 37 °C，8% CO₂ 的条件下培养 18 h 后加入 0.6% (v/v) 的 Enhancer 和 30% (v/v) 的 Feed，继续培养 6 天。

在细胞培养后，细胞培养液以 13000 rpm 离心 20 min，收集上清，用预装柱 Hitrap Mabselect Sure (GE, 11-0034-95) 纯化上清液。操作如下：纯化前用 5 倍柱体积的平衡液 (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.2) 平衡填料柱；将收集的上清通过柱子，再用 10 倍柱体积的平衡液清洗填料柱，去除非特异性结合蛋白；用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液 (100 mM sodium citrate, pH 3.5) 冲洗填料，收集洗脱液。每 1 ml 洗脱液加入 80 µL Tris (2M Tris)，使用超滤浓缩管 (MILLIPORE, 货号：UFC901096) 交换到 PBS 缓冲液 (Gibco, 货号：70011-044) 中，并测定浓度。取 100 µg 纯化后蛋白，调整浓度至 1 mg/mL，使用凝胶过滤色谱柱 SW3000 (TOSOH 货号：18675) 测定蛋白纯度。

B'C' loop 嵌合体 (Y017) 和截短体 (Y057/058/059) 的融合蛋白相比于野生型 IL-2 的融合蛋白 (Y001)，在 HEK293 细胞中的表达量和一步亲和层析纯度都有很大的提高。结果见下表 5。

表 5. IL-2 突变体在 HEK293 的表达量和纯度

蛋白名称	表达量 mg/L	纯度 (SEC-HPLC)
Y001	16.35	44.74%
Y002	23.92	69.85%
Y017	54.47	93.45%
Y057	52.36	92.77%
Y058	49.86	99.09%
Y059	36.52	86.95%
Y060	21.20	66.33%

包含 B'C' loop 嵌合体 (Y092 和 Y144) 和截短体 (Y089) 以及进一步突变 Y30E1 的融合蛋白, 相比于野生型 IL-2 的融合蛋白 (Y045), 在 CHO 细胞中的表达量和一步亲和层析纯度上, 也表现出有很大的提高。结果见下表 6。

表 6. IL-2 突变体在 CHO 的表达量和纯度

蛋白名称	表达量 mg/L	纯度 (SEC-HPLC)
Y040	20.28	40.75%
Y045	2.44	50.85%
Y089	249.6	99.11%
Y092	118.8	99.07%
Y144	114	97.78%

综合上述数据可知: 1) 通过酵母文库筛选得到的 Y30E1 等点突变分子可以阻断 IL-2R α 的结合; 2) B'C'loop 嵌合分子和截短分子增加了分子的表达量和纯度; 3) Y30E1 与 B'C'loop 突变体的组合分子达到了既阻断 IL-2R α , 又提高了分子的表达量和纯度。

突变体的体外功能实验

通过检测各 IL-2^{mutant}-FC 对原代人 CD8⁺ T 细胞 p-STAT5 信号的激活, 检查各突变体对 CD25⁺细胞和 CD25⁻细胞的激活作用。具体步骤如下:

1. 复苏 PBMC 细胞:

a) 从液氮取出 PBMC 细胞 (Allcells 货号: PB005F, 100M 装), 迅速置于 37°C 水浴锅中, 复苏 PBMC 细胞;

b) 将细胞加入 10 mL 已预热的、含 5% 人 AB 血清 (GemCell 货号: 100-512) 与 1% DNA 酶 (STRMCELL 货号: 07900) 的 X-VIVO15 (Lonza 货号: 04-418Q) 培养基中, 400 G、25 °C 离心 10 分钟 (后续离心均为此条件) 洗涤一次;

c) 加入 20 mL 培养基重悬细胞, 37 °C 二氧化碳培养箱静置培养过夜。

2. 纯化人 CD8⁺ T 细胞:

a) 吸取步骤 1 中悬浮细胞液, 离心弃上清;

b) 加入 1 mL Robosep 缓冲液 (STEMCELL 货号: 20104) 与 100 μ L 人 AB 血清及 100 μ L 人 CD8⁺ T 细胞纯化试剂盒 (Invitrogen 货号: 11348D) 中负性筛选抗体混合液重悬细胞;

c) 混匀后, 4 °C 孵育 20 分钟, 每 5 分钟摇晃一次;

d) 孵育后, 加入 10 mL Robosep 缓冲液, 离心洗涤两次;

e) 同时, 取 1 mL 磁性微球 (人 CD8⁺ T 细胞纯化试剂盒), 加入 7 mL Robosep 缓冲液置于磁力架上 1 分钟弃上清, 预洗磁性微球;

f) 各加入 1 mL Robosep 缓冲液分别重悬微球与细胞, 混匀后室温旋转孵育 30 分钟;

g) 孵育后, 加入 6 mL Robosep 缓冲液, 置于磁力架上 1 分钟, 收集上清;

h) 收集液再次置于磁力架上 1 分钟, 收集上清;

i) 离心弃上清, 使用预热的 T 培养基重悬, 调整密度至 1×10^6 /mL;

j) 取1/3细胞待后需刺激CD25表达, 其余细胞置于37 °C二氧化碳培养箱静置过夜培养。

3. 刺激CD8⁺ T细胞表达CD25:

- 取1/3步骤2中纯化后的CD8⁺ T细胞, 加入抗人CD3/CD28抗体的磁性微球 (GIBCO货号: 11131D), 细胞与微球的比例为3:1;
- 置于 37 °C二氧化碳培养箱静置三天;
- 加入 10 mL 培养基清洗 2 次;
- 加入培养基调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 37°C二氧化碳培养箱中静置培养 2 天。

4. 检测细胞纯度与表达水平:

- 使用抗人CD8-PE (Invitrogen货号: 12-0086-42)、抗人CD25-PE (eBioscience 货号: 12-0259-42)、同型对照抗体 (BD货号: 556653) 检测细胞的CD8与CD25;
- 步骤2中细胞为CD8⁺ CD25⁻ T细胞, 步骤3中细胞为CD8⁺ CD25⁺ T细胞。

5. 检测各IL-2^{mutant}-FC对CD8⁺ CD25⁻ T细胞激活p-STAT5信号的EC₅₀:

- 取CD8⁺ CD25⁻ T细胞, 以每孔 1×10^5 细胞铺96孔U底培养板 (Costar货号: CLS3799-50EA);
- 加入100 μL 各IL-2^{mutant}-FC、商品化IL-2 (R&D货号: 202-IL-500)、IL-2^{WT}-FC、IL-2^{3X}-FC, 最高浓度从266.7 nM开始4倍梯度稀释共12个梯度, 37 °C培养箱中孵育20分钟;
- 加入55.5 μL 4.2%甲醛溶液, 室温固定10分钟;
- 离心弃上清, 加入200 μL 冰甲醇 (Fisher货号: A452-4) 重悬细胞, 4 °C冰箱孵育30分钟;
- 离心弃上清, 用200 μL 染色缓冲液 (BD货号: 554657) 洗涤3次;
- 加入200 μL 含抗p-STAT5-AlexFlour647 (BD 货号: 562076, 1:200稀释) 的破膜/固定缓冲液 (BD货号: 51-2091KZ), 室温避光孵育3小时;
- 使用染色缓冲液洗涤三次, 100 μL 染色缓冲液重悬细胞, 进行流式细胞仪检测;
- 以IL-2分子的浓度为横坐标、AlexFlour647中间荧光度值为纵坐标, 制作p-STAT5信号的EC₅₀值, 结果下表7所示。

6. 检测各IL-2^{mutant}-FC对CD8⁺ CD25⁺ T细胞激活p-STAT5信号的EC₅₀:

- 取CD8⁺ CD25⁺ T细胞, 以每孔 1×10^5 细胞铺96孔U底培养板;
- 同步骤5中b-h, 制作p-STAT5信号的EC₅₀值, 结果如表7所示。

表 7. IL-2 突变体激活 CD25^{+/+} T 细胞中 p-STAT5 信号的 EC₅₀ 及其比值

	R&D IL2	Y045	Y040	Y30E1	Y089	Y092
CD25 ⁻ pSTAT5 EC ₅₀	0.4697	3.793	8.399	3.768	2.196	0.6644
CD25 ⁺ pSTAT5 EC ₅₀	0.0009973	0.001919	3.717	2.186	0.3696	0.3729
CD25 ⁻ EC ₅₀ /CD25 ⁺ EC ₅₀ 倍数	470.9716	1976.5503	2.2596	1.7237	5.9416	1.7817

实施例 3: IL-2 弱化突变体设计

IL-2 弱化分子的设计

为了进一步改进 IL-2 突变体的药物动力学(PK)和延长分子的半衰期,同时降低分子的毒性。根据分析 IL-2 复合物的晶体结构(图 4)(PDB:2ERJ),选择 IL-2 与 IL-2R β 接触界面的氨基酸进行突变,以降低它们之间的亲和力。

基于 IL-2R α 的结合界面氨基酸突变,IL-2 B'C' loop 优化和 IL-2R β 结合界面氨基酸突变,并基于两种 format 形式进行验证,分子设计见表 8。任选地,这些分子可以进一步包含 T3A 突变,以去除 IL2 N 末端的 O 糖修饰。

表 8. IL-2 突变体的设计

IL-2R β 结合界面	IL-2R α 结合界面	B'C'Loop 改造	分子序列
L12, E15, H16, L19, D20, D84, S87, N88, V91, I92, E95, Q126 (单点或多点突变)	Y30E1(K35E, T37E, R38E, F42A)	WT(野生型)	具体的示例性分子见序列表及其描述。
		人源 IL-15 B'C'loop 替换	
		人源 IL-2 B'C'loop 截短	
	K35E, T37E, R38E	WT(野生型)	
		人源 IL-15 B'C'loop 替换	
		人源 IL-2 B'C'loop 截短	
	F42A	人源 IL-15 B'C'loop 替换	
		人源 IL-2 B'C'loop 截断	
	WT(野生型)	人源 IL-15 B'C'loop 替换	
		人源 IL-2 B'C'loop 截短	

根据上述设计,具体构建了具有如下序列结构(从 N 端至 C 段)的 IL-2^{mutant},以用于表达产生 Format 1 分子:

- 具有氨基酸序列 SEQ ID Nos: 37-638 的 IL-2 突变序列;
- 接头序列 GGGGSGGGGS;
- SEQ ID NO: 12 的 Fc 序列。

根据上述设计,具体构建了具有如下序列结构(从 N 端至 C 段)的 IL-2^{mutant}-Fc.Knob 和 Fc.Hole,以用于表达产生 Format 2 分子:

(1) IL-2^{mutant}-Fc.Knob

- 具有氨基酸序列 SEQ ID Nos: 37-638 的 IL-2 突变序列;
- 接头序列 GGGGSGGGGS;
- SEQ ID NO: 9 的 Fc.Knob 序列; 和

(2) Fc.Hole

- SEQ ID NO: 10 的 Fc.Hole 序列。

IL-2 弱化突变体的表达纯化及其与受体的亲和力测定

Format1 是将 IL-2 突变体通过 2 个 G4S 连接到 IgG1FcLALA 的 N 末端,构建二价的 IL-2 突变体分子。Format2 是基于 Knob in hole 的 IgG1FcLALA 的异源二聚体,其中 IL-2 突变体

分子通过 2 个 G4S 连接到 IgG1FcLALA-Knob 的 N 末端, 构建单价的 IL-2 突变体分子。所有的序列都构建到 pcDNA3.1 的载体上。

蛋白的表达纯化: 实验方法同实施例 2。

采用生物光干涉测量 (ForteBio) 测定法测定本发明上述 IL-2 突变体与其受体的平衡解离常数 (KD)。

ForteBio 亲和力测定按照现有的方法 (Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. *Mabs*, 2013.5(2): p. 270-8) 进行。测量候选分子分别与 IL-2R α , IL-2R β 和 IL-2R $\beta\gamma$ 的亲合力: 传感器在分析缓冲液中线下平衡 20 分钟, 然后线上检测 120 秒建立基线; 加载人生物素化标记的 IL-2R α 或 IL-2R β 或 IL-2R $\beta\gamma$ 至 SA 传感器 (PALL, 18-5019) 上进行 ForteBio 亲和测量; 将已加载 IL-2 受体的传感器置于含 100 nM IL-2 突变体分子的溶液中直至平台期, 之后将传感器转移至分析缓冲液解离至少 2 分钟用于结合和解离速率测量。使用 1:1 结合模型进行动力学的分析。

实验结果见表 9。相对于野生型(Y045), IL-2 突变体在表达量和纯度都得到了提升, 同时引入 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面氨基酸突变使得与 IL-2R β 和 IL-2R $\beta\gamma$ 的亲和力得到了不同程度的降低。下表中分子的结构见图 6。

表 9. IL-2 突变体在 HEK293 表达及其与 IL-2 受体的亲和力

分子名称	表达量 mg/L	纯度 (SEC-HPLC)	与 IL-2R α 的 KD (M)	与 IL-2R β 的 KD (M)	与 IL-2R $\beta\gamma$ 的 KD (M)
Y045	11.9	50.85%	1.05E-09	2.45E-08	-
Y144	114	97.78%	N.B.	2.95E-09	8.67E-11
2688	156	84.38%	-	7.90E-09	1.50E-10
2113	295	97.36%	-	1.36E-08	2.47E-10
2131	281	97.20%	-	1.19E-08	4.67E-10
2154	273	97.22%	-	6.08E-09	-
2162	167.3	96.96%	-	3.71E-08	3.13E-10
2714	158.2	85.16%	-	3.03E-08	4.38E-10
2732	166.5	84.67%	-	N.B.	3.18E-09
2755	168.7	85.02%	-	6.32E-09	5.37E-10
2763	147.4	85.53%	-	1.71E-08	1.60E-09
2114	244.4	97.77%	-	1.13E-08	1.72E-10
2115	256.5	-	-	1.61E-08	4.59E-10
2116	239.4	92.05%	-	1.76E-08	3.74E-10
2132	230.1	95.23%	-	N.B.	1.99E-09
2133	240.5	97.22%	-	N.B.	7.68E-09
2141	250.6	96.15%	-	7.56E-09	1.12E-10
2092	346.8	95.57%	-	2.31E-09	1.53E-10
2158	225	96.61%	-	6.77E-09	3.58E-10
2107	307.7	91.97%	-	N.B.	2.63E-09

2096	294.6	96.33%	-	1.39E-08	1.12E-10
2097	220.5	96.37%	-	1.35E-08	1.18E-10
2172	121.9	96.60%	-	2.78E-09	-
2257	131.4	88.47%	-	7.14E-10	-
2258	145.6	77.64%	-	1.39E-09	-
2259	145.9	86.68%	-	-	-
2260	124.2	83.24%	-	-	-
2262	63.9	96.89%	-	1.05E-08	-
2263	100.4	70.62%	-	2.77E-08	-
2166	221.7	97.02%	-	3.30E-07	1.72E-09
2167	144.3	96.24%	-	2.85E-08	2.87E-10
2168	129.7	96.59%	-	2.33E-08	6.97E-09
2169	105.2	96.64%	-	2.47E-08	6.68E-09
2170	128.8	96.57%	-	4.96E-08	8.61E-10
2171	125.7	95.44%	-	1.53E-08	1.58E-10
2478	90.7	98.56%	-	N.B.	-
2454	100	90.47%	-	N.B.	-
2481	60	97.97%	-	N.B.	-
3079	100	93.34%	7.29E-09	N.B.	3.79E-08
3055	130	85.74%	8.06E-09	N.B.	3.61E-08
3082	100	94.43%	8.17E-09	N.B.	2.65E-08

注：“-”表示未检测；“N.B.”表示不结合

实施例 4: IL-2 突变体体外功能实验

IL-2 突变体在人的 T 淋巴细胞中 pSTAT5 信号检测

IL-2 与 T 细胞表面 IL-2 receptor 结合，会激活人的 T 淋巴细胞 JAK-STAT 信号通路，其中 STAT5 磷酸化水平是评判该信号通路激活水平的重要指标。正常 T 淋巴细胞基本不表达 IL-2R α 。通过检测 IL-2 突变体分子对 T 淋巴细胞 pSTAT5 信号,来评估不同的 IL-2 突变体分子对人的 T 细胞激活活性的强弱。

实验材料和方法：

实验方法：

1. PBMC 细胞复苏

(1)、取液氮冻存 PBMC 细胞 (All Cells, 货号 PB004F-C, 编号 LP191011A/LP190529), 37°C 快速摇动融化。

(2)、将细胞缓慢加入 10ml CTS 培养基(Gibco, 货号 A3021002, 批号 1989823, 37°C 预热, 并含有 100ul DNA 酶)。

(3)、离心 300g/8min, 去除上清。

(4)、用 10ml CTS 重悬, 转移至 T75 培养瓶 (NUNC, 货号 156499), 37°C 5% 培养箱

稳定过夜。

2. pSTAT5 实验

- (1)、取 PBMC 过夜培养悬浮细胞, 细胞铺 96 孔 U 型板(Corning, 货号 CLS3799-50EA), 细胞数量 5×10^5 cells/well。
- (2)、分别将不同稀释检测抗体加入 96 孔型板, 待检测抗体与细胞 37°C 孵育 30min。
- (3)、400g/5min 离心, 去除上清。
- (4)、按照 200ul/孔, 加入 4%组织细胞固定液(Solarbio, 货号: P1110), 常温离心 400g/30min。
- (5)、按照 200ul/孔, 加破膜液(BD, 货号: 558050), 4°C 静置 30min, 离心 400g/10min。
- (6)、按照 200ul/孔, 加入 perm/wash Buffer(BD, 货号 558050, 批号 7271605), 共细胞洗涤两次。
- (7)、配置抗体染液, pSTAT5 抗体(BD, 货号 562076, 批号 9141872)量为 3ul/100ul perm/wash Buffer/well; BV421 anti-human CD3 抗体(Biolegend, 货号 300434, 批号: B271302), FTIC anti-human CD4 抗体(Biolegend, 货号 300506, 批号: B283935)和 AF700 anti-human CD8a(Biolegend, 货号 300924, 批号: B253967)分别为 1ul/100ul perm/wash Buffer/well; 室温孵育 1.5h, perm/wash Buffer 洗涤 2 次。
- (8)、150ul perm/wash Buffer/well 重悬, 流式检测。

实验结果:

IL-2 突变分子在正常 T 淋巴细胞(CD4+ T cells, CD8+ T cells)中 pSTAT5 功效检测结果如图 7A、图 7B、图 7C、图 7D 和图 7E。

CD4+和 CD8+ T 细胞的磷酸化水平代表了细胞的增殖能力和细胞的活性。从图 7 和表 10, 可以看出通过突变 IL-2R β 结合界面一个或多个氨基酸, 使得 IL-2 突变体相对于 IL-2R β 结合界面未做突变的分子 Y-144 (format1) 和 2688 (format2), 对 T 细胞的磷酸化水平得到不同程度的降低。

表 10. IL-2 突变体对 CD4+或者 CD8+T 细胞的激活活性的下降倍数

下降倍数	10-50 倍	50-100 倍	100-1000 倍	>1000 倍
IL-2 突变体 EC50(CD4+或者 CD8+)/ Y-144 EC50	2154, 2096, 2257	2115, 2171	2113, 2116, 2158, 2258, 2167	2131, 2162, 2107, 2166, 2168, 2169, 2170
IL-2 突变体 EC50(CD4+或者 CD8+)/2688 EC50	2714		2763	2732

IL-2 突变体在活化 T 淋巴细胞中 pSTAT5 信号检测

IL-2 与 T 细胞表面 IL-2 受体结合, 会激活 T 淋巴细胞 JAK-STAT 信号通路, 其中 STAT5 磷酸化水平是评判该信号通路激活程度的重要指标。T 淋巴细胞被激活活化后, 使 T 细胞表面的 IL-2 R α (CD25)丰度得到显著增加。

