



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I671318 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 09 月 11 日

(21)申請案號：104103962

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 02 月 05 日

(51)Int. Cl.：

C07K19/00 (2006.01)**C07K14/55 (2006.01)****A61K38/20 (2006.01)****A61K39/395 (2006.01)****A61P37/00 (2006.01)**

(30)優先權：2014/02/06 美國

61/936,564

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

瑞士

(72)發明人：賀司 雷夫 HOSSE, RALF (DE)；克萊 克里斯俊 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；摩
斯納 艾克哈得 MOESSNER, EKKEHARD (DE)；彼得生 勞倫斯 伯納德
PETERSON, LAURENCE BERNARD (US)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO
(CR)；維克 琳達 WICKER, LINDA (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 03/048334A2

WO 2010/085495A1

WO 2012/146628A1

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：42 項 圖式數：46 共 228 頁

(54)名稱

介白素－2 融合蛋白及其用途

(57)摘要

本發明概言之係關於免疫球蛋白及介白素-2(IL-2)之融合蛋白。更特定而言，本發明係關於免疫球蛋白及突變體 IL-2 之融合蛋白，其展現用作(例如)治療自體免疫疾病及免疫介導之發炎性疾病之治療劑之改良性質。此外，本發明係關於編碼該等融合蛋白之多核苷酸及包括該等多核苷酸之載體及宿主細胞。本發明另外係關於產生本發明之該等融合蛋白之方法及使用其治療疾病之方法。

The present invention generally relates to fusion proteins of immunoglobulins and interleukin-2 (IL-2). More particularly, the invention concerns fusion proteins of immunoglobulins and mutant IL-2 that exhibit improved properties for use as therapeutic agents, e.g. in the treatment of autoimmune diseases and immune-mediated inflammatory diseases. In addition, the present invention relates to polynucleotides encoding such fusion proteins, and vectors and host cells comprising such polynucleotides. The invention further relates to methods for producing the fusion proteins of the invention, and to methods of using them in the treatment of disease.