实验方法:

1. PBMC 细胞复苏

- (1)、取液氮冻存 PBMC 细胞 (All Cells, 货号 PB004F-C, 编号 LP191011A), 37°C 快速摇动融化。

(2)、将细胞缓慢加入 10ml CTS 培养基(Gibco, 货号 A3021002, 批号 1989823, 37°C 预热, 并含有 100ul DNA 酶)。

(3)、离心 300g/8min, 去除上清。

(4)、用 10ml CTS 重悬, 转移至 T75 培养瓶 (NUNC, 货号 156499), 37°C 5% 培养箱 (Thermo, 货号 3111) 稳定过夜。

2. T 淋巴细胞活化和静息

(1)、取过夜培养 PBMC 中悬浮细胞, 细胞计数, 加入等细胞数量 CD3/CD28 Beads(Invitrogen, 货号 11131D, 批号: 00783216) 活化刺激 48h。

(2)、去除 Beads 和培养基洗涤活化细胞。

(3)、活化细胞转至 T75 培养瓶, 37°C 5% 静息 48h。

3. pSTAT5 实验

(1)、细胞铺 96 孔 U 型板(Corning, 货号 CLS3799-50EA), 细胞数量 5×10^5 cells/well。

(2)、分别将不同稀释检测抗体加入 96 孔型板, 待检测抗体与细胞 37°C 孵育 30min。

(3)、400g/5min 离心, 去除上清。

(4)、按照 200ul/孔, 加入 4% 组织细胞固定液(Solarbio, 货号: P1110), 常温离心 400g/30min。

(5)、按照 200ul/孔, 加破膜液(BD, 货号: 558050), 4°C 静置 30min, 离心 400g/10min。

(6)、按照 200ul/孔, 加入 perm/wash Buffer(BD, 货号 558050, 批号 7271605), 共细胞洗涤两次。

(7)、配置抗体染液, pSTAT5 抗体(BD, 货号 562076, 批号 9141872)量为 3ul/100ul perm/wash Buffer/well, BV421 anti-human CD3 抗体(Biolegend, 货号 300434, 批号: B271302), FTIC anti-human CD4 抗体(Biolegend, 货号 300506, 批号: B283935)和 AF700 anti-human CD8a(Biolegend, 货号 300924, 批号: B253967)分别为 1ul/100ul perm/wash Buffer/well; 室温孵育 1.5h, perm/wash Buffer 洗涤 2 次。

(8)、150ul perm/wash Buffer/well 重悬, 流式检测。

实验结果

IL-2 突变分子在 CD8⁺T 细胞, CD4⁺CD25⁺T 细胞, NK 细胞 (CD3⁺CD56⁺) 和 Treg 细胞 (CD3⁺CD4⁺CD25⁺) 中 pSTAT5 功效检测结果如图 8A-G 和表 11-12。从结果可以看出, 本研究的 IL-2 突变体对淋巴细胞的 pSTAT5 活性都要弱于人的野生型 IL-2(rhIL-2, R&D systems, 货号: 202-IL); 同时相对于其他淋巴细胞, 本研究的 IL-2 突变体分子对 Treg 细胞显示出了极大的选择性。

表 11. rhIL-2 和 IL-2 突变体对不同的淋巴细胞的 pSTAT5 的 EC50

EC50 (nM)	CD8 ⁺ T	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T	NK	Treg
rhIL-2	1.685	0.1024	0.02422	0.0003881
2478	21740	1475	22.08	0.06178
2454	~ 34240531	636.5	147.6	0.1146
2481	~ 34240531	636.5	147.6	0.1146
3079	275.4	63.16	2.298	0.08149
3055	~ 28361571	578.4	83.79	1.165
3082	~ 33933462	319.6	82.27	9.002

表 12. IL-2 突变体对 Treg 细胞的选择相对于其他淋巴细胞的倍数

倍数 (其他淋巴细胞 EC50/Treg 细胞)	CD8 ⁺ T	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T	NK	Treg
2478	351893.8168	23875.04047	357.3972159	1
2454	298782993	5554.101222	1287.958115	1
2481	28232534.83	1632.687734	1290.859667	1
3079	3379.555774	775.0644251	28.19977911	1
3055	24344696.14	496.4806867	71.92274678	1
3082	3769546.99	35.50322151	9.139080204	1

实施例 5： IL-2 突变分子体内抗肿瘤药效

为了证明 IL-2 突变分子的抗肿瘤体内药效，我们采用 MC38 细胞接种 C57 小鼠测定本发明的 IL-2 突变分子 (Y144、2113、2162) 的抗肿瘤药效 (分子 2113 和 2162 的结构见图 6)。实验使用 SPF 等级的雌性 C57 小鼠 (14-17g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司)，合格证编号为 NO. 110011201109499961。

将 MC38 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞，以 PBS(1×) 分散 MC38 细胞，制备成细胞浓度为 5×10^6 个/ml 细胞悬液。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 C57 小鼠右侧腹部区域中来建立 MC38 荷瘤小鼠模型。

肿瘤细胞接种 7 天后检测各只小鼠瘤体积，进行分组 (每组 6 只小鼠)，给药剂量和方式如表 13、14 所示，分别在接种后第 7、14、21 天给药，每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重，如图 9A 和 9B 所示，监测至 25 天后结束。接种后第 25 天计算相对肿瘤抑制率 (TGI%)，计算公式如下： $TGI\% = 100\% \times (\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / (\text{对照组肿瘤体积} - \text{对照组给药前肿瘤体积})$ 。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴 (L) 和最大宽轴 (W)，肿瘤体积按如下公式计算： $V = L \times W^2 / 2$ 。采用电子天平测定体重。

表 13. 实验设计表 (注：每隔 7 天给药，共 3 次)

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG*	3 mg/kg	Q7Dx3	腹腔注射
Y144	1 mg/kg	Q7Dx3	腹腔注射
Y144	3 mg/kg	Q7Dx3	腹腔注射
2113	1 mg/kg	Q7Dx3	腹腔注射
2113	3 mg/kg	Q7Dx3	腹腔注射
2162	1 mg/kg	Q7Dx3	腹腔注射
2162	3 mg/kg	Q7Dx3	腹腔注射

* h-IgG：购自 Equitech-Bio，批号 161206-0656，1 g/瓶，用 PBS 配制成 10 mg/ml

肿瘤体积检测见图 9A。在接种后第 25 天,与 h-IgG 对比,弱化 IL-2 分子 2113(3 mg/kg)、2162(3 mg/kg)单药抑制率分别为 71.4%、33.8%。结果显示,改造后 IL2 分子(2113、2162)具有抗肿瘤作用,且具有剂量效应。同时我们对小鼠体重进行检测,结果如图 9B、9C 所示,分子 2113(1 mg/kg)、2162(1 mg/kg)、2162(3 mg/kg)组小鼠体重无显著差异。相较而言,在施用未进行弱化的分子 Y144 的组中,小鼠不耐受,在 25 天的监测期结束前死亡。

在另外一个 MC38 肿瘤模型中证明我们另外几个 IL-2 突变分子(Y045、2478、2454)的抗肿瘤体内药效(分子 2478 和 2454 的结构见图 6)。本实验 MC38 荷瘤小鼠实验使用 SPF 等级的雌性 C57 小鼠(14-17g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司),合格证编号为 NO. 110011201109499826。实验基本如前述进行。

肿瘤细胞接种 7 天后检测各只小鼠瘤体积,进行分组(每组 7 只小鼠),给药剂量和方式如表 14 所示,分别在接种后第 7、14、21 天给药,每周 2-3 次监测小鼠瘤体积与体重,如图 10A、10B 所示,监测至 25 天后结束。接种后第 25 天计算相对肿瘤抑制率(TGI%),计算公式如下: $TGI\% = 100\% * (\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / (\text{对照组肿瘤体积} - \text{对照组给药前肿瘤体积})$ 。肿瘤体积测定:采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴(L)和最大宽轴(W),肿瘤体积按如下公式计算: $V = L * W^2 / 2$ 。采用电子天平测定体重。

表 14. 实验设计表(注:每隔 7 天给药,共 3 次)

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG	3 mg/kg	Q7Dx3	腹腔注射
Y045	1 mg/kg	Q7Dx3	腹腔注射
Y045	3 mg/kg	Q7Dx3	腹腔注射
2478	1 mg/kg	Q7Dx3	腹腔注射
2478	3 mg/kg	Q7Dx3	腹腔注射
2454	1 mg/kg	Q7Dx3	腹腔注射
2454	3 mg/kg	Q7Dx3	腹腔注射

* h-IgG : 购自 Equitech-Bio, 批号 161206-0656, 1 g/瓶, 用 PBS 配制成 10 mg/ml

肿瘤抑制率结果如表 15 所示:在接种后第 25 天,与 h-IgG 对比,分子 Y045(1 mg/kg)、2478(1 mg/kg)、2454(1 mg/kg)、Y045(3 mg/kg)、2478(3 mg/kg)、2454(3 mg/kg)单药抑制率分别为 5.3%、39.1%、15.6%、19.8%、52.6%、23.0%。结果显示,未改造 IL2 分子(Y045)具有抗肿瘤作用,且具有剂量效应;改造后的弱化 IL2 分子(2478、2454)具有抗肿瘤作用,具有剂量效应,但药效比未改造 IL2 分子(Y045)好。同时我们对小鼠体重进行检测,结果如图 10B、10C 所示小鼠体重无显著差异。

表 15. 第 25 天肿瘤抑制率

组别	肿瘤体积 (mm ³)	肿瘤抑制率 (%)
h-IgG, 3 mg/kg	2473	N/A
Y045, 1 mg/kg	2377	5.3

2478, 1 mg/kg	1772	39.1
2454, 1 mg/kg	2323	15.6
Y045, 3 mg/kg	2131	19.8
2478, 3 mg/kg	1478	52.6
2454, 3 mg/kg	2354	23.0

实施例 6： IL-2 突变体分子在自身免疫方面体内研究

为了证明 IL-2 弱化分子在自身免疫方面的潜力，我们采用 C57 小鼠于给药前以及给药后第 3、7 天采血测定本发明的 IL-2 弱化分子的对免疫细胞的影响。实验使用 SPF 等级的雌性 C57 小鼠（14-17g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司），合格证编号为 NO. 110011201109500076。

将 30 只 C57 小鼠，进行随机分组（每组 6 只小鼠），给药剂量和方式如表 16 所示，单次给药，每周 2 次监测小鼠体重，如图 11A、11B 所示，监测至 7 天后结束。给药前、给药后第 3、7 天对小鼠进行采血，检测血液中 Treg、NK、CD4 T conv (CD4+Foxp3-)、CD8⁺ T 细胞在 CD45⁺ T 淋巴细胞总数中的占比变化情况，如图 11c、11d、11e、11f 所示。

所测分子 2602 为包含野生型 IL-2^{WT} 序列 SEQ ID NO: 1 的 Format 2 型 IL-2-Fc 二聚体分子；弱化分子 3079、3055 和 3082 的结构见图 6，也均为 Format 2 型 IL-2-Fc 二聚体分子。

从结果可以得出，本研究的 IL-2 突变分子弱化了 IL-2R β 结合，从而导致了 IL-2 突变分子对促炎的 NK 细胞的增殖刺激弱于野生型的 IL-2 分子 2602(IL-2^{WT})，但仍然保持了对免疫抑制细胞 Treg 细胞的扩增，IL-2 突变分子对 Treg 增殖幅度相似。并且 IL-2 突变分子对于 CD4 T conv 和 CD8 T 细胞并没有产生明显的增殖作用，这一结果提示，通过对 IL-2 与 IL-2R β 结合位点的突变能够大幅度提高其对 Treg 与其他免疫细胞的选择性。

表 16. 实验设计表（注：SD: Single dose, 单次给药）

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG	0.5 mg/kg	SD	腹腔注射
2602	0.5 mg/kg	SD	腹腔注射
3079	0.5 mg/kg	SD	腹腔注射
3055	0.5 mg/kg	SD	腹腔注射
3082	0.5 mg/kg	SD	腹腔注射

* h-IgG：购自 Equitech-Bio，批号 161206-0656，1 g/瓶，用 PBS 配制成 10 mg/ml

序列表的描述

SEQ ID NO	名称	描述
1	野生型 IL-2	IL-2 ^{wt} , 具有突变 C125S
2	全长人 IL-2	天然 hIL-2
3	成熟人 IL-2	去除信号肽的天然 hIL-2
4	IL-2 突变体	IL-2 ^{3X} , 具有突变 C125S, R38D, K43E, E61R
5	IL-2R α 受体	IL-2R α 受体, C 末端带 avi 标签和 His6 标签
6	IL-2R β 受体	IL-2R β 受体, C 末端带 avi 标签和 His6 标签
7	IL-2R β -Fc.Knob	C 端连接 Fc-Knob 的 IL-2R β
8	IL-2R γ -Fc.Hole	C 端连接 Fc-Hole 的 IL-2R γ
9	Fc.Knob	带有突变 LALA 以及 Knob 突变 T366W 和 S354C 的人 IgG1 Fc 区, 用于 Format 2
10	Fc.Hole	带有突变 LALA 并带有 hole 突变 Y349C, T366S, L368A, Y407V; 以及铰链区的人 IgG1 Fc 区, 用于 Format 2
11	Fc.Hole	带有突变 LALA 以及 hole 突变 Y349C, T366S, L368A, Y407V; 以及突变 H435R 的人 IgG1 Fc 区, 用于 IL-2 $\beta\gamma$ 复合物
12	突变 Fc 区	带有 LALA 突变的人 IgG1 Fc, 用于 Format 1
13	Y001	IL-2 ^{wt} -GSGS-FcLALA
14	Y002	IL-2 ^{3X} -GSGS-FcLALA
15	Y017	IL-2 ^{hyb15BCL} -GSGS-FcLALA
16	Y057	IL-2 ^{truncate1} -GSGS-FcLALA
17	Y058	IL-2 ^{truncate2} -GSGS-FcLALA
18	Y059	IL-2 ^{truncate3} -GSGS-FcLALA
19	Y060	IL-2 ^{truncate4} -GSGS-FcLALA
20	Y089	IL-2 ^{Y30E1.truncate1} -2*(G4S)-FcLALA
21	Y092	IL-2 ^{Y30E1.15BCL} -2*(G4S)-FcLALA
22	Y144	IL-2 ^{Y30E1.15BCL.T3A} -2*(G4S)-FcLALA
23	Y040	IL-2 ^{3X} -2*(G4S)-FcLALA
24	Y045	IL-2 ^{WT} -2*(G4S)-FcLALA
25	IL-2 ^{15BCL}	具有嵌合环序列 AGDASIH 的 IL-2 突变体
26	IL-2 ^{truncate1}	具有截短环序列 AQSKNFH 的 IL-2 突变体
27	IL-2 ^{Y30E1}	带有 K35E, T37E, R38E, F42A 的 IL-2 突变体
28	IL-2 ^{Y30E1.T3A}	带有 K35E, T37E, R38E, F42A 和 T3A 的 IL-2 突变体
29	IL-2 ^{Y30E1.15BCL.T3A}	带有 K35E, T37E, R38E, F42A 和 T3A 以及嵌合环序列 AGDASIH 的 IL-2 突变体
30	IL-2 ^{Y30E1.truncate1.T3A}	带有 K35E, T37E, R38E, F42A 和 T3A 以及截短环序列 AQSKNFH 的 IL-2 突变体序列
31	IL-2 ^{K35E.T37E.R38E.T3A}	带有 K35E, T37E, R38E, 和 T3A 的 IL-2 突变体序列
32	IL-2 ^{K35E.T37E.R38E.T3A.15BCL}	带有 K35E, T37E, R38E, 和 T3A 以及嵌合环序列 AGDASIH 的 IL-2 突变体序列
33	IL-2 ^{K35E.T37E.R38E.T3A.truncate1}	带有 K35E, T37E, R38E, 和 T3A 以及截短环序列 AQSKNFH 的 IL-2 突变体序列
34	IL-2 ^{15BCL.T3A}	具有 T3A 和嵌合环序列 AGDASIH 的 IL-2 突变体序列
35	IL-2 ^{truncate1.T3A}	具有 T3A 和截短环序列 AQSKNFH 的 IL-2 突变体序列
36-638	-	用于形成二聚体分子的 IL-2 序列

本发明构建的 IL-2 二聚体分子具体描述如下表。其中, "IL-2 序列 SEQ ID NO" 栏给出了分子的 IL-2 部分的氨基酸序列; "IL-2 部分注释" 栏, 通过 "SEQ ID NO:" 栏的氨基酸序列和 "突变" 栏中的突变, 描述所述分子的 IL-2 氨基酸序列由带有所述突变的所述 SEQ ID NO: 氨基酸序列组成; "format 1" 表示分子为同二聚体, 每个单体(从 N 端到 C 端)由所示 IL-2 氨基酸序列、接头序列(G4S)2 和 SEQ ID NO: 12 顺序连接形成; "format 2" 表示分子为异二聚体, 一个单体(从 N 端到 C 端)由所示 IL-2 氨基酸序列、接头序列(G4S)2 和 SEQ ID NO: 9 顺序连接形成, 另一个单体由 SEQ ID NO: 10 组成。

分子_ID		IL-2 部分注释		IL-2 序列	分子_ID		IL-2 部分注释		IL-2 序列
Format 1	Format 2	SEQ ID NO:	突变	SEQ ID NO	Format 1	Format 2	SEQ ID NO:	突变	SEQ ID NO
Y045	2602	SEQ ID NO:1	-	36					
Y30E1	2603	SEQ ID NO:27	-	37	Y144	2688	SEQ ID NO:29	-	122
2003	2604	SEQ ID NO:28	L12R	38	2088	2689	SEQ ID NO:29	L12R	123
2004	2605	SEQ ID NO:28	L12K	39	2089	2690	SEQ ID NO:29	L12K	124
2005	2606	SEQ ID NO:28	L12E	40	2090	2691	SEQ ID NO:29	L12E	125
2006	2607	SEQ ID NO:28	L12Q	41	2091	2692	SEQ ID NO:29	L12Q	126
2007	2608	SEQ ID NO:28	E15Q	42	2092	2693	SEQ ID NO:29	E15Q	127
2008	2609	SEQ ID NO:28	E15R	43	2093	2694	SEQ ID NO:29	E15R	128
2009	2610	SEQ ID NO:28	E15A	44	2094	2695	SEQ ID NO:29	E15A	129
2010	2611	SEQ ID NO:28	E15S	45	2095	2696	SEQ ID NO:29	E15S	130
2011	2612	SEQ ID NO:28	H16N	46	2096	2697	SEQ ID NO:29	H16N	131
2012	2613	SEQ ID NO:28	H16T	47	2097	2698	SEQ ID NO:29	H16T	132
2013	2614	SEQ ID NO:28	H16Y	48	2098	2699	SEQ ID NO:29	H16Y	133
2014	2615	SEQ ID NO:28	H16A	49	2099	2700	SEQ ID NO:29	H16A	134
2015	2616	SEQ ID NO:28	H16E	50	2100	2701	SEQ ID NO:29	H16E	135
2016	2617	SEQ ID NO:28	H16D	51	2101	2702	SEQ ID NO:29	H16D	136
2017	2618	SEQ ID NO:28	H16R	52	2102	2703	SEQ ID NO:29	H16R	137
2018	2619	SEQ ID NO:28	L19D	53	2103	2704	SEQ ID NO:29	L19D	138
2019	2620	SEQ ID NO:28	L19E	54	2104	2705	SEQ ID NO:29	L19E	139
2020	2621	SEQ ID NO:28	L19R	55	2105	2706	SEQ ID NO:29	L19R	140
2021	2622	SEQ ID NO:28	L19S	56	2106	2707	SEQ ID NO:29	L19S	141
2022	2623	SEQ ID NO:28	D20N	57	2107	2708	SEQ ID NO:29	D20N	142
2023	2624	SEQ ID NO:28	D20Q	58	2108	2709	SEQ ID NO:29	D20Q	143
2024	2625	SEQ ID NO:28	D20E	59	2109	2710	SEQ ID NO:29	D20E	144
2025	2626	SEQ ID NO:28	D20A	60	2110	2711	SEQ ID NO:29	D20A	145
2026	2627	SEQ ID NO:28	D20R	61	2111	2712	SEQ ID NO:29	D20R	146
2027	2628	SEQ ID NO:28	D20S	62	2112	2713	SEQ ID NO:29	D20S	147
2028	2629	SEQ ID NO:28	D84N	63	2113	2714	SEQ ID NO:29	D84N	148