指定代表圖：

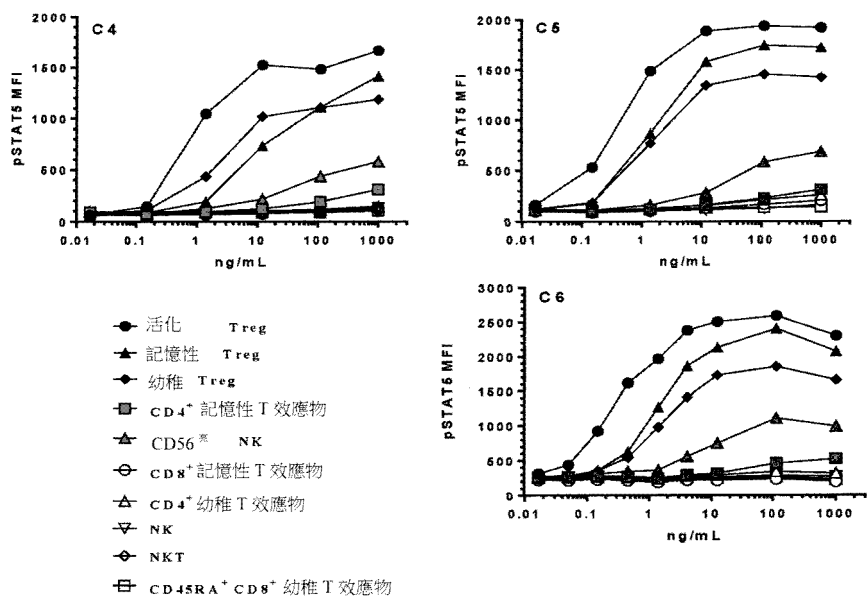


圖 13

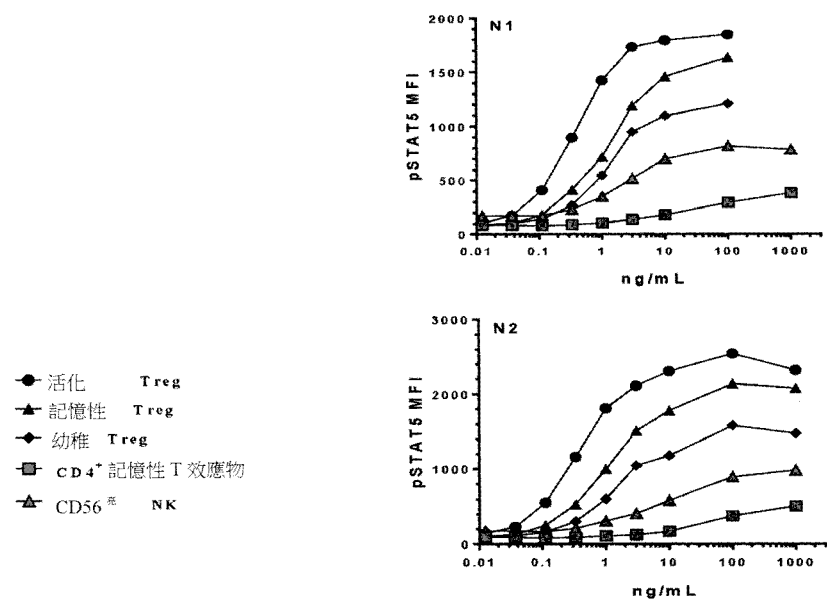


圖 13(續)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

介白素-2融合蛋白及其用途

INTERLEUKIN-2 FUSION PROTEINS AND USES THEREOF

【技術領域】

本發明概言之係關於免疫球蛋白及介白素-2 (IL-2)之融合蛋白。更特定而言，本發明係關於免疫球蛋白及突變體IL-2之融合蛋白，其展現用作(例如)治療自體免疫疾病及免疫介導之發炎性疾病之治療劑之改良性質。此外，本發明係關於編碼該等融合蛋白之多核苷酸及包括該等多核苷酸之載體及宿主細胞。本發明另外係關於產生本發明之該等融合蛋白之方法及使用其治療疾病之方法。

【先前技術】

調節性T細胞(Treg)代表對應維持自身耐受性至關重要之T淋巴球之特定子組。該等具有阻抑功能之 $CD4^+CD25^{hi}$ 細胞與效應T細胞之區別可在於轉錄因子FOXP3以及其他細胞標記物(例如 $CD127^{low}$ 、CTLA-4⁺、LAP、 $CD39^+$ 、PD-1⁺、GARP等)之細胞內表現。FOXP3對於Treg分化及功能至關重要，且FOXP3基因缺陷及突變(在患有免疫失調多發性內分泌病、腸病變、X-染色體連接症候群(IPEX)之皮屑小鼠及患者中)會破壞自身耐受性且因Treg功能缺陷或缺乏而發生自體免疫疾病。

1型糖尿病、全身性紅斑狼瘡(SLE)、多發性硬化及許多其他疾病中之自體免疫反應與Treg或Treg功能之缺陷有關。來自動物模型之數據證實，可假設自體免疫反應係由Treg不能控制自身破壞性免疫反應(在很大程度上由自體反應 $CD4^+$ 記憶性T效應細胞之效應所致)促進。1

型糖尿病係在破壞胰臟中大部分產生胰島素之 β 細胞之後發生之自體免疫疾病。1型糖尿病之頻率在美國為約0.3%之群體且其發病率在美國、歐洲及尤其斯堪的納維亞(接近1%)繼續增加，且預計在接下來20年內會翻倍。

細胞激素細胞激素IL-2在Treg以及效應T細胞(Teff)之活化及功能中發揮重大作用。IL-2產生缺陷或反應性缺乏優先使得損失Treg功能且增加自體免疫性之概率。因Treg以高於Teff之程度組成型表現高親和力IL-2受體，故與Teff細胞相比，低劑量之IL-2優先支持維持Treg。