2029	2630	SEQ ID NO:28	D84E	64	2114	2715	SEQ ID NO:29	D84E	149
2030	2631	SEQ ID NO:28	D84Q	65	2115	2716	SEQ ID NO:29	D84Q	150
2031	2632	SEQ ID NO:28	D84T	66	2116	2717	SEQ ID NO:29	D84T	151
2032	2633	SEQ ID NO:28	D84S	67	2117	2718	SEQ ID NO:29	D84S	152
2033	2634	SEQ ID NO:28	D84R	68	2118	2719	SEQ ID NO:29	D84R	153
2034	2635	SEQ ID NO:28	D84G	69	2119	2720	SEQ ID NO:29	D84G	154
2035	2636	SEQ ID NO:28	D84M	70	2120	2721	SEQ ID NO:29	D84M	155
2036	2637	SEQ ID NO:28	D84F	71	2121	2722	SEQ ID NO:29	D84F	156
2037	2638	SEQ ID NO:28	D84L	72	2122	2723	SEQ ID NO:29	D84L	157
2038	2639	SEQ ID NO:28	D84K	73	2123	2724	SEQ ID NO:29	D84K	158
2039	2640	SEQ ID NO:28	D84H	74	2124	2725	SEQ ID NO:29	D84H	159
2040	2641	SEQ ID NO:28	S87T	75	2125	2726	SEQ ID NO:29	S87T	160
2041	2642	SEQ ID NO:28	S87R	76	2126	2727	SEQ ID NO:29	S87R	161
2042	2643	SEQ ID NO:28	S87K	77	2127	2728	SEQ ID NO:29	S87K	162
2043	2644	SEQ ID NO:28	S87L	78	2128	2729	SEQ ID NO:29	S87L	163
2044	2645	SEQ ID NO:28	S87M	79	2129	2730	SEQ ID NO:29	S87M	164
2045	2646	SEQ ID NO:28	S87H	80	2130	2731	SEQ ID NO:29	S87H	165
2046	2647	SEQ ID NO:28	N88D	81	2131	2732	SEQ ID NO:29	N88D	166
2047	2648	SEQ ID NO:28	N88T	82	2132	2733	SEQ ID NO:29	N88T	167
2048	2649	SEQ ID NO:28	N88Q	83	2133	2734	SEQ ID NO:29	N88Q	168
2049	2650	SEQ ID NO:28	N88R	84	2134	2735	SEQ ID NO:29	N88R	169
2050	2651	SEQ ID NO:28	N88E	85	2135	2736	SEQ ID NO:29	N88E	170
2051	2652	SEQ ID NO:28	N88K	86	2136	2737	SEQ ID NO:29	N88K	171
2052	2653	SEQ ID NO:28	N88H	87	2137	2738	SEQ ID NO:29	N88H	172
2053	2654	SEQ ID NO:28	N88M	88	2138	2739	SEQ ID NO:29	N88M	173
2054	2655	SEQ ID NO:28	N88S	89	2139	2740	SEQ ID NO:29	N88S	174
2055	2656	SEQ ID NO:28	N88L	90	2140	2741	SEQ ID NO:29	N88L	175
2056	2657	SEQ ID NO:28	V91I	91	2141	2742	SEQ ID NO:29	V91I	176
2057	2658	SEQ ID NO:28	V91L	92	2142	2743	SEQ ID NO:29	V91L	177
2058	2659	SEQ ID NO:28	V91D	93	2143	2744	SEQ ID NO:29	V91D	178
2059	2660	SEQ ID NO:28	V91E	94	2144	2745	SEQ ID NO:29	V91E	179
2060	2661	SEQ ID NO:28	V91N	95	2145	2746	SEQ ID NO:29	V91N	180
2061	2662	SEQ ID NO:28	V91Q	96	2146	2747	SEQ ID NO:29	V91Q	181
2062	2663	SEQ ID NO:28	V91S	97	2147	2748	SEQ ID NO:29	V91S	182
2063	2664	SEQ ID NO:28	V91H	98	2148	2749	SEQ ID NO:29	V91H	183
2064	2665	SEQ ID NO:28	I92E	99	2149	2750	SEQ ID NO:29	I92E	184
2065	2666	SEQ ID NO:28	I92T	100	2150	2751	SEQ ID NO:29	I92T	185
2066	2667	SEQ ID NO:28	I92K	101	2151	2752	SEQ ID NO:29	I92K	186

2067	2668	SEQ ID NO:28	I92R	102	2152	2753	SEQ ID NO:29	I92R	187
2068	2669	SEQ ID NO:28	I92L	103	2153	2754	SEQ ID NO:29	I92L	188
2069	2670	SEQ ID NO:28	E95Q	104	2154	2755	SEQ ID NO:29	E95Q	189
2070	2671	SEQ ID NO:28	E95G	105	2155	2756	SEQ ID NO:29	E95G	190
2071	2672	SEQ ID NO:28	E95D	106	2156	2757	SEQ ID NO:29	E95D	191
2072	2673	SEQ ID NO:28	E95N	107	2157	2758	SEQ ID NO:29	E95N	192
2073	2674	SEQ ID NO:28	Q126E	108	2158	2759	SEQ ID NO:29	Q126E	193
2074	2675	SEQ ID NO:28	Q126D	109	2159	2760	SEQ ID NO:29	Q126D	194
2075	2676	SEQ ID NO:28	Q126A	110	2160	2761	SEQ ID NO:29	Q126A	195
2076	2677	SEQ ID NO:28	Q126S	111	2161	2762	SEQ ID NO:29	Q126S	196
2077	2678	SEQ ID NO:28	D84N+E95Q	112	2162	2763	SEQ ID NO:29	D84N+ E95Q	197
2078	2679	SEQ ID NO:28	D84E+E95Q	113	2163	2764	SEQ ID NO:29	D84E+ E95Q	198
2079	2680	SEQ ID NO:28	D84T+E95Q	114	2164	2765	SEQ ID NO:29	D84T+ E95Q	199
2080	2681	SEQ ID NO:28	D84Q+E95Q	115	2165	2766	SEQ ID NO:29	D84Q+ E95Q	200
2081	2682	SEQ ID NO:28	D84T+H16T	116	2166	2767	SEQ ID NO:29	D84T+ H16T	201
2082	2683	SEQ ID NO:28	D84N+ V91I	117	2167	2768	SEQ ID NO:29	D84N + V91I	202
2083	2684	SEQ ID NO:28	D84T+Q126E	118	2168	2769	SEQ ID NO:29	D84T+ Q126E	203
2084	2685	SEQ ID NO:28	D84N+Q126E	119	2169	2770	SEQ ID NO:29	D84N + Q126E	204
2085	2686	SEQ ID NO:28	H16T+D84Q	120	2170	2771	SEQ ID NO:29	H16T + D84Q	205
2086	2687	SEQ ID NO:28	H16T+V91I	121	2171	2772	SEQ ID NO:29	H16T + V91I	206

分子_ID		IL-2 部分注释		IL-2 序列	分子_ID		IL-2 部分注释		IL-2 序列
Format 1	Format 2	SEQ ID NO:	突变	SEQ ID NO	Format 1	Format 2	SEQ ID NO:	突变	SEQ ID NO
2172	2773	SEQ ID NO: 30		207	2264	2865	SEQ ID NO: 32		299
2173	2774	SEQ ID NO: 30	L12R	208	2265	2866	SEQ ID NO: 32	L12R	300
2174	2775	SEQ ID NO: 30	L12K	209	2266	2867	SEQ ID NO: 32	L12K	301
2175	2776	SEQ ID NO: 30	L12E	210	2267	2868	SEQ ID NO: 32	L12E	302
2176	2777	SEQ ID NO: 30	L12Q	211	2268	2869	SEQ ID NO: 32	L12Q	303
2177	2778	SEQ ID NO: 30	E15Q	212	2269	2870	SEQ ID NO: 32	E15Q	304
2178	2779	SEQ ID NO: 30	E15R	213	2270	2871	SEQ ID NO: 32	E15R	305
2179	2780	SEQ ID NO: 30	E15A	214	2271	2872	SEQ ID NO: 32	E15A	306
2180	2781	SEQ ID NO: 30	E15S	215	2272	2873	SEQ ID NO: 32	E15S	307
2181	2782	SEQ ID NO: 30	H16N	216	2273	2874	SEQ ID NO: 32	H16N	308
2182	2783	SEQ ID NO: 30	H16T	217	2274	2875	SEQ ID NO: 32	H16T	309
2183	2784	SEQ ID NO: 30	H16Y	218	2275	2876	SEQ ID NO: 32	H16Y	310
2184	2785	SEQ ID NO: 30	H16A	219	2276	2877	SEQ ID NO: 32	H16A	311
2185	2786	SEQ ID NO: 30	H16E	220	2277	2878	SEQ ID NO: 32	H16E	312
2186	2787	SEQ ID NO: 30	H16D	221	2278	2879	SEQ ID NO: 32	H16D	313
2187	2788	SEQ ID NO: 30	H16R	222	2279	2880	SEQ ID NO: 32	H16R	314

2188	2789	SEQ ID NO: 30	L19D	223	2280	2881	SEQ ID NO: 32	L19D	315
2189	2790	SEQ ID NO: 30	L19E	224	2281	2882	SEQ ID NO: 32	L19E	316
2190	2791	SEQ ID NO: 30	L19R	225	2282	2883	SEQ ID NO: 32	L19R	317
2191	2792	SEQ ID NO: 30	L19S	226	2283	2884	SEQ ID NO: 32	L19S	318
2192	2793	SEQ ID NO: 30	D20N	227	2284	2885	SEQ ID NO: 32	D20N	319
2193	2794	SEQ ID NO: 30	D20Q	228	2285	2886	SEQ ID NO: 32	D20Q	320
2194	2795	SEQ ID NO: 30	D20E	229	2286	2887	SEQ ID NO: 32	D20E	321
2195	2796	SEQ ID NO: 30	D20A	230	2287	2888	SEQ ID NO: 32	D20A	322
2196	2797	SEQ ID NO: 30	D20R	231	2288	2889	SEQ ID NO: 32	D20R	323
2197	2798	SEQ ID NO: 30	D20S	232	2289	2890	SEQ ID NO: 32	D20S	324
2198	2799	SEQ ID NO: 30	D84N	233	2290	2891	SEQ ID NO: 32	D84N	325
2199	2800	SEQ ID NO: 30	D84E	234	2291	2892	SEQ ID NO: 32	D84E	326
2200	2801	SEQ ID NO: 30	D84Q	235	2292	2893	SEQ ID NO: 32	D84Q	327
2201	2802	SEQ ID NO: 30	D84T	236	2293	2894	SEQ ID NO: 32	D84T	328
2202	2803	SEQ ID NO: 30	D84S	237	2294	2895	SEQ ID NO: 32	D84S	329
2203	2804	SEQ ID NO: 30	D84R	238	2295	2896	SEQ ID NO: 32	D84R	330
2204	2805	SEQ ID NO: 30	D84G	239	2296	2897	SEQ ID NO: 32	D84G	331
2205	2806	SEQ ID NO: 30	D84M	240	2297	2898	SEQ ID NO: 32	D84M	332
2206	2807	SEQ ID NO: 30	D84F	241	2298	2899	SEQ ID NO: 32	D84F	333
2207	2808	SEQ ID NO: 30	D84L	242	2299	2900	SEQ ID NO: 32	D84L	334
2208	2809	SEQ ID NO: 30	D84K	243	2300	2901	SEQ ID NO: 32	D84K	335
2209	2810	SEQ ID NO: 30	D84H	244	2301	2902	SEQ ID NO: 32	D84H	336
2210	2811	SEQ ID NO: 30	S87T	245	2302	2903	SEQ ID NO: 32	S87T	337
2211	2812	SEQ ID NO: 30	S87R	246	2303	2904	SEQ ID NO: 32	S87R	338
2212	2813	SEQ ID NO: 30	S87K	247	2304	2905	SEQ ID NO: 32	S87K	339
2213	2814	SEQ ID NO: 30	S87L	248	2305	2906	SEQ ID NO: 32	S87L	340
2214	2815	SEQ ID NO: 30	S87M	249	2306	2907	SEQ ID NO: 32	S87M	341
2215	2816	SEQ ID NO: 30	S87H	250	2307	2908	SEQ ID NO: 32	S87H	342
2216	2817	SEQ ID NO: 30	N88D	251	2308	2909	SEQ ID NO: 32	N88D	343
2217	2818	SEQ ID NO: 30	N88T	252	2309	2910	SEQ ID NO: 32	N88T	344
2218	2819	SEQ ID NO: 30	N88Q	253	2310	2911	SEQ ID NO: 32	N88Q	345
2219	2820	SEQ ID NO: 30	N88R	254	2311	2912	SEQ ID NO: 32	N88R	346
2220	2821	SEQ ID NO: 30	N88E	255	2312	2913	SEQ ID NO: 32	N88E	347
2221	2822	SEQ ID NO: 30	N88K	256	2313	2914	SEQ ID NO: 32	N88K	348
2222	2823	SEQ ID NO: 30	N88H	257	2314	2915	SEQ ID NO: 32	N88H	349
2223	2824	SEQ ID NO: 30	N88M	258	2315	2916	SEQ ID NO: 32	N88M	350
2224	2825	SEQ ID NO: 30	N88S	259	2316	2917	SEQ ID NO: 32	N88S	351
2225	2826	SEQ ID NO: 30	N88L	260	2317	2918	SEQ ID NO: 32	N88L	352
2226	2827	SEQ ID NO: 30	V91I	261	2318	2919	SEQ ID NO: 32	V91I	353
2227	2828	SEQ ID NO: 30	V91L	262	2319	2920	SEQ ID NO: 32	V91L	354
2228	2829	SEQ ID NO: 30	V91D	263	2320	2921	SEQ ID NO: 32	V91D	355
2229	2830	SEQ ID NO: 30	V91E	264	2321	2922	SEQ ID NO: 32	V91E	356
2230	2831	SEQ ID NO: 30	V91N	265	2322	2923	SEQ ID NO: 32	V91N	357

2231	2832	SEQ ID NO: 30	V91Q	266	2323	2924	SEQ ID NO: 32	V91Q	358
2232	2833	SEQ ID NO: 30	V91S	267	2324	2925	SEQ ID NO: 32	V91S	359
2233	2834	SEQ ID NO: 30	V91H	268	2325	2926	SEQ ID NO: 32	V91H	360
2234	2835	SEQ ID NO: 30	I92E	269	2326	2927	SEQ ID NO: 32	I92E	361
2235	2836	SEQ ID NO: 30	I92T	270	2327	2928	SEQ ID NO: 32	I92T	362
2236	2837	SEQ ID NO: 30	I92K	271	2328	2929	SEQ ID NO: 32	I92K	363
2237	2838	SEQ ID NO: 30	I92R	272	2329	2930	SEQ ID NO: 32	I92R	364
2238	2839	SEQ ID NO: 30	I92L	273	2330	2931	SEQ ID NO: 32	I92L	365
2239	2840	SEQ ID NO: 30	E95Q	274	2331	2932	SEQ ID NO: 32	E95Q	366
2240	2841	SEQ ID NO: 30	E95G	275	2332	2933	SEQ ID NO: 32	E95G	367
2241	2842	SEQ ID NO: 30	E95D	276	2333	2934	SEQ ID NO: 32	E95D	368
2242	2843	SEQ ID NO: 30	E95N	277	2334	2935	SEQ ID NO: 32	E95N	369
2243	2844	SEQ ID NO: 30	Q126E	278	2335	2936	SEQ ID NO: 32	Q126E	370
2244	2845	SEQ ID NO: 30	Q126D	279	2336	2937	SEQ ID NO: 32	Q126D	371
2245	2846	SEQ ID NO: 30	Q126A	280	2337	2938	SEQ ID NO: 32	Q126A	372
2246	2847	SEQ ID NO: 30	Q126S	281	2338	2939	SEQ ID NO: 32	Q126S	373
2247	2848	SEQ ID NO: 30	D84N+E95Q	282	2339	2940	SEQ ID NO: 32	D84N+E95Q	374
2248	2849	SEQ ID NO: 30	D84E+E95Q	283	2340	2941	SEQ ID NO: 32	D84E+E95Q	375
2249	2850	SEQ ID NO: 30	D84T+E95Q	284	2341	2942	SEQ ID NO: 32	D84T+E95Q	376
2250	2851	SEQ ID NO: 30	D84Q+E95Q	285	2342	2943	SEQ ID NO: 32	D84Q+E95Q	377
2251	2852	SEQ ID NO: 30	D84T+H16T	286	2343	2944	SEQ ID NO: 32	D84T+H16T	378
2252	2853	SEQ ID NO: 30	D84N+V91I	287	2344	2945	SEQ ID NO: 32	D84N+V91I	379
2253	2854	SEQ ID NO: 30	D84T+Q126E	288	2345	2946	SEQ ID NO: 32	D84T+Q126E	380
2254	2855	SEQ ID NO: 30	D84N+Q126E	289	2346	2947	SEQ ID NO: 32	D84N+Q126E	381
2255	2856	SEQ ID NO: 30	H16T+D84Q	290	2347	2948	SEQ ID NO: 32	H16T+D84Q	382
2256	2857	SEQ ID NO: 30	H16T+V91I	291	2348	2949	SEQ ID NO: 32	H16T+V91I	383
2257	2858	SEQ ID NO: 31		292					
2258	2859	SEQ ID NO: 31	D84N	293					
2259	2860	SEQ ID NO: 31	D84Q	294					
2260	2861	SEQ ID NO: 31	E95N	295					
2261	2862	SEQ ID NO: 31	D84N+ E95N	296					
2262	2863	SEQ ID NO: 31	H16N	297					
2263	2864	SEQ ID NO: 31	H16N+D84N	298					

分子_ID		IL-2 部分注释		IL-2 序列 SEQ ID NO	分子_ID		IL-2 部分注释		IL-2 序列 SEQ ID NO
Format 1	Format 2	SEQ ID NO:	突变		Format 1	Format 2	SEQ ID NO:	突变	
2349	2950	SEQ ID NO: 33		384	2434	3035	SEQ ID NO: 34		469
2350	2951	SEQ ID NO: 33	L12R	385	2435	3036	SEQ ID NO: 34	L12R	470

2351	2952	SEQ ID NO: 33	L12K	386	2436	3037	SEQ ID NO:34	L12K	471
2352	2953	SEQ ID NO: 33	L12E	387	2437	3038	SEQ ID NO:34	L12E	472
2353	2954	SEQ ID NO: 33	L12Q	388	2438	3039	SEQ ID NO:34	L12Q	473
2354	2955	SEQ ID NO: 33	E15Q	389	2439	3040	SEQ ID NO:34	E15Q	474
2355	2956	SEQ ID NO: 33	E15R	390	2440	3041	SEQ ID NO:34	E15R	475
2356	2957	SEQ ID NO: 33	E15A	391	2441	3042	SEQ ID NO:34	E15A	476
2357	2958	SEQ ID NO: 33	E15S	392	2442	3043	SEQ ID NO:34	E15S	477
2358	2959	SEQ ID NO: 33	H16N	393	2443	3044	SEQ ID NO:34	H16N	478
2359	2960	SEQ ID NO: 33	H16T	394	2444	3045	SEQ ID NO:34	H16T	479
2360	2961	SEQ ID NO: 33	H16Y	395	2445	3046	SEQ ID NO:34	H16Y	480
2361	2962	SEQ ID NO: 33	H16A	396	2446	3047	SEQ ID NO:34	H16A	481
2362	2963	SEQ ID NO: 33	H16E	397	2447	3048	SEQ ID NO:34	H16E	482
2363	2964	SEQ ID NO: 33	H16D	398	2448	3049	SEQ ID NO:34	H16D	483
2364	2965	SEQ ID NO: 33	H16R	399	2449	3050	SEQ ID NO:34	H16R	484
2365	2966	SEQ ID NO: 33	L19D	400	2450	3051	SEQ ID NO:34	L19D	485
2366	2967	SEQ ID NO: 33	L19E	401	2451	3052	SEQ ID NO:34	L19E	486
2367	2968	SEQ ID NO: 33	L19R	402	2452	3053	SEQ ID NO:34	L19R	487
2368	2969	SEQ ID NO: 33	L19S	403	2453	3054	SEQ ID NO:34	L19S	488
2369	2970	SEQ ID NO: 33	D20N	404	2454	3055	SEQ ID NO:34	D20N	489
2370	2971	SEQ ID NO: 33	D20Q	405	2455	3056	SEQ ID NO:34	D20Q	490
2371	2972	SEQ ID NO: 33	D20E	406	2456	3057	SEQ ID NO:34	D20E	491
2372	2973	SEQ ID NO: 33	D20A	407	2457	3058	SEQ ID NO:34	D20A	492
2373	2974	SEQ ID NO: 33	D20R	408	2458	3059	SEQ ID NO:34	D20R	493
2374	2975	SEQ ID NO: 33	D20S	409	2459	3060	SEQ ID NO:34	D20S	494
2375	2976	SEQ ID NO: 33	D84N	410	2460	3061	SEQ ID NO:34	D84N	495
2376	2977	SEQ ID NO: 33	D84E	411	2461	3062	SEQ ID NO:34	D84E	496
2377	2978	SEQ ID NO: 33	D84Q	412	2462	3063	SEQ ID NO:34	D84Q	497
2378	2979	SEQ ID NO: 33	D84T	413	2463	3064	SEQ ID NO:34	D84T	498
2379	2980	SEQ ID NO: 33	D84S	414	2464	3065	SEQ ID NO:34	D84S	499
2380	2981	SEQ ID NO: 33	D84R	415	2465	3066	SEQ ID NO:34	D84R	500
2381	2982	SEQ ID NO: 33	D84G	416	2466	3067	SEQ ID NO:34	D84G	501
2382	2983	SEQ ID NO: 33	D84M	417	2467	3068	SEQ ID NO:34	D84M	502
2383	2984	SEQ ID NO: 33	D84F	418	2468	3069	SEQ ID NO:34	D84F	503
2384	2985	SEQ ID NO: 33	D84L	419	2469	3070	SEQ ID NO:34	D84L	504
2385	2986	SEQ ID NO: 33	D84K	420	2470	3071	SEQ ID NO:34	D84K	505
2386	2987	SEQ ID NO: 33	D84H	421	2471	3072	SEQ ID NO:34	D84H	506
2387	2988	SEQ ID NO: 33	S87T	422	2472	3073	SEQ ID NO:34	S87T	507
2388	2989	SEQ ID NO: 33	S87R	423	2473	3074	SEQ ID NO:34	S87R	508
2389	2990	SEQ ID NO: 33	S87K	424	2474	3075	SEQ ID NO:34	S87K	509
2390	2991	SEQ ID NO: 33	S87L	425	2475	3076	SEQ ID NO:34	S87L	510
2391	2992	SEQ ID NO: 33	S87M	426	2476	3077	SEQ ID NO:34	S87M	511
2392	2993	SEQ ID NO: 33	S87H	427	2477	3078	SEQ ID NO:34	S87H	512
2393	2994	SEQ ID NO: 33	N88D	428	2478	3079	SEQ ID NO:34	N88D	513

2394	2995	SEQ ID NO: 33	N88T	429	2479	3080	SEQ ID NO:34	N88T	514
2395	2996	SEQ ID NO: 33	N88Q	430	2480	3081	SEQ ID NO:34	N88Q	515
2396	2997	SEQ ID NO: 33	N88R	431	2481	3082	SEQ ID NO:34	N88R	516
2397	2998	SEQ ID NO: 33	N88E	432	2482	3083	SEQ ID NO:34	N88E	517
2398	2999	SEQ ID NO: 33	N88K	433	2483	3084	SEQ ID NO:34	N88K	518
2399	3000	SEQ ID NO: 33	N88H	434	2484	3085	SEQ ID NO:34	N88H	519
2400	3001	SEQ ID NO: 33	N88M	435	2485	3086	SEQ ID NO:34	N88M	520
2401	3002	SEQ ID NO: 33	N88S	436	2486	3087	SEQ ID NO:34	N88S	521
2402	3003	SEQ ID NO: 33	N88L	437	2487	3088	SEQ ID NO:34	N88L	522
2403	3004	SEQ ID NO: 33	V91I	438	2488	3089	SEQ ID NO:34	V91I	523
2404	3005	SEQ ID NO: 33	V91L	439	2489	3090	SEQ ID NO:34	V91L	524
2405	3006	SEQ ID NO: 33	V91D	440	2490	3091	SEQ ID NO:34	V91D	525
2406	3007	SEQ ID NO: 33	V91E	441	2491	3092	SEQ ID NO:34	V91E	526
2407	3008	SEQ ID NO: 33	V91N	442	2492	3093	SEQ ID NO:34	V91N	527
2408	3009	SEQ ID NO: 33	V91Q	443	2493	3094	SEQ ID NO:34	V91Q	528
2409	3010	SEQ ID NO: 33	V91S	444	2494	3095	SEQ ID NO:34	V91S	529
2410	3011	SEQ ID NO: 33	V91H	445	2495	3096	SEQ ID NO:34	V91H	530
2411	3012	SEQ ID NO: 33	I92E	446	2496	3097	SEQ ID NO:34	I92E	531
2412	3013	SEQ ID NO: 33	I92T	447	2497	3098	SEQ ID NO:34	I92T	532
2413	3014	SEQ ID NO: 33	I92K	448	2498	3099	SEQ ID NO:34	I92K	533
2414	3015	SEQ ID NO: 33	I92R	449	2499	3100	SEQ ID NO:34	I92R	534
2415	3016	SEQ ID NO: 33	I92L	450	2500	3101	SEQ ID NO:34	I92L	535
2416	3017	SEQ ID NO: 33	E95Q	451	2501	3102	SEQ ID NO:34	E95Q	536
2417	3018	SEQ ID NO: 33	E95G	452	2502	3103	SEQ ID NO:34	E95G	537
2418	3019	SEQ ID NO: 33	E95D	453	2503	3104	SEQ ID NO:34	E95D	538
2419	3020	SEQ ID NO: 33	E95N	454	2504	3105	SEQ ID NO:34	E95N	539
2420	3021	SEQ ID NO: 33	Q126E	455	2505	3106	SEQ ID NO:34	Q126E	540
2421	3022	SEQ ID NO: 33	Q126D	456	2506	3107	SEQ ID NO:34	Q126D	541
2422	3023	SEQ ID NO: 33	Q126A	457	2507	3108	SEQ ID NO:34	Q126A	542
2423	3024	SEQ ID NO: 33	Q126S	458	2508	3109	SEQ ID NO:34	Q126S	543
2424	3025	SEQ ID NO: 33	D84N+E95Q	459	2509	3110	SEQ ID NO:34	D84N+E95Q	544
2425	3026	SEQ ID NO: 33	D84E+E95Q	460	2510	3111	SEQ ID NO:34	D84E+E95Q	545
2426	3027	SEQ ID NO: 33	D84T+E95Q	461	2511	3112	SEQ ID NO:34	D84T+E95Q	546
2427	3028	SEQ ID NO: 33	D84Q+E95Q	462	2512	3113	SEQ ID NO:34	D84Q+E95Q	547
2428	3029	SEQ ID NO: 33	D84T+H16T	463	2513	3114	SEQ ID NO:34	D84T+H16T	548
2429	3030	SEQ ID NO: 33	D84N +V91I	464	2514	3115	SEQ ID NO:34	D84N +V91I	549
2430	3031	SEQ ID NO: 33	D84T+Q126E	465	2515	3116	SEQ ID NO:34	D84T+Q126E	550
2431	3032	SEQ ID NO: 33	D84N+Q126E	466	2516	3117	SEQ ID NO:34	D84N+Q126E	551
2432	3033	SEQ ID NO: 33	H16T +D84Q	467	2517	3118	SEQ ID NO:34	H16T +D84Q	552
2433	3034	SEQ ID NO: 33	H16T +V91I	468	2518	3119	SEQ ID NO:34	H16T +V91I	553

分子_ID		IL-2 部分注释		IL-2 序列 SEQ ID NO	分子_ID		IL-2 部分注释		IL-2 序列 SEQ ID NO
Format 1	Format 2	SEQ ID NO:	突变		Format 1	Format 2	SEQ ID NO:	突变	
2519	3120	SEQ ID NO:35		554	2561	3164	SEQ ID NO:35	N88D	598
2518	3121	SEQ ID NO:35	L12R	555	2562	3165	SEQ ID NO:35	N88T	599
2519	3122	SEQ ID NO:35	L12K	556	2563	3166	SEQ ID NO:35	N88Q	600
2520	3123	SEQ ID NO:35	L12E	557	2564	3167	SEQ ID NO:35	N88R	601
2521	3124	SEQ ID NO:35	L12Q	558	2565	3168	SEQ ID NO:35	N88E	602
2522	3125	SEQ ID NO:35	E15Q	559	2566	3169	SEQ ID NO:35	N88K	603
2523	3126	SEQ ID NO:35	E15R	560	2567	3170	SEQ ID NO:35	N88H	604
2524	3127	SEQ ID NO:35	E15A	561	2568	3171	SEQ ID NO:35	N88M	605
2525	3128	SEQ ID NO:35	E15S	562	2569	3172	SEQ ID NO:35	N88S	606
2526	3129	SEQ ID NO:35	H16N	563	2570	3173	SEQ ID NO:35	N88L	607
2527	3130	SEQ ID NO:35	H16T	564	2571	3174	SEQ ID NO:35	V91I	608
2528	3131	SEQ ID NO:35	H16Y	565	2572	3175	SEQ ID NO:35	V91L	609
2529	3132	SEQ ID NO:35	H16A	566	2573	3176	SEQ ID NO:35	V91D	610
2530	3133	SEQ ID NO:35	H16E	567	2574	3177	SEQ ID NO:35	V91E	611
2531	3134	SEQ ID NO:35	H16D	568	2575	3178	SEQ ID NO:35	V91N	612
2532	3135	SEQ ID NO:35	H16R	569	2576	3179	SEQ ID NO:35	V91Q	613
2533	3136	SEQ ID NO:35	L19D	570	2577	3180	SEQ ID NO:35	V91S	614
2534	3137	SEQ ID NO:35	L19E	571	2578	3181	SEQ ID NO:35	V91H	615
2535	3138	SEQ ID NO:35	L19R	572	2579	3182	SEQ ID NO:35	I92E	616
2536	3139	SEQ ID NO:35	L19S	573	2580	3183	SEQ ID NO:35	I92T	617
2537	3140	SEQ ID NO:35	D20N	574	2581	3184	SEQ ID NO:35	I92K	618
2538	3141	SEQ ID NO:35	D20Q	575	2582	3185	SEQ ID NO:35	I92R	619
2539	3142	SEQ ID NO:35	D20E	576	2583	3186	SEQ ID NO:35	I92L	620
2540	3143	SEQ ID NO:35	D20A	577	2584	3187	SEQ ID NO:35	E95Q	621
2541	3144	SEQ ID NO:35	D20R	578	2585	3188	SEQ ID NO:35	E95G	622
2542	3145	SEQ ID NO:35	D20S	579	2586	3189	SEQ ID NO:35	E95D	623
2543	3146	SEQ ID NO:35	D84N	580	2587	3190	SEQ ID NO:35	E95N	624
2544	3147	SEQ ID NO:35	D84E	581	2588	3191	SEQ ID NO:35	Q126E	625
2545	3148	SEQ ID NO:35	D84Q	582	2589	3192	SEQ ID NO:35	Q126D	626
2546	3149	SEQ ID NO:35	D84T	583	2590	3193	SEQ ID NO:35	Q126A	627
2547	3150	SEQ ID NO:35	D84S	584	2591	3194	SEQ ID NO:35	Q126S	628
2548	3151	SEQ ID NO:35	D84R	585	2592	3195	SEQ ID NO:35	D84N+E95Q	629
2549	3152	SEQ ID NO:35	D84G	586	2593	3196	SEQ ID NO:35	D84E+E95Q	630
2550	3153	SEQ ID NO:35	D84M	587	2594	3197	SEQ ID NO:35	D84T+E95Q	631
2551	3154	SEQ ID NO:35	D84F	588	2595	3198	SEQ ID NO:35	D84Q+E95Q	632
2552	3155	SEQ ID NO:35	D84L	589	2596	3199	SEQ ID NO:35	D84T+H16T	633

2553	3156	SEQ ID NO:35	D84K	590	2597	3200	SEQ ID NO:35	D84N +V91I	634
2554	3157	SEQ ID NO:35	D84H	591	2598	3201	SEQ ID NO:35	D84T+Q126E	635
2555	3158	SEQ ID NO:35	S87T	592	2599	3202	SEQ ID NO:35	D84N+Q126E	636
2556	3159	SEQ ID NO:35	S87R	593	2600	3203	SEQ ID NO:35	H16T +D84Q	637
2557	3160	SEQ ID NO:35	S87K	594	2601	3204	SEQ ID NO:35	H16T +V91I	638
2558	3161	SEQ ID NO:35	S87L	595					
2559	3162	SEQ ID NO:35	S87M	596					
2560	3163	SEQ ID NO:35	S87H	597					

权利要求

1. 一种 IL-2 突变蛋白，其中所述突变蛋白，与野生型 IL-2(优选人 IL-2，更优选包含 SEQ ID NO: 1 序列的 IL-2)相比，包含突变：

(i) 在 IL-2 与 IL-2R α 结合界面上，尤其是在选自位置 35, 37, 38, 41, 42, 43, 45, 61, 68 和 72 的至少一个位置上，具有改变 (例如消除或降低) 对 IL-2R α 受体的结合亲和力的突变；

和/或

(ii) 缩短的 B'C' 环区 (即，连接氨基酸残基 aa72 和 aa84 的序列)，优选地，所述缩短的环区具有小于 10, 9, 8, 7, 6, 或 5 个的氨基酸长度，且优选 7 个氨基酸长度；优选地，所述缩短的 B'C' 环区导致改善的蛋白表达量和/或纯度，

且包含突变：

(iii) 在 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面上，尤其是在选自位置 12, 15, 16, 19, 20, 84, 87, 88, 91, 92, 95, 126 的至少一个位置上，具有弱化对 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合的突变；

其中氨基酸位置根据 SEQ ID NO: 1 编号，

优选地，所述突变蛋白包含突变(i)和(iii) 或包含突变(ii)和(iii)，或包含突变(i)、(ii)和(iii)，

更优选地，所述突变蛋白包含突变(ii)和(iii)但不包含突变(i)。

2. 权利要求 1 的突变蛋白，其中，所述 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面的突变(iii)包含选自以下的突变：

L12R; L12K; L12E; L12Q; E15Q; E15R; E15A; E15S; H16N; H16T; H16Y; H16A; H16E; H16D; H16R; L19D; L19E; L19R; L19S; D20N; D20Q; D20E; D20A; D20R; D20S; D84N; D84E; D84Q; D84T; D84S; D84R; D84G; D84M; D84F; D84L; D84K; D84H; S87T; S87R; S87K; S87L; S87M; S87H; N88D; N88T; N88Q; N88R; N88E; N88K; N88H; N88M; N88S; N88L; V91I; V91L; V91D; V91E; V91N; V91Q; V91S; V91H; I92E; I92T; I92K; I92R; I92L; E95Q; E95G; E95D; E95N; Q126E; Q126D; Q126A; Q126S; D84N+E95Q; D84E+E95Q; D84T+E95Q; D84Q+E95Q ; D84T+H16T; D84N+V91I; D84T+Q126E; D84N+Q126E; H16T+D84Q; H16T+V91I;

优选地，所述 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面的突变(iii)包含选自以下的突变：

D20N; D84E; D84N; D84N+E95Q; D84N+Q126E; D84N+V91I; D84Q; D84T; D84T+H16T; D84T+Q126E; E15Q; E95N; E95Q; H16N; H16N+D84N; H16T; H16T+D84Q; H16T+V91I; N88D; N88R; N88Q; N88T; Q126E; V91I;

再优选地，所述 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面的突变(iii)包含

- 选自以下的突变： D84N; E95Q; H16N; 或

- 选自以下的突变： D84Q; H16T+V91I; 或

- 选自以下的突变： D84T; Q126E; D84N+V91I; D84N+E95Q; 或

- 选自以下的突变： N88D; N88R; D20N; D84N; D84N+E95Q; D84T+H16T; D84T+Q126E; D84N+Q126E; H16T+D84Q; 或

-选自以下的突变：D84N 或 D84N+ E95Q；

再优选地，所述 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面的突变(iii)包含 N88D 或 D20N 或 N88R。

3. 前述权利要求之任一项的突变蛋白，其中，所述突变(i) 包含突变组合 K35E+T37E+R38E+F42A，或突变组合 K35E+T37E+R38E，或突变 F42A；

优选地，所述突变(i)包含突变组合 K35E+T37E+R38E+F42A。

4. 前述权利要求之任一项的突变蛋白，其中，所述突变(ii)包括：

(a) 对 B'C'环区的 aa74 至 aa83 的替代，例如替代为来自四螺旋短链细胞因子 IL 家族成员的短 B'C'环序列，如 IL15 的 B'C'环序列，优选地替代为序列 GDASIH；或

(b) 对 B'C'环区的 aa74 至 aa83 的截短，例如自 C 端截短 1、2、3 或 4 个氨基酸；优选地截短为序列(Q/G)SKN(F/I)H，更优选地，截短为选自以下的序列：

B'C'loop 序列
QSKNFH
GSKNFH
QSANFH
QSANIH

5. 前述权利要求之任一项的突变蛋白，其中所述突变蛋白，相对于野生型 IL-2，包含：

(i) 突变组合 K35E+T37E+R38E+F42A；

(ii) B'C'环区序列：AQSKNFH；或 AGDASIH 或 SGDASIH；

(iii) 选自以下的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变：

D20N；D84E；D84N；D84N+E95Q；D84N+Q126E；D84N+V91I；D84Q；D84T；D84T+H16T；D84T+Q126E；E15Q；E95N；E95Q；H16N；H16N+D84N；H16T；H16T+D84Q；H16T+V91I；N88D；N88R；N88Q；N88T；Q126E；V91I