在IL-2用於在活體外及在活體內活化Treg之優先效應下，低劑量、長效IL-2療法可能具有在自體免疫疾病中之高成功預期。在2013年後期開始使用IL-2 (Proleukin[®]，重組人類IL-2)之200患者、雙盲、安慰劑對照1型糖尿病臨床試驗。使用日低劑量Proleukin之最新臨床試驗會改善慢性移植物抗宿主疾病(GVHD)及C型肝炎病毒誘導之血管炎之一些體徵及症狀(Koreth等人，New Engl J Med 365, 2055-2066 (2011)；Saadoun等人，New Engl J Med 365, 2067-2077 (2011))。在兩種研究中，低劑量Proleukin[®]誘導Treg且增加Treg:Teff比率。然而，Proleukin[®]之較差PK性質使得其對於維持男性中之低一致IL-2含量而言係此最佳。在臨床試驗中測試之其他方法係離體個體化擴增Treg隨後進行再輸注，但此方式較不理想且代表具有挑戰性之一組品質控制問題。

因此，再確立天然調節性T細胞(Treg)調介之顯性免疫耐受性且極大地最小化對CD4⁺記憶性T效應細胞之任一潛在刺激效應之新治療方式將大大增強治療患有以下疾病之患者的能力：自體免疫疾病，例如1型糖尿病、多發性硬化、全身性紅斑狼瘡、克羅恩氏病(Crohn's disease)以及其他自體免疫疾病；及基於免疫之促發炎性疾病，例如

慢性移植抗宿主疾病、哮喘、肺纖維化、慢性阻塞性肺疾病、心血管疾病(例如動脈粥樣硬化及急性冠狀動脈症候群)及移植排斥(實體器官及骨髓)。

WO 2009/135615 闡述使用先前已知之 IL-2 突變蛋白質 (WO 1999/60128 中所闡述之 IL-2 N88R、BAY50-4798) 來療法或預防自體免疫疾病。據陳述，與野生型 IL-2 相比，IL-2 突變蛋白質對 Treg 細胞具有增加之活性，而其對 CD8⁺ T 細胞及 NK 細胞之效應較小。並未闡述 IL-2 突變蛋白質之融合蛋白。

WO 2010/85495 闡述較非調節性 T 細胞選擇性促進 Treg 細胞中之活性以用於治療發炎性病之 IL-2 變體。所闡述 IL-2 變體包括影響至 IL-2 受體之不同亞單位之結合之 8 個或更多個胺基酸取代的組合。

本發明之 IL-2 融合蛋白優先活化人類及非人類 Treg 且對人類 CD4⁺ 記憶性 T 效應細胞具有較小效應或無效應(此打破朝向較高 Treg:Teff 比率之平衡)並減少自體免疫反應。其較為長效，從而容許便利投藥時間表，且並無效應物功能，從而減少潛在副效應及效能缺損。

【發明內容】

在一態樣中，本發明提供融合蛋白，其包括(i)免疫球蛋白分子，及(ii)包括胺基酸突變之兩個突變體介白素-2 (IL-2)分子，該胺基酸突變使得與野生型 IL-2 分子相比突變體 IL-2 分子至中間親和力 IL-2 受體之親和力減小。

在一實施例中，該免疫球蛋白分子係 IgG 類免疫球蛋白分子、尤其 IgG₁ 子類免疫球蛋白分子。在一實施例中，該免疫球蛋白分子係人類免疫球蛋白分子。在一實施例中，該免疫球蛋白分子能夠特異性結合至抗原。在一實施例中，該免疫球蛋白分子係單株抗體。在一實施例中，該免疫球蛋白分子不能特異性結合至抗原。在一實施例中，該免疫球蛋白分子包括基於人類 Vh3-23 種系序列之重鏈可變區序列。在

具體實施例中，該免疫球蛋白分子包括SEQ ID NO: 9之重鏈可變區序列。在一實施例中，該免疫球蛋白分子包括基於人類Vk3-20種系序列之輕鏈可變區序列。在具體實施例中，該免疫球蛋白分子包括SEQ ID NO: 11之輕鏈可變區序列。在甚至更具體實施例中，該免疫球蛋白分子包括SEQ ID NO: 9之重鏈可變區序列及SEQ ID NO: 11之輕鏈可變區序列。在一實施例中，該免疫球蛋白分子不能特異性結合至抗原，且包括基於人類Vh3-23種系序列之重鏈可變區序列及基於人類Vk3-20種系序列之輕鏈可變區序列。