更优选地，所述 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变：

- 选自 D84N；E95Q；H16N；或

- 选自 D84T；Q126E；D84N+V91I；D84N+E95Q；或

- 选自 N88D；N88R；D20N；D84N+ E95Q；D84T+ H16T；D84T+

Q126E；D84N+ Q126E；H16T+ D84Q；

以及任选地，(iv) 突变 T3A。

6. 前述权利要求之任一项的突变蛋白，其中所述突变蛋白，相对于野生型 IL-2，保持对 IL-2R α 受体的结合，且包含：

(ii) B'C'环区序列：AQSKNFH；或 AGDASIH 或 SGDASIH，尤其是 AGDASIH；

(iii) 选自以下的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变：

D20N；D84E；D84N；D84N+E95Q；D84N+Q126E；D84N+V91I；D84Q；D84T；D84T+H16T；D84T+Q126E；E15Q；E95N；E95Q；H16N；H16N+D84N；H16T；H16T+D84Q；H16T+V91I；N88D；N88R；N88Q；N88T；Q126E；V91I

更优选地，所述 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变选自：D20N 或 N88D 或 N88R；

以及任选地，(iv) 突变 T3A。

7. 权利要求 1-6 的突变蛋白，其中所述突变蛋白，相对于野生型 IL-2，还包含不超过 0-5 个氨基酸突变；优选地所述突变蛋白包含 C125S 或 C125A 突变。

8. 权利要求 1-7 的突变蛋白, 其中所述突变蛋白包含

-与选自 SEQ ID NO: 37-638(尤其是 SEQ ID NO: 148 或 197 或 SEQ ID NO: 489, 513、516)的氨基酸序列具有至少 90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、或 98%的同一性的氨基酸序列;

-选自 SEQ ID NO: 37-638(尤其 SEQ ID NO: 148 或 197 或 SEQ ID NO: 489, 513、516)的氨基酸序列。

9. 权利要求 1-8 的突变蛋白, 其中所述突变蛋白, 与引入突变(iii)进行弱化前相比, 具有降低的对 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合亲和力,

且所述突变蛋白具有选自以下的至少一项或两项特性:

-与野生型 IL-2 相比, 保持 IL-2R α 结合, 或

-与野生型 IL-2 相比, 在哺乳动物细胞(例如 293 细胞或 CHO 细胞)中表达时, 例如以 Fc 融合蛋白形式表达时, 改善的表达量和/或易于纯化至更高的纯度(例如, 一步亲和层析后, 通过 SEC-HPLC 检测, 具有更高的纯度)。

10. 一种 IL-2 突变蛋白融合蛋白, 其包含根据权利要求 1-9 的 IL2 突变蛋白。

11. 权利要求 10 的融合蛋白, 其中所述 IL-2 突变蛋白与 Fc 抗体片段(例如人 IgG1 Fc)融合,

优选地所述 IL-2 突变蛋白通过接头与 Fc 融合, 所述接头优选为 GSGS, 更优选为 (G4S)₂,

优选地所述 Fc 片段包含降低或消除 Fc 与 Fc γ R 结合的突变, 例如 L234A+L235A,

优选地所述 Fc 片段与 SEQ ID NO: 12 至少 85%, 至少 95%, 至少 96%或 100%的同一性的氨基酸序列。

12. 权利要求 11 的融合蛋白, 其中所述 Fc 片段包含 Knob 突变, 例如突变 T366W 和 S354C; 或所述 Fc 片段包含 Hole 突变, 例如突变 Y349C、T366S、L368A、Y407V。

13. 一种 IL-2-Fc 二聚体蛋白, 其包含权利要求 11 或 12 的 IL-2 突变蛋白融合蛋白,

优选地, 所述二聚体蛋白, 相比于包含野生型 IL-2-Fc 融合蛋白的相应二聚体蛋白, 具有以下特性之一或多项:

-在哺乳动物细胞(例如 CHO 或 HEK293 细胞)中表达时, 表达量和/或纯度增加;

-体内施用时无毒性, 例如通过测定施用后动物体重或体重变化来确定;

-更优的抗肿瘤功效。

14. 权利要求 13 的 IL-2-Fc 二聚体蛋白, 其是同二聚体, 其中第一单体和第二单体分别由自 N 端到 C 端包含: i) IL-2 突变蛋白; ii)接头; 和 iii) Fc 片段,

优选地每个单体包含在 C 端通过接头(G4S)₂ 连接 SEQ ID NO: 12 氨基酸序列的、选自 SEQ ID NO: 37-638 的 IL-2 突变蛋白。

15. 权利要求 13 的 IL-2-Fc 二聚体蛋白, 其是异二聚体, 包含:

a)第一单体, 其中所述第一单体自 N 端到 C 端包含: i)IL-2 突变蛋白; ii)接头; 和 iii)第一 Fc 片段; 和

b)第二单体, 其中所述第二单体包含第二 Fc 片段以及任选地 IgG1 铰链区;

优选地, 第一Fc片段和第二Fc片段分别包含促进第一单体与第二单体形成异二聚体的第一和第二异二聚化突变,

优选地, 第一和第二异二聚化突变包含 Knob : Hole 突变组合 T366W/S354C: Y349C/T366S/L368A/Y407V;

优选地, 第一Fc片段上的第一异二聚体突变包含 Knob 突变, 第二Fc片段的第二异二聚体突变包含 Hole 突变; 或者, 第一Fc片段上的第一异二聚体突变包含 Hole 突变, 第二Fc片段的第二异二聚体突变包含 Knob 突变;

优选地, 第一单体包含在C端通过接头(G4S)₂连接 SEQ ID NO: 9 氨基酸序列的、选自 SEQ ID NO: 37-638 的 IL-2 突变蛋白; 且第二单体包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列。

16. 一种免疫缀合物, 其包含权利要求 1-9 的 IL2 突变蛋白和抗原结合分子, 优选地, 抗原结合分子是免疫球蛋白分子, 特别是 IgG 分子, 或抗体、或抗体片段, 特别是 Fab 分子和 scFv 分子。

17. 一种分离的多核苷酸, 其编码权利要求 1-9 的 IL-2 突变蛋白或权利要求 10-12 的融合蛋白或权利要求 13-15 的 IL-2-Fc 二聚体蛋白或权利要求 16 的免疫缀合物。

18. 一种表达载体, 其包含权利要求 17 的多核苷酸。

19. 一种宿主细胞, 其包含权利要求 17 的多核苷酸或权利要求 18 的载体, 优选所述宿主细胞是哺乳动物细胞, 特别是 HEK293 细胞或 CHO 细胞, 和酵母。

20. 一种用于生产权利要求 1-9 的 IL-2 突变蛋白或权利要求 10-12 的融合蛋白或权利要求 13-15 的 IL-2-Fc 二聚体蛋白或权利要求 16 的免疫缀合物方法, 包括, 在适于表达所述 IL-2 突变蛋白或融合蛋白或 IL-2-Fc 二聚体蛋白或免疫缀合物的条件下, 培养权利要求 19 的宿主细胞。

21. 一种药物组合物, 其包含权利要求 1-9 的 IL-2 突变蛋白或权利要求 10-12 的融合蛋白或权利要求 13-15 的 IL-2-Fc 二聚体蛋白或权利要求 16 的免疫缀合物和药学可接受载体。

22. 一种治疗受试者疾病的方法, 所述方法包括, 向所述受试者施用权利要求 1-9 的 IL-2 突变蛋白或权利要求 10-12 的融合蛋白或权利要求 13-15 的 IL-2-Fc 二聚体蛋白或权利要求 16 的免疫缀合物或权利要求 21 的药物组合物, 优选地, 所述疾病是癌症或自身免疫病。

23. 一种刺激受试者免疫系统的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求 1-9 的 IL-2 突变蛋白或权利要求 10-12 的融合蛋白或权利要求 13-15 的 IL-2-Fc 二聚体蛋白或权利要求 16 的免疫缀合物或权利要求 21 的药物组合物。

24. 一种用于获得 IL-2 突变蛋白的方法, 其中所述方法包括如下步骤:

-在 IL-2 的 B'C' 环区通过突变以缩短该环区序列, 以及任选地在 IL-2 与 IL-2R β γ 结合界面引入一个或多个突变和/或在 IL-2 与 IL-2Ra 的结合界面引入一个或多个突变,

-在哺乳动物细胞(例如 HEK293 或者 CHO 细胞)中表达 IL-2 突变蛋白, 例如以 Fc 融合物形式(例如 FcLALA 融合物),

或者所述方法包括如下步骤:

-在 IL-2 与 IL-2R β γ 结合界面引入一个或多个突变, 以及任选地在 IL-2 的 B'C' 环区通过突变以缩短该环区序列和/或在 IL-2 与 IL-2Ra 的结合界面引入一个或多个突变, 优选地不在 IL-2 与 IL-2Ra 的结合界面引入突变,

-在哺乳动物细胞(例如 HEK293 或者 CHO 细胞)中表达 IL-2 突变蛋白, 例如以 Fc 融合物形式(例如 FcLALA 融合物),

优选地, 所述缩短的环区具有小于 10, 9, 8, 7, 6, 或 5 个的氨基酸长度, 且优选 7 个氨基酸长度,

更优选地所述 B'C' 环区突变包括:

(a) 对 B'C' 环区的 aa74 至 aa83 的替代, 例如替代为来自四螺旋短链细胞因子 IL 家族成员的短 B'C' 环序列, 如 IL15 的 B'C' 环序列, 优选地替代序列包括 GDASIH; 或

(b) 对 B'C' 环区的 aa74 至 aa83 的截短, 例如自 C 端截短 1、2、3 或 4 个氨基酸; 优选地截短为序列(Q/G)SKN(F/I)H, 更优选地, 截短为选自以下的序列:

B'C'loop 序列
QSKNFH
GSKNFH
QSANFH
QSANIH

优选地, 所述 IL-2R β γ 结合界面突变包括权利要求 1 或 2 中描述的 IL-2R β γ 结合界面突变;

优选地, 所述 IL-2R α 结合界面突变包括权利要求 1 或 3 中描述的 IL-2R α 结合界面突变;

优选地, 所述突变蛋白具有如下改善的性质之一或其任何组合: (i) 改善的表达量和/或蛋白纯度 (例如, 通过 SEC-HPLC 检测, 一步亲和层析后的纯度); (ii) 弱化的 IL2R β 结合和/或(iii)改变的 IL-2Ra 结合, 优选地具有(i)和(ii)的性质。

25. 一种 IL-2 蛋白 B'C' 环区改造方法, 所述方法包括:

(a) 对 B'C' 环区的 aa74 至 aa83 的替代, 例如替代为来自四螺旋短链细胞因子 IL 家族成员的短 B'C' 环序列, 如 IL15 的 B'C' 环序列, 优选地替代序列包括 GDASIH; 或

(b) 对 B'C' 环区的 aa73 至 aa83 的替代, 例如替代为来自四螺旋短链细胞因子 IL 家族成员的短 B'C' 环序列, 如 IL15 的 B'C' 环序列, 优选地替代序列包括 AGDASIH; 或

(c) 对 B'C' 环区的 aa74 至 aa83 的截短, 例如自 C 端截短 1、2、3 或 4 个氨基酸; 优选地截短为序列(Q/G)S(K/A/D)N(F/I)H, 更优选地, 截短为选自以下的序列:

B'C'loop 序列
QSKNFH
GSKNFH
QSANFH
QSANIH
QSANFH
QSDNFH

26. 一种 IL-2 蛋白, 由权利要求 25 所述方法改造得到。

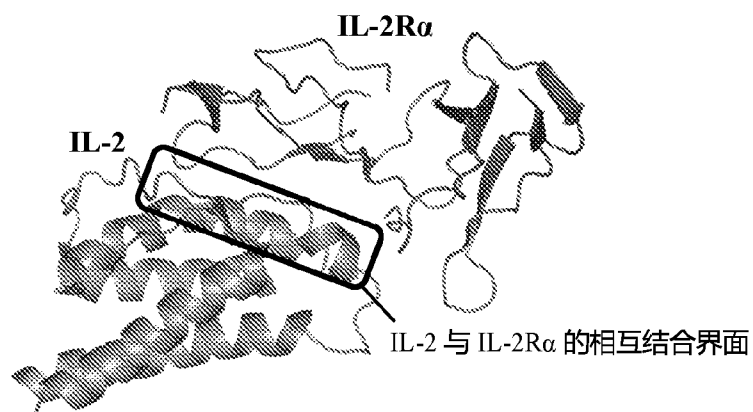
IL-2 与 IL-2R α 复合物的晶体结构

图 1

IL-2 晶体结构(PBD:2ERJ)

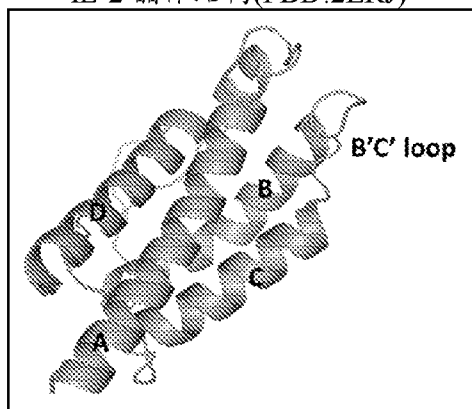


图 2A

人 IL-2 和人 IL-15 的 B'C'loop 结构 superpose

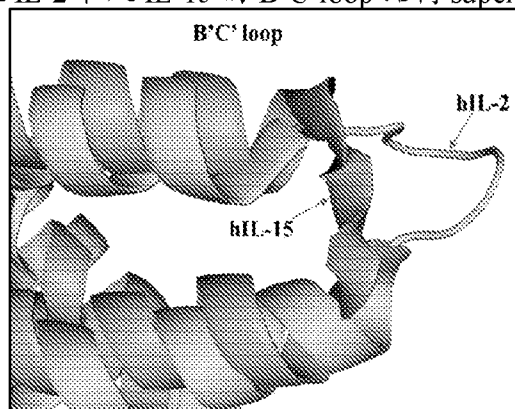


图 2B

包含 CD25 结合界面突变的 IL-2 突变体

克隆编号	35	37	38	41	42	43	45	61	62	68	72
IL-2 ^{WT}	K	T	R	T	F	K	Y	E	E	E	L
Y29A2	D	T	E	E	F	E	Y	E	E	E	L
Y29A5	D	E	D	T	F	E	Y	E	E	E	F
Y29A6	E	T	D	E	F	E	Y	K	E	E	F
Y29B2	E	D	W	T	Q	K	K	K	E	R	L
Y29C5	E	D	D	T	F	E	Y	E	E	E	F
Y29D2	D	E	D	E	F	E	Y	E	E	E	F
Y29D6	D	E	D	T	F	Y	K	E	E	E	F
Y30B1	E	T	E	E	F	Y	K	E	E	E	F
Y30E1	E	E	E	T	A	K	Y	E	E	E	L

图 3

IL-2 与 IL-2Rβγ 的晶体结构

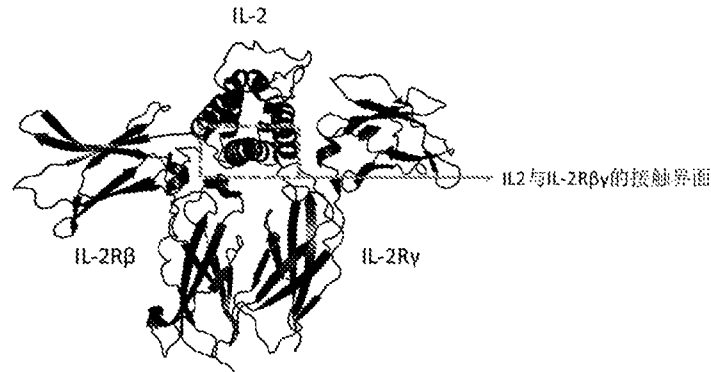


图 4.

IL-2-Fc 二聚体分子模式

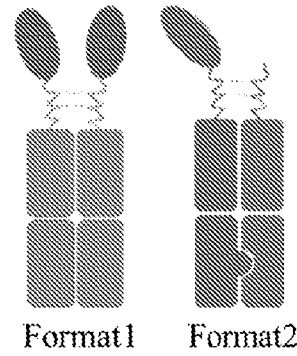


图 5

IL-2 弱化分子结构

分子 ID	分子注释	分 子 format	相对于 IL-2 ^{WT} 的突变			
			IL-2R β 结合界面	IL-2R α 结合界面	B'C'Loop 序列	其 它 突 变
Y045	IL-2 ^{WT}	Format 1	-	-	-	-
Y144	Y30E1+IL-15 BCL	format 1	-	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2688	Y30E1+IL-15 BCL	format 2	-	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2113	D84N	format 1	D84N	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2714	D84N	format 2	D84N	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2131	N88D	format 1	N88D	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2732	N88D	format 2	N88D	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2154	E95Q	format 1	E95Q	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2755	E95Q	format 2	E95Q	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2162	D84N, E95Q	format 1	D84N, E95Q	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2763	D84N, E95Q	format 2	D84N, E95Q	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2114	D84E	format 1	D84E	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2115	D84Q	format 1	D84Q	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2116	D84T	format 1	D84T	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2132	N88T	format 1	N88T	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2133	N88Q	format 1	N88Q	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2141	V91I	format 1	V91I	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2092	E15Q	format 1	E15Q	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2158	Q126E	format 1	Q126E	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2107	D20N	format 1	D20N	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2096	H16N	format 1	H16N	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2097	H16T	format 1	H16T	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2166	D84T, H16T	format 1	D84T, H16T	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2167	D84N, V91I	format 1	D84N, V91I	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2168	D84T, Q126E	format 1	D84T, Q126E	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2169	D84N, Q126E	format 1	D84N, Q126E	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2170	H16T, D84Q	format 1	H16T, D84Q	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2171	H16T, V91I	format 1	H16T, V91I	K35E, T37E, R38E, F42A	AGDASIH	T3A
2172	Y30E1+BCL truncate	format 1	-	K35E, T37E, R38E, F42A	AQSKNFH	T3A
2257	3 mutations	format 1	-	K35E, T37E, R38E	-	T3A
2258	D84N	format 1	D84N	K35E, T37E, R38E	-	T3A
2259	D84Q	format 1	D84Q	K35E, T37E, R38E	-	T3A
2260	E95N	format 1	E95N	K35E, T37E, R38E	-	T3A
2262	H16N	format 1	H16N	K35E, T37E, R38E	-	T3A
2263	H16N, D84N	format 1	H16N, D84N	K35E, T37E, R38E	-	T3A
2478	N88D	format 1	N88D	-	AGDASIH	T3A
3079	N88D	format 2	N88D	-	AGDASIH	T3A
2454	D20N	format 1	D20N	-	AGDASIH	T3A
3055	D20N	format 2	D20N	-	AGDASIH	T3A
2481	N88R	format 1	N88R	-	AGDASIH	T3A
3082	N88R	format 2	N88R	-	AGDASIH	T3A