在一實施例中，該免疫球蛋白分子包括修飾，該修飾與無該修飾之相應免疫球蛋白分子相比使免疫球蛋白分子至Fc受體之結合親和力減小。在一實施例中，該Fc受體係Fc γ 受體、尤其人類Fc γ 受體。在一實施例中，該Fc受體係活化Fc受體。在一實施例中，該Fc受體係選自Fc γ RIIIa (CD16a)、Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIa (CD32)及Fc α RI (CD89)之群。在具體實施例中，該Fc受體係Fc γ RIIIa、尤其人類Fc γ RIIIa。在一實施例中，該修飾減小免疫球蛋白分子之效應物功能。在具體實施例中，該效應物功能係抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)。在一實施例中，該修飾係在該免疫球蛋白分子之Fc區、尤其CH2區中。在一實施例中，該免疫球蛋白分子在免疫球蛋白重鏈之329位(EU編號)處包括胺基酸取代。在具體實施例中，該胺基酸取代係P329G。在一實施例中，該免疫球蛋白分子在免疫球蛋白重鏈之234及235位(EU編號)處包括胺基酸取代。在具體實施例中，該等胺基酸取代係L234A及L235A (LALA)。在一實施例中，該免疫球蛋白分子在免疫球蛋白重鏈之234、235及329位(EU編號)處包括胺基酸取代。在特定實施例中，該免疫球蛋白分子在免疫球蛋白重鏈中包括胺基酸取代L234A、L235A及P329G (EU編號)。

在一實施例中，該等突變體IL-2分子在對應於人類IL-2 (SEQ ID

NO: 1)之殘基88之位置處包括胺基酸突變。在一實施例中，該胺基酸突變係胺基酸取代。在特定實施例中，該胺基酸取代係N88D。在一實施例中，該等IL-2分子進一步包括與天然、原始IL-2相比並不改變該等IL-2分子至IL-2受體之結合親和力之胺基酸突變。在一實施例中，該等IL-2分子在對應於人類IL-2之殘基125之位置處包括胺基酸突變。在更具體實施例中，該胺基酸突變係胺基酸取代C125A。在一實施例中，該突變體IL-2分子進一步包括胺基酸突變，該胺基酸突變消除對應於人類IL-2之殘基3之位置處IL-2之O-糖基化位點。在一實施例中，該消除對應於人類IL-2之殘基3之位置處IL-2之O-糖基化位點的胺基酸突變係如下胺基酸取代：其選自T3A、T3G、T3Q、T3E、T3N、T3D、T3R、T3K及T3P之群。在具體實施例中，消除對應於人類IL-2之殘基3之位置處IL-2之O-糖基化位點之胺基酸突變係T3A。在一實施例中，該等突變體IL-2分子係人類IL-2分子。在具體實施例中，該等突變體IL-2分子包括選自SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 62及SEQ ID NO: 64之群之序列、尤其SEQ ID NO: 58之序列。在一實施例中，該等突變體IL-2分子具有選自SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 62及SEQ ID NO: 64之群之序列、尤其SEQ ID NO: 58之序列。在一實施例中，該等突變體IL-2分子各自在其N末端胺基酸處視情況經由肽連接體融合至該免疫球蛋白分子之一個免疫球蛋白重鏈之C末端胺基酸。在一實施例中，該等突變體IL-2分子各自經由肽連接體融合至該免疫球蛋白分子。在一實施例中，該肽連接體包括至少10、尤其至少15個胺基酸。在一實施例中，該肽連接體包括胺基酸序列(G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66)。

在具體實施例中，該融合蛋白包括SEQ ID NO: 19及SEQ ID NO: 50之多肽序列。在具體實施例中，該融合蛋白包括SEQ ID NO: 19之免疫球蛋白輕鏈及SEQ ID NO: 50之免疫球蛋白重鏈-IL-2融合多肽。

在一實施例中，該融合蛋白基本上由免疫球蛋白分子、兩個突變體介白素-2 (IL-2)分子(包括與野生型IL-2分子相比減小突變體IL-2分子至中間親和力IL-2受體之親和力之胺基酸突變)及視情況一或多種肽連接體組成。在一實施例中，該融合蛋白基本上由SEQ ID NO: 19之兩條免疫球蛋白輕鏈及SEQ ID NO: 50之兩條免疫球蛋白重鏈-IL-2融合多肽組成。

在一實施例中，該融合蛋白選擇性活化調節性T細胞。在一實施例中，該融合蛋白較效應T細胞、尤其較習用CD4⁺ T細胞及CD8⁺ T細胞選擇性活化調節性T細胞。在一實施例中，該融合蛋白較習用CD4⁺記憶性T細胞選擇性活化調節性T細胞。在一實施例中，該融合蛋白以至少10倍、至少100倍或至少1000倍於習用CD4⁺記憶性T細胞來活化調節性T細胞。在一實施例中，藉由量測細胞內STAT、尤其STAT5磷酸化程度來測定該活化。在一實施例中，藉由流式細胞術分析來進行細胞內STAT磷酸化程度之該量測。

本發明另外提供編碼本發明之融合蛋白之多核苷酸。另外提供包括本發明多核苷酸之載體、尤其表現載體。在另一態樣中，本發明提供包括本發明多核苷酸或載體之宿主細胞。本發明亦提供產生本發明之融合蛋白之方法，其包括以下步驟：(i)在適於表現融合蛋白之條件下培養本發明之宿主細胞，及(ii)回收融合蛋白。亦提供藉由該方法產生之融合蛋白，其包括(i)免疫球蛋白分子及(ii)包括胺基酸突變之兩個介白素-2 (IL-2)分子，該胺基酸突變使得與野生型IL-2分子相比突變體IL-2分子至中間親和力IL-2受體之親和力減小。

在一態樣中，本發明提供包括本發明之融合蛋白及醫藥上可接受之載劑之醫藥組合物。亦提供本發明之融合蛋白或醫藥組合物以用作醫藥，且用於治療或預防自體免疫疾病、具體而言1型糖尿病、多發性硬化(MS)、全身性紅斑狼瘡(SLE)、發炎性腸病、克羅恩氏病或

潰瘍性結腸炎、最具體而言1型糖尿病或移植物抗宿主疾病或移植排斥。另外提供本發明之融合蛋白用以製造用於治療有需要之個體之疾病之醫藥的用途；及治療個體之疾病之方法，其包括向該個體投與治療有效量之以醫藥上可接受之形式包括本發明之融合蛋白的組合物。在一實施例中，該疾病係自體免疫疾病。在更具體實施例中，該自體免疫疾病係1型糖尿病、多發性硬化(MS)、全身性紅斑狼瘡(SLE)、發炎性腸病、克羅恩氏病或潰瘍性結腸炎。在甚至更具體實施例中，該自體免疫疾病係1型糖尿病。在另一實施例中，該疾病係移植排斥或移植物抗宿主疾病。在一實施例中，該個體係哺乳動物、尤其人類。

另外提供用於在活體外或在活體內選擇性活化調節性T細胞之本發明之融合蛋白。在一實施例中，該活化包括誘導調節性T細胞增殖及/或誘導調節性T細胞中之IL-2受體信號傳導、尤其STAT5磷酸化。在一實施例中，該用途係活體外用途且以約10 ng/mL或更小、尤其約1 ng/mL或更小之濃度使用該融合蛋白。在另一實施例中，該用途係活體內用途且以約100 µg/kg體重或更小、尤其約25 µg/kg體重或更小、更尤其約10 µg/kg體重或更小之劑量使用該融合蛋白。

本發明亦提供在活體外或在活體內選擇性活化調節性T細胞之方法，其包括使該等調節性T細胞與本發明之融合蛋白接觸。在一實施例中，該活化包括誘導調節性T細胞增殖及/或誘導調節性T細胞中之IL-2受體信號傳導、尤其STAT5磷酸化。在一實施例中，該方法係活體外方法且以約10 ng/mL或更小、尤其約1 ng/mL或更小之濃度使用該融合蛋白。在另一實施例中，該方法係活體內方法且以約100 µg/kg體重或更小、尤其約25 µg/kg體重或更小、更尤其約10 µg/kg體重或更小之劑量使用該融合蛋白。