图 6

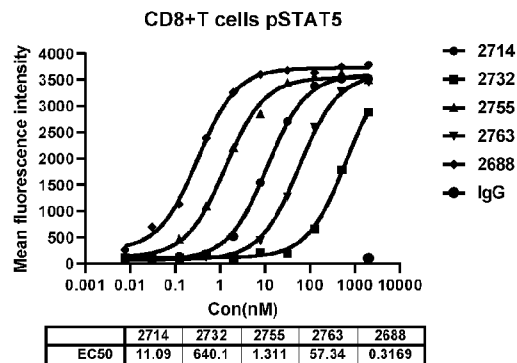
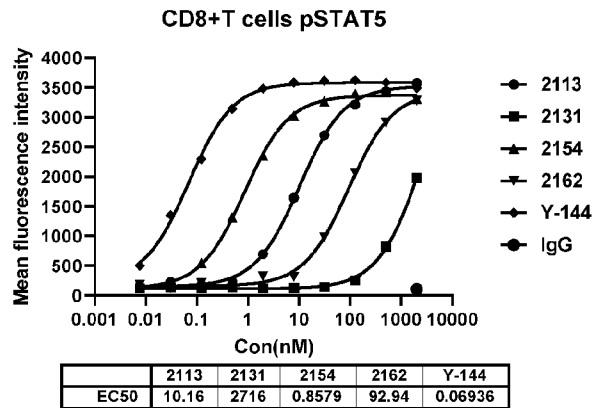
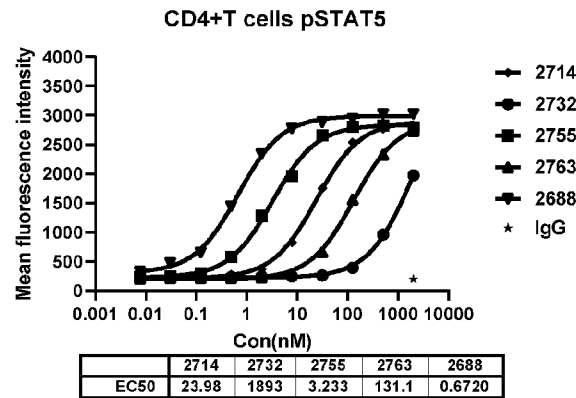
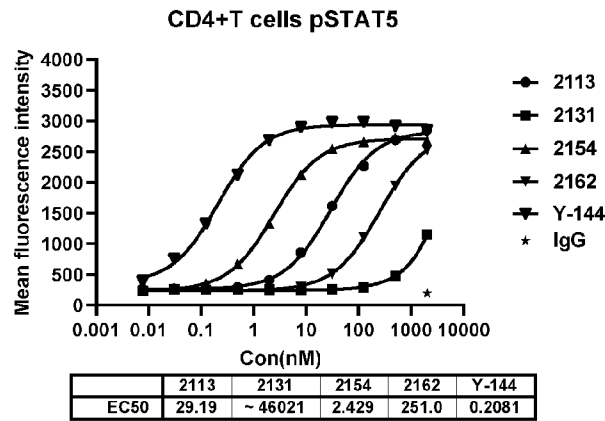
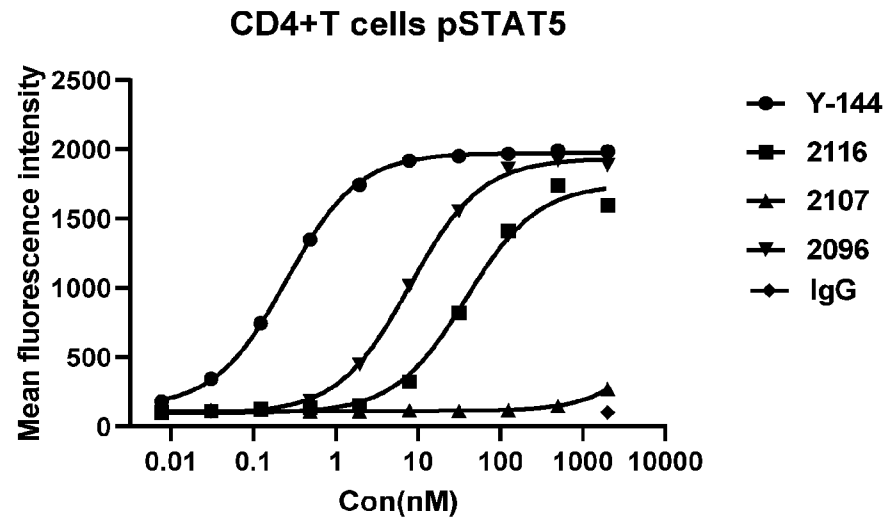
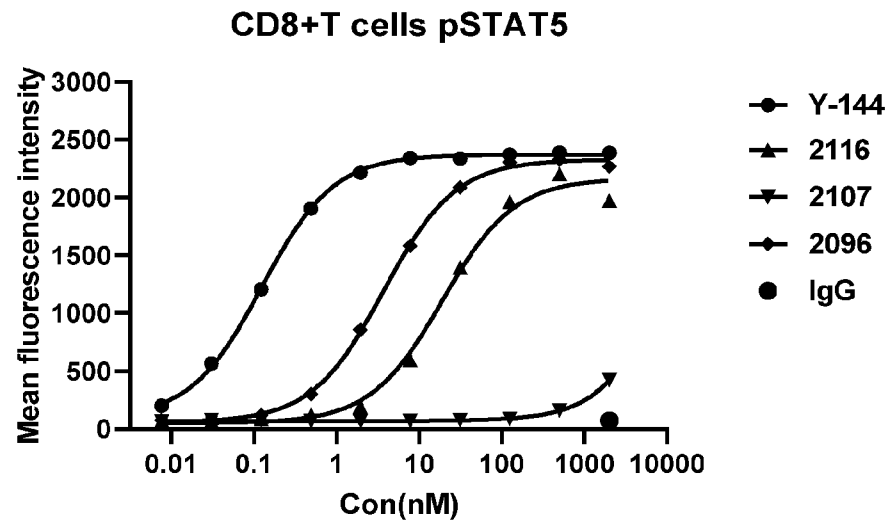


图 7A



	Y-144	2116	2107	2096
EC50	0.2526	38.15	~ 6939503	7.900



	Y-144	2116	2107	2096
EC50	0.1250	19.06	~ 5411647	3.712

图 7B

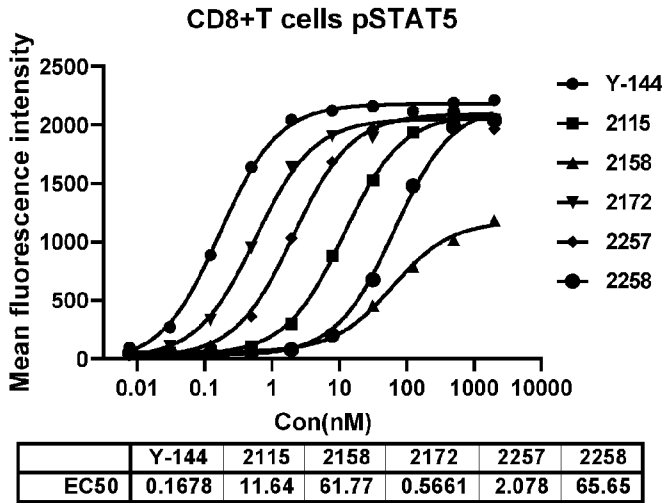
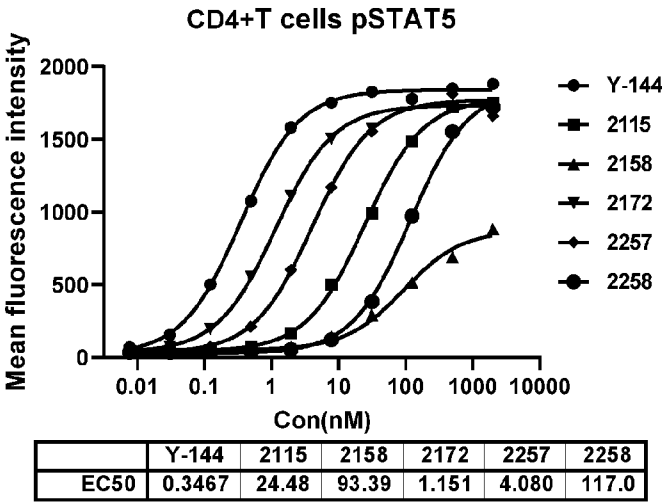


图 7C

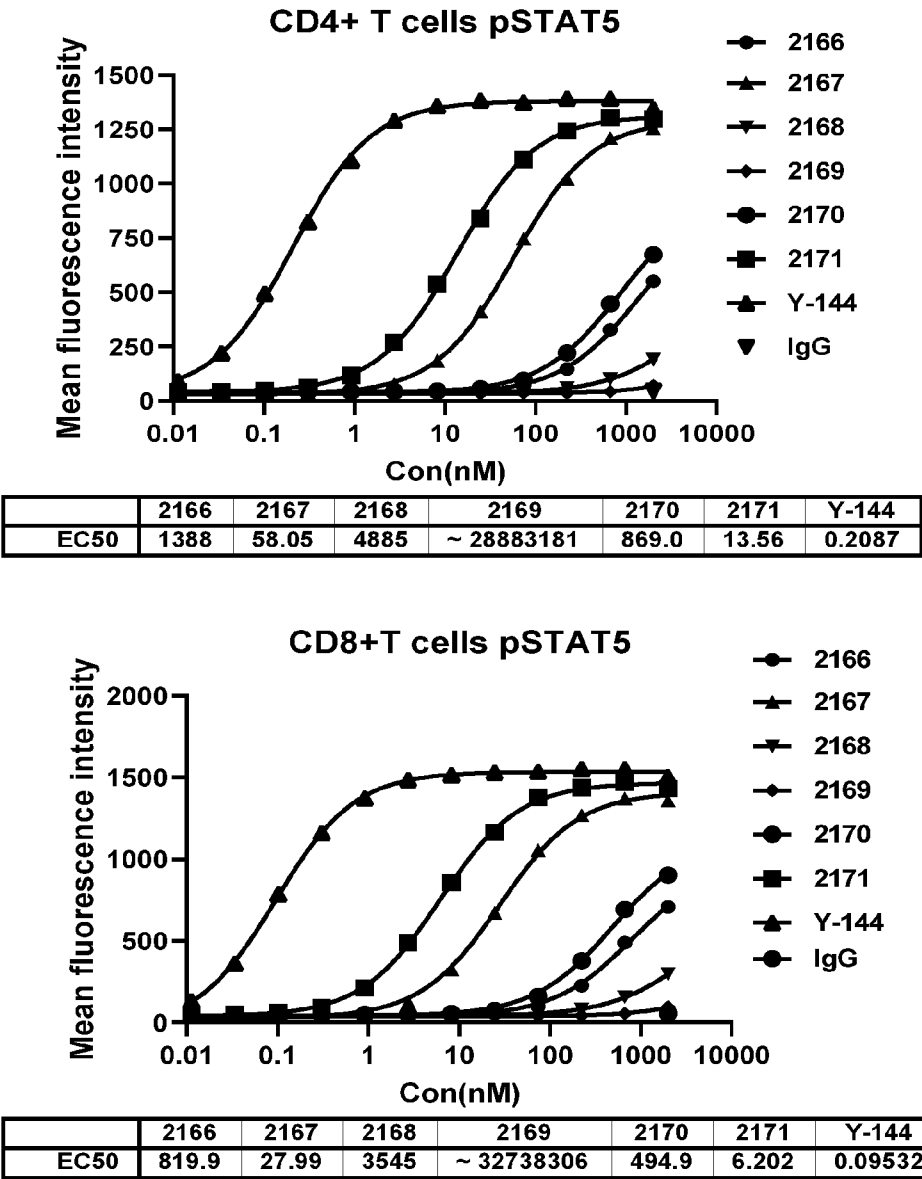


图 7D

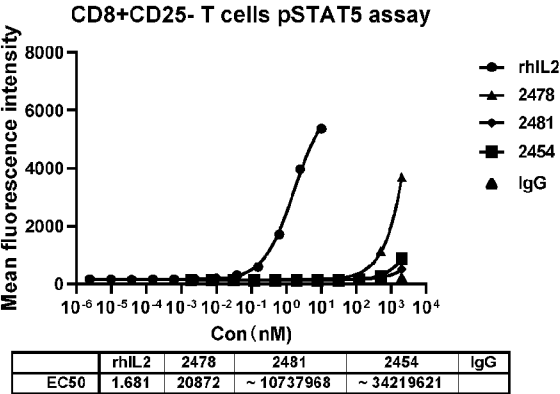
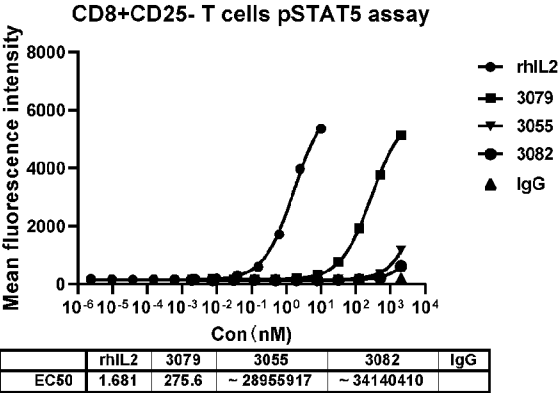
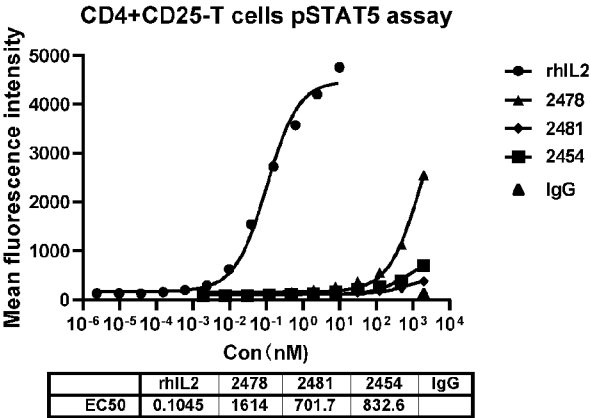
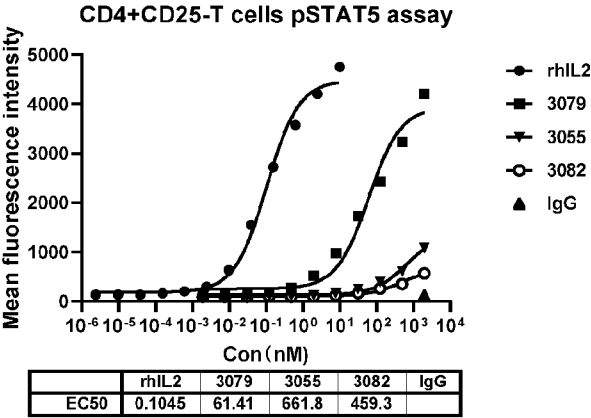


图 7E

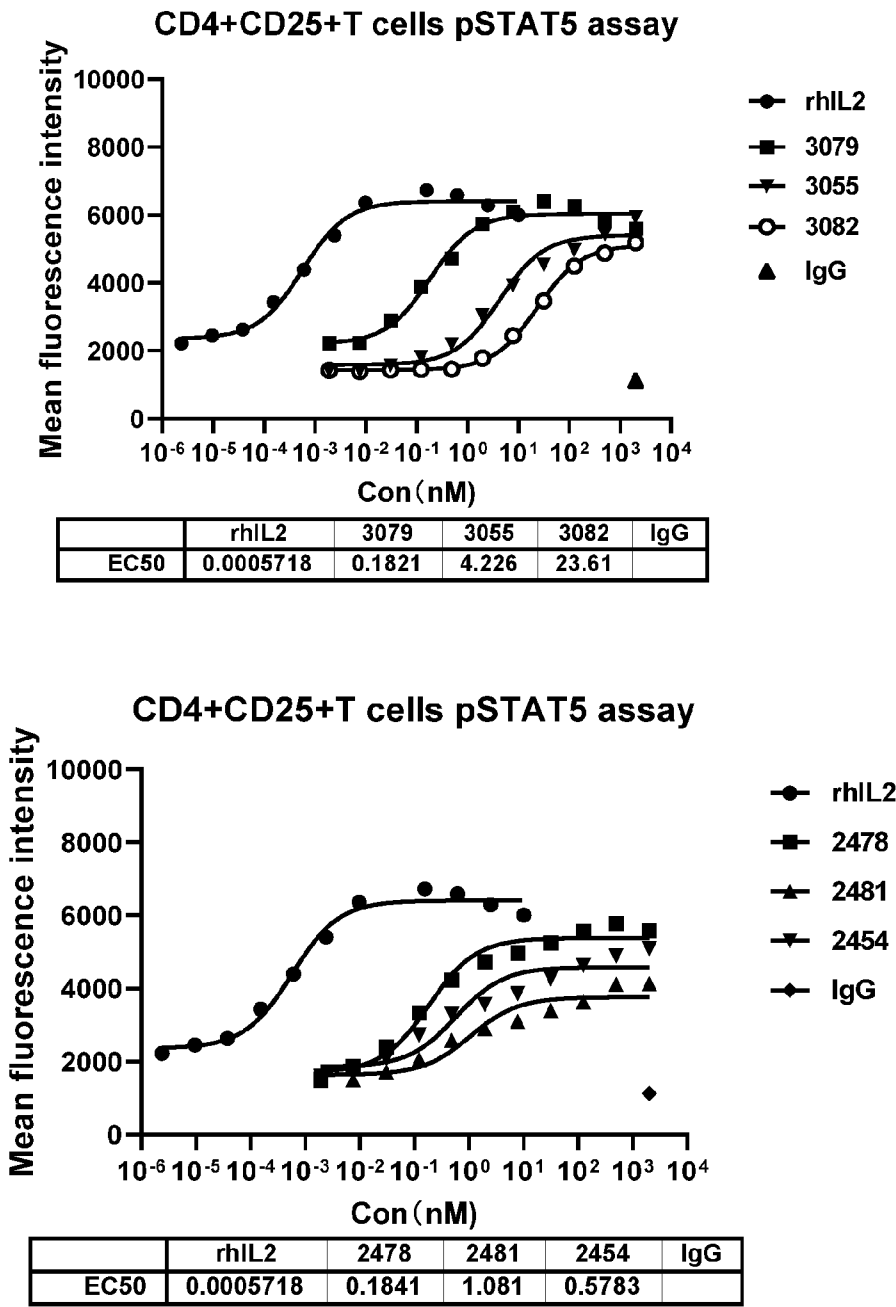


图 7F

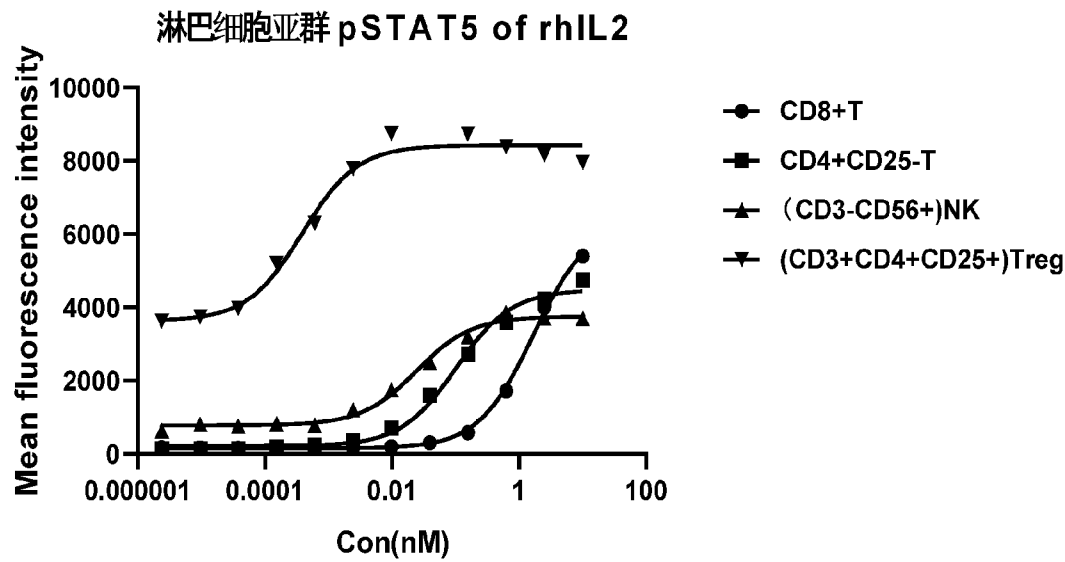


图 8A

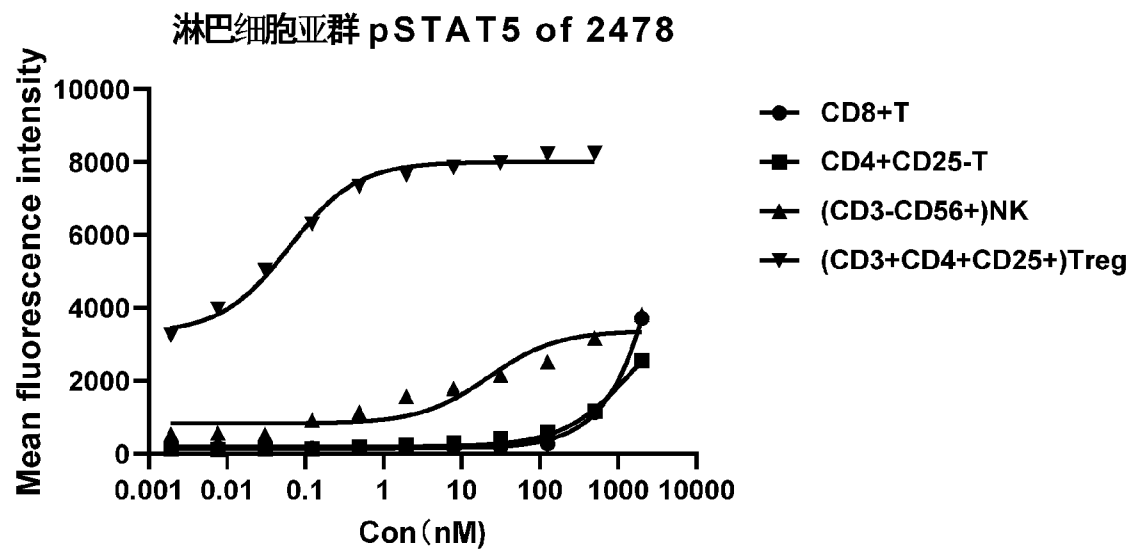


图 8B

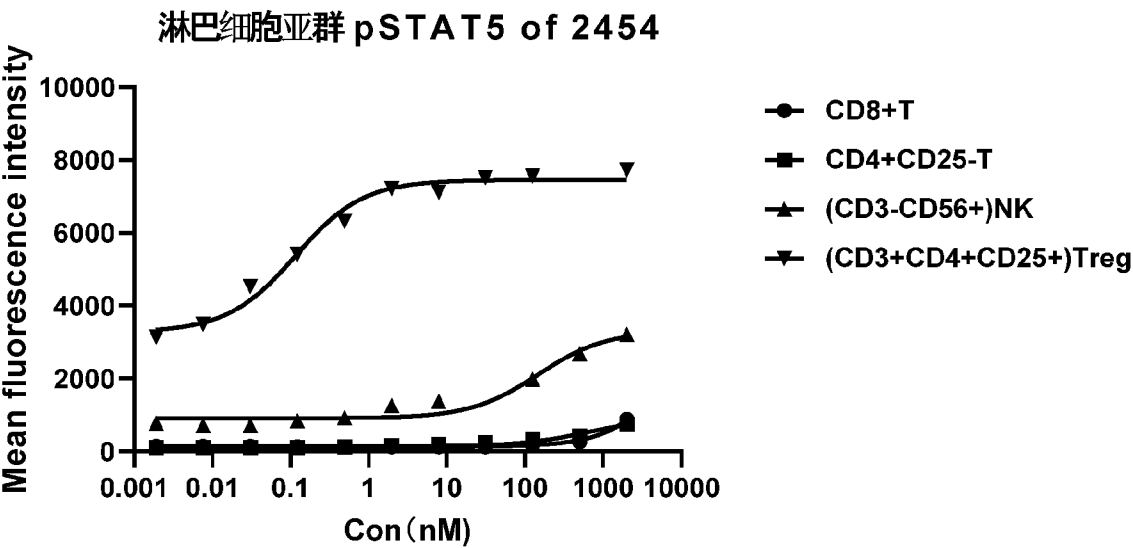


图 8C

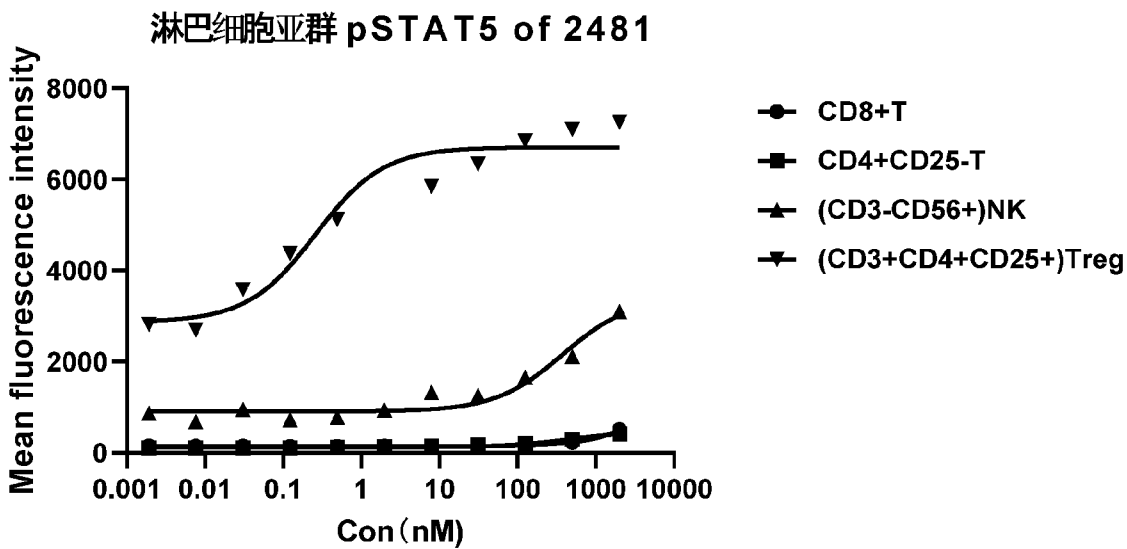


图 8D

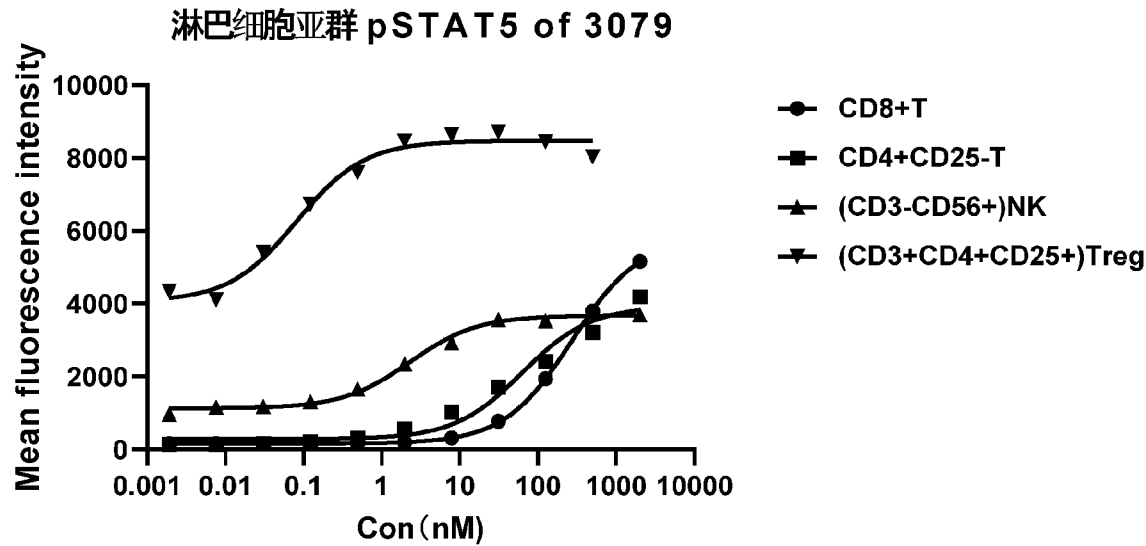


图 8E

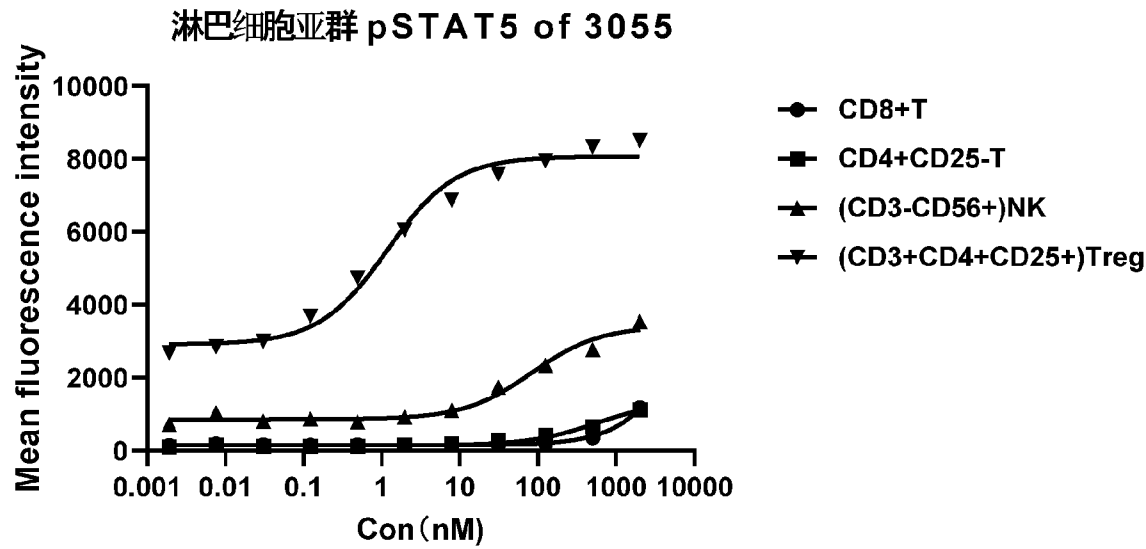


图 8F

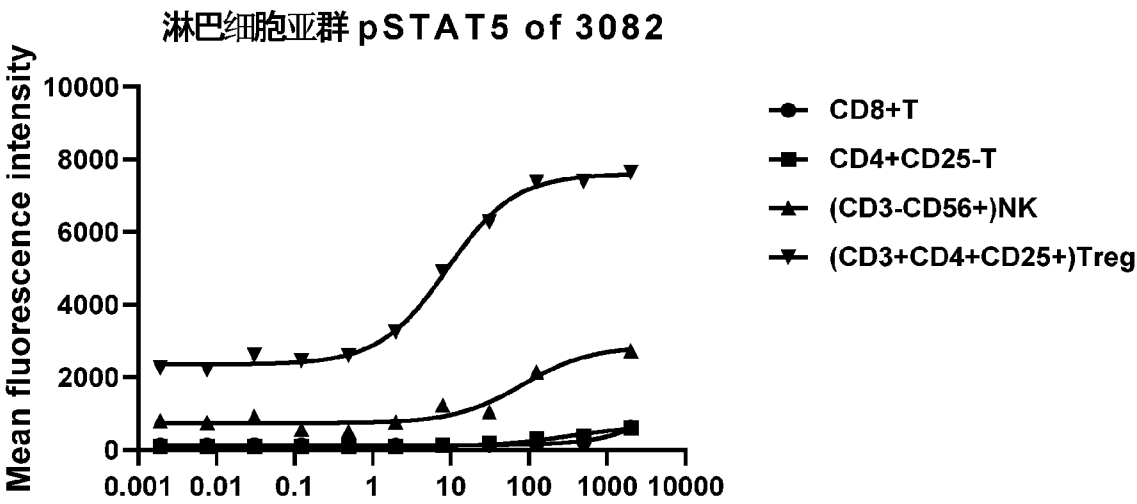


图 8G

C57 小鼠肿瘤体积测定

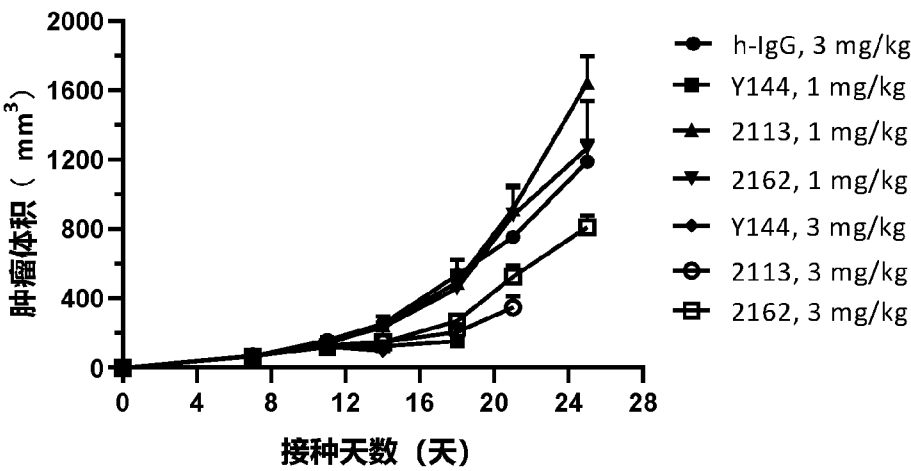


图 9A

C57 小鼠体重测定

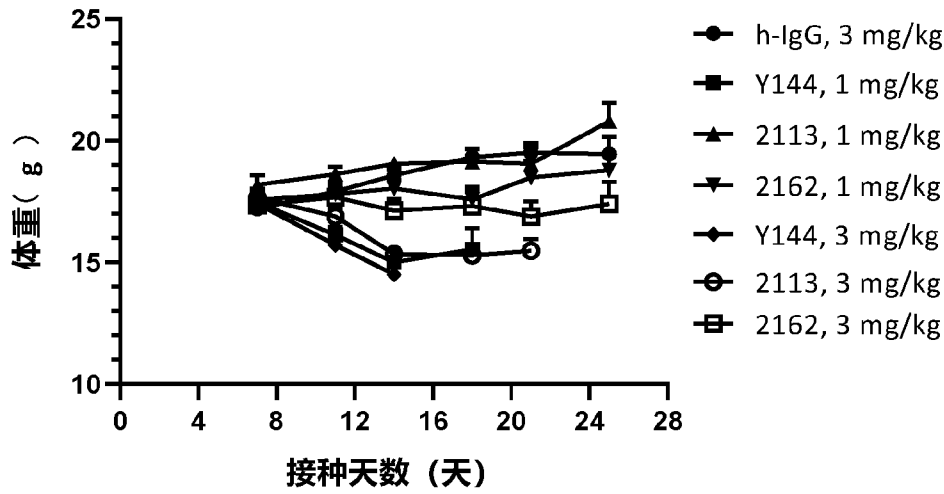


图 9B

C57 小鼠体重变化

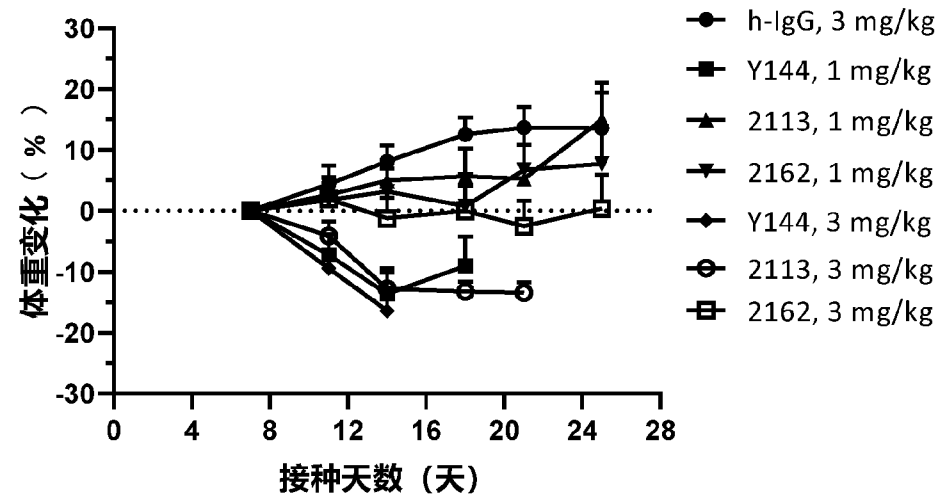


图 9C

C57 小鼠肿瘤体积测定

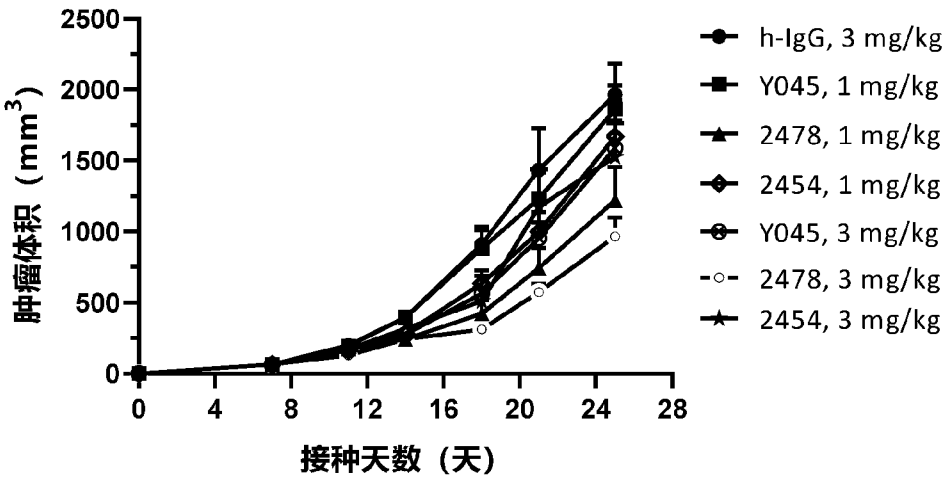


图 10A

C57 小鼠体重测定

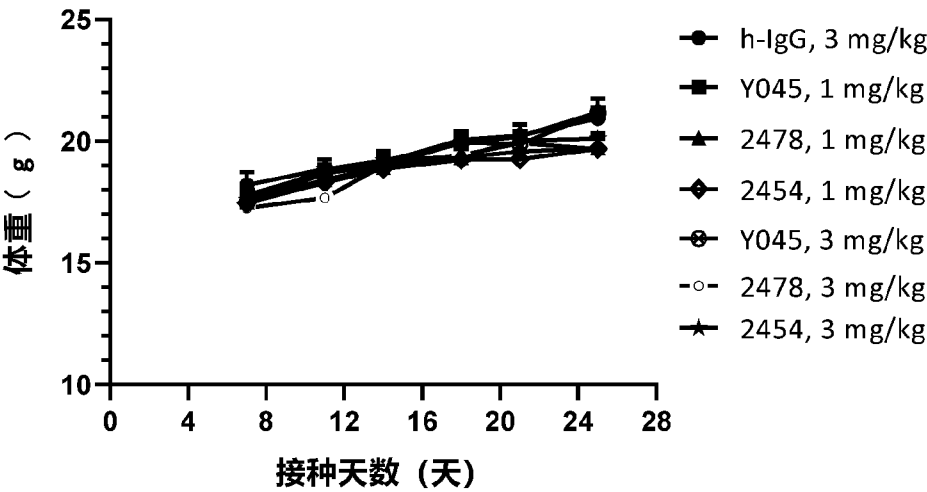


图 10B

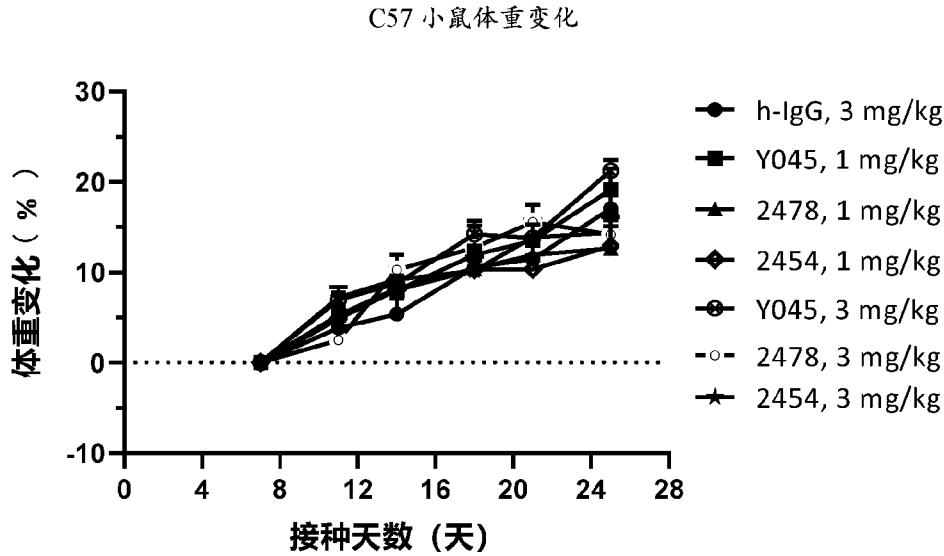


图 10C

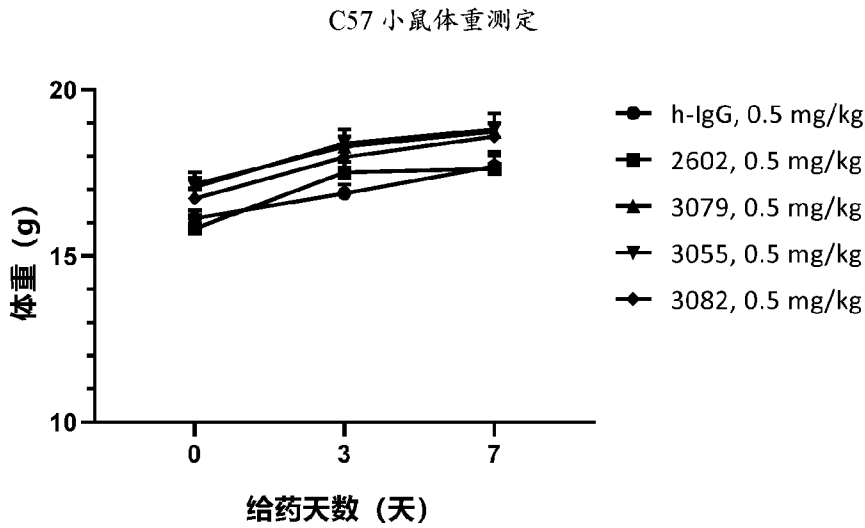


图 11A

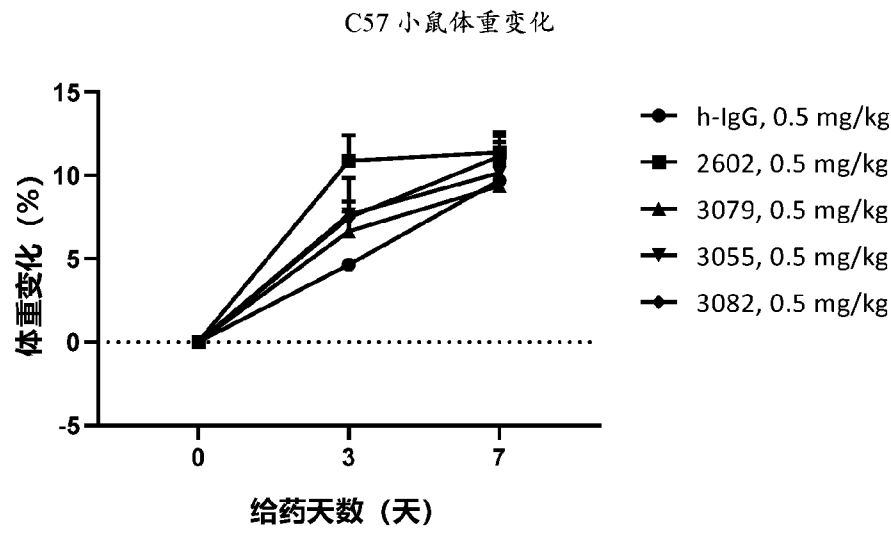


图 11B

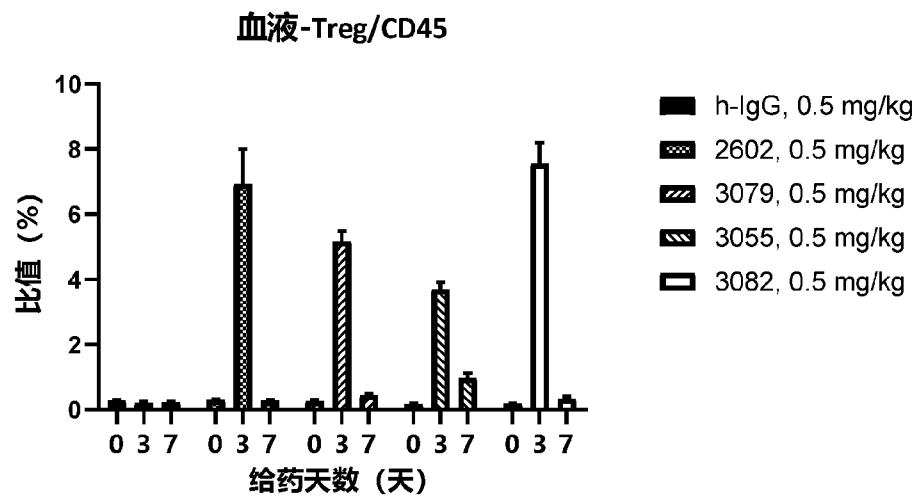


图 11C

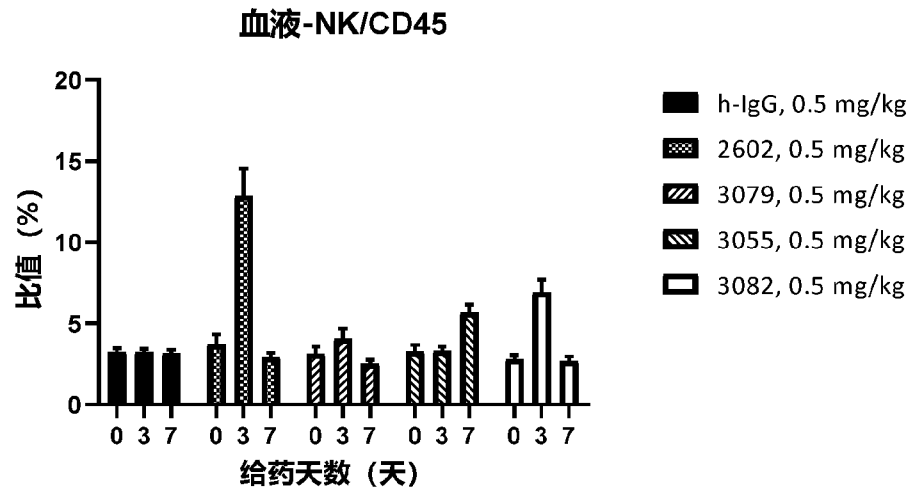


图 11D

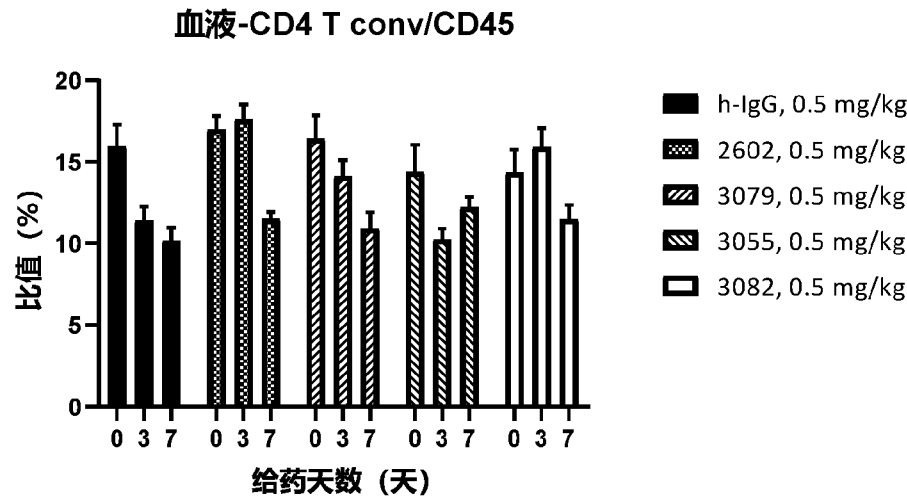


图 11E

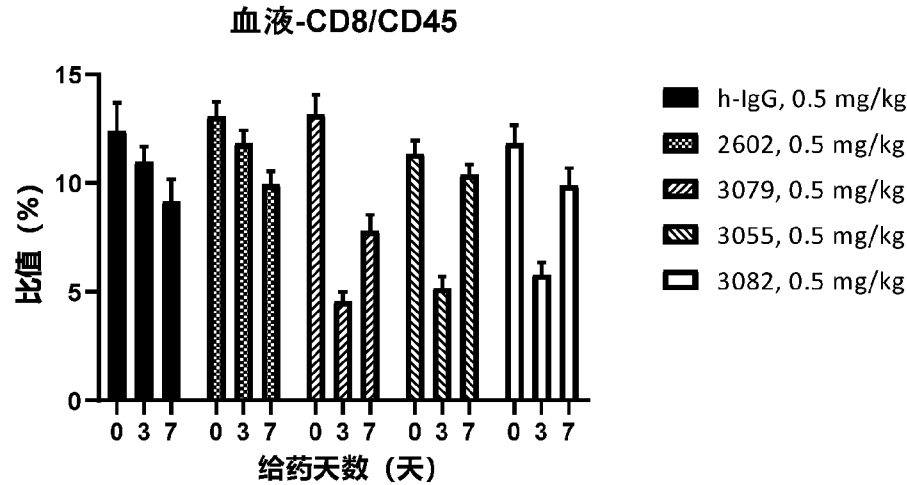


图 11F

位置编号	1-34	35	36	37	38	39-40	41
IL-2 ^{WT}	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP	K	L	T	R	ML	T
IL-2 ^{3X}	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP	K	L	T	D	ML	T

位置编号	42	43	44	45	46-60	61	62	63-67	68	69-71
IL-2 ^{WT}	F	K	F	Y	MPKKATELKHLQCLE	E	E	LKPLE	E	VLN
IL-2 ^{3X}	F	E	F	Y	MPKKATELKHLQCLE	R	E	LKPLE	E	VLN

位置编号	72	73-75	76	77-83	84	85-87	88	89-90	91
IL-2 ^{WT}	L	AQS	K	NFHLRPR	D	LI S	N	IN	V
IL-2 ^{3X}	L	AQS	K	NFHLRPR	D	LI S	N	IN	V

位置编号	92	93-133
IL-2 ^{WT}	I	VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
IL-2 ^{3X}	I	VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/081840

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/55(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/26(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i;
C12N 5/10(2006.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, DWPI, SIPOABS, Pubmed, CNKI and Keywords: 白介素2, 白细胞介素2, interleukin-2, IL-2, 突变, mutant, 结合界面, binding interface, 环, loop, AQSKNFH+, K35?, F42?, T37?, R38?, etc.; Genbank, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: CHINESE PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE RETRIEVAL SYSTEM and sequence search on SEQ ID NO: 1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019246404 A1 (CUGENE INC.) 26 December 2019 (2019-12-26) claims 1-32, and description, paragraphs [0009] and [0015]-[0019]	1-4, 7-21, 24-26
Y	WO 9102000 A1 (SERAGEN, INC.) 21 February 1991 (1991-02-21) claims 1-8, and description, page 2, the last paragraph	1-4, 7-21, 24-26
Y	CN 103492411 A (ROCHE GLYCART AG) 01 January 2014 (2014-01-01) claims 1-27, and description, paragraphs [0087]-[0091]	1-4, 7-21, 24-26
A	WO 2019246404 A1 (CUGENE INC.) 26 December 2019 (2019-12-26) claims 1-32, and description, paragraphs [0009] and [0015]-[0019]	5, 6
A	WO 9102000 A1 (SERAGEN, INC.) 21 February 1991 (1991-02-21) claims 1-8, and description, page 2, the last paragraph	5, 6
A	CN 103492411 A (ROCHE GLYCART AG) 01 January 2014 (2014-01-01) claims 1-27, and description, paragraphs [0087]-[0091]	5, 6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 June 2021

Date of mailing of the international search report

01 July 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/081840

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/081840

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **22,23**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv) – methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/081840

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019246404	A1	26 December 2019	CA	3102829	A1	26 December 2019
				AU	2019288496	A1	14 January 2021
WO	9102000	A1	21 February 1991	EP	0485497	A1	20 May 1992
				EP	0485497	A4	08 July 1992
				NZ	234674	A	25 February 1992
				AU	6179990	A	11 March 1991
				JP	H04507250	A	17 December 1992
				CA	2064696	A1	03 February 1991
CN	103492411	A	01 January 2014	AU	2015249085	B2	14 December 2017
				CN	105440123	A	30 March 2016
				BR	112013018932	B1	17 November 2020
				TW	201718029	A	01 June 2017
				KR	20130118363	A	29 October 2013
				PL	3075745	T3	31 July 2019
				RS	57767	B1	31 December 2018
				PL	2673294	T3	30 November 2016
				US	10184009	B2	22 January 2019
				EA	201300896	A1	28 February 2014
				CY	1117842	T1	17 May 2017
				IL	269687	D0	28 November 2019
				PT	3075745	T	14 November 2018
				CA	2824253	A1	16 August 2012
				MX	340671	B	20 July 2016
				CN	103492411	B	07 December 2016
				ZA	201305282	B	27 July 2016