【圖式簡單說明】

圖1.DP47GS IgG-IL-2融合蛋白(參見SEQ ID NO 13、15、19)之

純化。(A)蛋白質A親和層析步驟之洗脫特徵曲線。(B)尺寸排除層析步驟之洗脫特徵曲線。產量：4 mg/L。(C)最終產物之分析型毛細管電泳SDS (Caliper)。觀察到下列條帶：非還原-111 kDa下之7.5%面積、174 kDa下之92.5%面積；還原-29 kDa下之23.6%面積、67 kDa下之23.5%面積、82 kDa下之52.9%面積。產物含有約7.5%「半IgG」。(D)最終產物之分析型尺寸排除層析，TSKgel G3000 SW XL管柱(91%單體含量)。

圖2. DP47GS IgG-(IL-2)₂融合蛋白(參見SEQ ID NO 17、19)之純化。(A)蛋白質A親和層析步驟之洗脫特徵曲線。(B)尺寸排除層析步驟之洗脫特徵曲線。產量：13 mg/L。(C)最終產物之分析型毛細管電泳SDS (Caliper)。觀察到下列條帶：非還原-172.5 kDa下之2.3%面積、185 kDa下之97.7%面積；還原-27.3 kDa下之18.3%面積、29.2 kDa下之0.6%面積、78.3 kDa下之81.1%面積。(D)最終產物之分析型尺寸排除層析，Superdex 200管柱(100%單體含量)。

圖3. DP47GS IgG-IL-2 N88D融合蛋白(參見SEQ ID NO 15、19、48)之純化。(A)蛋白質A親和層析步驟之洗脫特徵曲線。(B)尺寸排除層析步驟之洗脫特徵曲線。產量：23.7 mg/L。彙集所收集部分。(C)最終產物之分析型毛細管電泳SDS (Caliper)。觀察到下列主要條帶：非還原-167.0 kDa下之100%面積；還原-28.6 kDa下之31.5%面積、63.5 kDa下之31.7%面積、77.5 kDa下之35.3%面積。(D)最終產物之分析型尺寸排除層析，TSKgel G3000 SW XL管柱(97.3%單體含量)。

圖4. DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂融合蛋白(參見SEQ ID NO 19及50)之純化。(A)蛋白質A親和層析步驟之洗脫特徵曲線。(B)尺寸排除層析步驟之洗脫特徵曲線。產量：32.9 mg/L。彙集所收集部分。(C)最終產物之分析型毛細管電泳SDS (Caliper)。觀察到下列主要條帶：非還原-180.4 kDa下之20.7%面積、184.0 kDa下之78.0%面積；還原-27.3

kDa下之16.2%面積、76.0 kDa下之82.7%面積。(D)最終產物之分析型尺寸排除層析，TSKgel G3000 SW XL管柱(98.3%單體含量)。

圖5.DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂融合蛋白(參見SEQ ID NO 19及52)之純化。(A)蛋白質A親和層析步驟之洗脫特徵曲線。(B)尺寸排除層析步驟之洗脫特徵曲線。產量：8.0 mg/L。彙集所收集部分。(C)最終產物之分析型毛細管電泳SDS (Caliper)。觀察到下列主要條帶：非還原-166.0 kDa下之10.3%面積、175.5 kDa下之61.4%面積、181.2 kDa下之28.2%面積；還原-26.1 kDa下之16.0%面積、75.0 kDa下之83.1%面積。(D)最終產物之分析型尺寸排除層析，TSKgel G3000 SW XL管柱(100%單體含量)。

圖6.CD4⁺ Treg子組、NK細胞子組及NKT細胞上之CD25 (IL-2RA)及CD122 (IL-2RB)表現。使用細胞表面標記物來定義CD4⁺ Treg子組、NKT細胞及NK細胞。為優化CD25及CD122之染色，並不實施細胞內FOXP3染色。(A、B)三種調節性CD4⁺ T細胞(Treg)群體：幼稚(CD45RA⁺、CD25⁺；點線)、記憶性(CD45RA⁻、CD25⁺；實線)及活化(CD45RA⁻、CD25^{hi}；虛線)。(C、D) NKT (點線)、CD56^{FE} NK細胞(虛線)、CD56^{中間} NK細胞(實線)。灰色：同種型對照(IC)。