				EP	3075745	A1	05 October 2016
				AU	2012215573	A1	02 May 2013
				NZ	710742	A	28 April 2017
				EP	2673294	A1	18 December 2013
				US	2019077881	A1	14 March 2019
				PH	12017500954	B1	27 November 2017
				SG	10201604160W	A	28 July 2016
				DK	2673294	T3	30 May 2016
				TW	1666027	B	21 July 2019
				KR	20150092367	A	12 August 2015
				NZ	611749	A	28 August 2015
				IL	252230	D0	31 July 2017
				US	9266938	B2	23 February 2016
				DK	3075745	T3	26 November 2018
				SI	2673294	T1	31 August 2016
				HK	1217020	A1	16 December 2016
				SI	3075745	T1	31 December 2018
				CL	2013001987	A1	31 January 2014
				CR	20130314	A	09 August 2013
				PE	20140303	A1	22 March 2014
				MA	35803	B1	01 December 2014
				EP	3489255	A1	29 May 2019
				ES	2694564	T3	21 December 2018
				EC	SP13012815	A	31 October 2013
				US	2016208017	A1	21 July 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/081840

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		UA 117294 C2	10 July 2018
		BR 112013018932 A2	02 May 2017
		HU E029139 T2	28 February 2017
		JP 6155300 B2	28 June 2017
		IL 252230 A	31 October 2019
		MX 356675 B	08 June 2018
		CN 112210000 A	12 January 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/081840

A. 主题的分类

C07K 14/55(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/26(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, DWPI, SIP0ABS, Pubmed, CNKI和关键词: 白介素2, 白细胞介素2, interleukin-2, IL-2, 突变, mutant, 结合界面, binding interface, 环, loop, AQSKNFH+, K35?, F42?, T37?, R38?, 等; Genbank, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO: 1

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	WO 2019246404 A1 (CUGENE INC) 2019年 12月 26日 (2019 - 12 - 26) 权利要求1-32, 说明书第0009、0015-0019段	1-4, 7-21, 24-26
Y	WO 9102000 A1 (SERAGEN INC) 1991年 2月 21日 (1991 - 02 - 21) 权利要求1-8, 说明书第2页最后一段	1-4, 7-21, 24-26
Y	CN 103492411 A (罗切格利卡特公司) 2014年 1月 1日 (2014 - 01 - 01) 权利要求1-27, 说明书0087-0091段	1-4, 7-21, 24-26
A	WO 2019246404 A1 (CUGENE INC) 2019年 12月 26日 (2019 - 12 - 26) 权利要求1-32, 说明书第0009、0015-0019段	5, 6
A	WO 9102000 A1 (SERAGEN INC) 1991年 2月 21日 (1991 - 02 - 21) 权利要求1-8, 说明书第2页最后一段	5, 6
A	CN 103492411 A (罗切格利卡特公司) 2014年 1月 1日 (2014 - 01 - 01) 权利要求1-27, 说明书0087-0091段	5, 6

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2021年 6月 9日

国际检索报告邮寄日期

2021年 7月 1日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

杨振宇

电话号码 86-(10)-62412204

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 22, 23
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1 (iv) ——处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/081840

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)
WO	2019246404	A1	2019年 12月 26日	CA	3102829	A1 2019年 12月 26日
				AU	2019288496	A1 2021年 1月 14日
WO	9102000	A1	1991年 2月 21日	EP	0485497	A1 1992年 5月 20日
				EP	0485497	A4 1992年 7月 8日
				NZ	234674	A 1992年 2月 25日
				AU	6179990	A 1991年 3月 11日
				JP	H04507250	A 1992年 12月 17日
				CA	2064696	A1 1991年 2月 3日
CN	103492411	A	2014年 1月 1日	AU	2015249085	B2 2017年 12月 14日
				CN	105440123	A 2016年 3月 30日
				BR	112013018932	B1 2020年 11月 17日
				TW	201718029	A 2017年 6月 1日
				KR	20130118363	A 2013年 10月 29日
				PL	3075745	T3 2019年 7月 31日
				RS	57767	B1 2018年 12月 31日
				PL	2673294	T3 2016年 11月 30日
				US	10184009	B2 2019年 1月 22日
				EA	201300896	A1 2014年 2月 28日
				CY	1117842	T1 2017年 5月 17日
				IL	269687	D0 2019年 11月 28日
				PT	3075745	T 2018年 11月 14日
				CA	2824253	A1 2012年 8月 16日
				MX	340671	B 2016年 7月 20日
				CN	103492411	B 2016年 12月 7日
				ZA	201305282	B 2016年 7月 27日
				EP	3075745	A1 2016年 10月 5日
				AU	2012215573	A1 2013年 5月 2日
				NZ	710742	A 2017年 4月 28日
				EP	2673294	A1 2013年 12月 18日
				US	2019077881	A1 2019年 3月 14日
				PH	12017500954	B1 2017年 11月 27日
				SG	10201604160W	A 2016年 7月 28日
				DK	2673294	T3 2016年 5月 30日
				TW	1666027	B 2019年 7月 21日
				KR	20150092367	A 2015年 8月 12日
				NZ	611749	A 2015年 8月 28日
				IL	252230	D0 2017年 7月 31日
				US	9266938	B2 2016年 2月 23日
				DK	3075745	T3 2018年 11月 26日
				SI	2673294	T1 2016年 8月 31日
				HK	1217020	A1 2016年 12月 16日
				SI	3075745	T1 2018年 12月 31日
				CL	2013001987	A1 2014年 1月 31日
				CR	20130314	A 2013年 8月 9日
				PE	20140303	A1 2014年 3月 22日
				MA	35803	B1 2014年 12月 1日
				EP	3489255	A1 2019年 5月 29日
				ES	2694564	T3 2018年 12月 21日
				EC	SP13012815	A 2013年 10月 31日
				US	2016208017	A1 2016年 7月 21日

国际申请号
PCT/CN2021/081840

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
	UA	117294 C2	2018年 7月 10日
	BR	112013018932 A2	2017年 5月 2日
	HU	E029139 T2	2017年 2月 28日
	JP	6155300 B2	2017年 6月 28日
	IL	252230 A	2019年 10月 31日
	MX	356675 B	2018年 6月 8日
	CN	112210000 A	2021年 1月 12日