圖7.CD4⁺及CD8⁺習用T細胞子組上之CD25 (IL-2RA)及CD122 (IL-2RB)表現。使用細胞表面標記物定義幼稚(CD45RA⁺；點線)及記憶性(CD45RA⁻；實線)習用CD4⁺ T細胞(A、B)、記憶性習用CD8⁺ T細胞(CD45RA⁻；實線)及CD45RA⁺ CD8⁺ T細胞(幼稚及TEMRA子組之組合；TEMRA係指經回復以表現CD45RA之效應記憶性細胞；點線)(C、D)。灰色：同種型對照(IC)。

圖8.人類周邊血細胞子組中之pSTAT5a因應於DP47GS IgG-IL-2之誘導。在分開時間評價針對三種不同人類供體(C4至C6)各種劑量之DP47GS IgG-IL-2對STAT5a磷酸化誘導之效應。展示針對以下各項之

結果：CD4⁺ Treg子組：活化、記憶性及幼稚Treg；習用CD4⁺記憶性T效應細胞；CD56^亮 NK細胞；CD8⁺記憶性T效應細胞；CD4⁺幼稚T效應細胞；NK細胞；NKT細胞；及CD8⁺幼稚T效應+ CD45RA⁺記憶性細胞。

圖9.人類周邊血細胞子組中之pSTAT5a因應於DP47GS IgG-(IL-2)₂之誘導。在分開時間評價針對5種不同人類供體(N1、N2、C4至C6)各種劑量之DP47GS IgG-(IL-2)₂免疫偶聯物對STAT5a磷酸化誘導之效應。展示針對以下各項之結果：CD4⁺ Treg子組：活化、記憶性及幼稚Treg；習用CD4⁺記憶性T效應細胞；CD56^亮 NK細胞；CD8⁺記憶性T效應細胞；CD4⁺幼稚T效應細胞；NK細胞；NKT細胞；及CD8⁺幼稚T效應+ CD45RA⁺記憶性細胞。

圖10.人類周邊血細胞子組中之pSTAT5a之誘導：DP47GS IgG-IL-2及DP47GS IgG-(IL-2)₂之對比。將每一細胞子組之結果正規化至每一子組之最大觀察效應且Treg之近似EC50呈現於表2中。(A) DP47GS IgG-IL-2之正規化結果、(B)DP47GS IgG-(IL-2)₂之正規化結果。

圖11.比較DP47GS IgG-IL-2及DP47GS IgG-(IL-2)₂之三種供體中之Treg子組敏感性之詳細檢驗。圖形代表三種供體之pSTAT5a MFI之平均值± SD。(A)總CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺ Treg。(B)活化Treg。(C)記憶性Treg。(D)幼稚Treg。

圖12.人類周邊血細胞子組中之pSTAT5a因應於DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂之誘導。在分開時間評價針對三種不同人類供體(C4至C6)各種劑量之DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂對STAT5a磷酸化誘導之效應。展示針對以下各項之結果：CD4⁺ Treg子組：活化、記憶性及幼稚Treg；習用CD4⁺記憶性T效應細胞；CD56^亮 NK細胞；CD8⁺記憶性T效應細胞；CD4⁺幼稚T效應細胞；NK細胞；NKT細胞；及

CD8⁺CD45RA⁺幼稚T效應細胞。

圖13.人類周邊血細胞子組中之pSTAT5a因應於DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之誘導。在分開時間評價針對5種不同人類供體(C4、C5、C6、N1、N2)各種劑量之DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂對STAT5a磷酸化誘導之效應。展示針對以下各項之結果：CD4⁺ Treg子組：活化、記憶性及幼稚Treg；習用CD4⁺記憶性T效應細胞；CD56⁺ NK細胞；CD8⁺記憶性T效應細胞；CD4⁺幼稚T效應細胞；NK細胞；NKT細胞；及CD8⁺CD45RA⁺幼稚T效應細胞。

圖14.人類周邊血細胞子組中之pSTAT5a之誘導：DP47GS IgG-IL-2、DP47GS IgG-(IL-2)₂、DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂、DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂及DP47GS IgG-IL-2N88D之對比。展示針對以下各項之結果：CD4⁺ Treg子組(A-C)：活化(A)、記憶性(C)及幼稚(B) Treg；習用CD4⁺記憶性T效應細胞(D)；CD56⁺ NK細胞(E)。

圖15.人類周邊血細胞子組中之pSTAT5a因應於DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂及DP47GS IgG-(IL-2)₂之誘導。在分開日期評價針對10種不同人類供體寬($\geq 6 \log$)劑量範圍之DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂及DP47GS IgG-(IL-2)₂對STAT5a磷酸化誘導之效應。展示針對下列細胞子組之結果：(A)記憶性Treg、(B)幼稚Treg、(C) CD56⁺ NK細胞、(D)總NK細胞、(E)中樞記憶性CD4⁺ T細胞、(F)效應記憶性CD4⁺ T細胞、(G)幼稚CD4⁺ T細胞、(H)中樞記憶性CD8⁺ T細胞、(I)效應記憶性CD8⁺ T細胞、(J)幼稚CD8⁺ T細胞、(K) Temra [Teff記憶性RA⁺] CD8⁺ T細胞、(L) NKT細胞及(M) CD3⁺CD4⁻CD8⁻CD56⁻ T細胞。所有結果皆以平均值 $\pm$ SEM (n=10個供體)形式展示。

圖16.DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂及DP47GS IgG-(IL-2)₂對人類NK細胞及CD8⁺ T細胞之活體外效應之對比。以 5×10^6 個細胞/U形底孔將來自正常人類供體(n=10)之PBMC與50 ng/ml DP47GS IgG-(IL-

2N88D)₂ (開符號)或DP47GS IgG-(IL-2)₂ (灰影符號)一起培養6天，然後藉由流式細胞術量化細胞數。在CD56^暗及CD56^亮 NK細胞上量化對NK細胞之效應(A)。對CD8⁺ T細胞之效應展示於(B)中。以中值±四分位數範圍形式展示結果，使用Mann-Whitney *U*測試測定統計學差異。

圖17.DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂及DP47GS IgG-(IL-2)₂對CD34⁺幹細胞人類化小鼠之活體內效應之對比。在CD34⁺幹細胞植入之後10至12週，每週兩次使用媒劑(DP47GS IgG，無IL-2)、DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂或DP47GS IgG-(IL-2)₂治療小鼠。在3種治療之後看到血液中之人類Treg及NK細胞具有最大增加且結果展示於(A) (對於Treg)及(B) (對於NK細胞)中。以形式中值±四分位數範圍展示結果；媒劑(n=21)、IgG-(IL-2N88D)₂ (n=22)及IgG-(IL-2)₂ (n=24)。

圖18.DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂及DP47GS IgG-(IL-2)₂對CD34⁺幹細胞人類化小鼠之存活之活體內效應之對比。在CD34⁺幹細胞植入之後10至12週，每週兩次使用媒劑(DP47GS IgG，無IL-2)、DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂或DP47GS IgG-(IL-2)₂治療小鼠直至人類異種移植物抗宿主反應之嚴重程度達到預定階段(≥15%重量損失)為止，從而需要將其自研究去除。自GraphPad Prism將媒劑(n=7)、DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (n=12)及DP47GS IgG-(IL-2)₂ (n=13)之結果繪製為Kaplan-Meier存活曲線。

圖19.DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂及DP47GS IgG-(IL-2)₂對CD34⁺幹細胞人類化小鼠中之Treg、NK細胞及CD8⁺ T細胞之活體內效應之對比。在CD34⁺幹細胞植入之後10至12週，每週兩次使用媒劑(DP47GS IgG，無IL-2)、DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂或DP47GS IgG-(IL-2)₂治療小鼠直至人類異種移植物抗宿主反應之嚴重程度達到預定階段(≥15%重量損失)為止，從而需要將其自研究去除，此時評價個別人類細胞子組之血液。以人類CD45⁺細胞%形式展示血液中之人類Treg、NK細

胞及CD8⁺細胞。以平均值± SEM形式展示媒劑(n=6)、DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (n=9)或DP47GS IgG-(IL-2)₂ (n=9)之結果。

圖20.食蟹猴血液中之Treg pSTAT5a因應於DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之誘導。同時評價針對三種正常健康供體(C1-C3)最大劑量(20 ng/mL)之DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂對Treg中之STAT5a磷酸化誘導之效應。(A)用於鑑別CD4⁺CD25⁺ Treg子組：幼稚Treg (CD45RA⁺ FOXP3⁺)、記憶性Treg (CD45RA⁻FOXP3⁺)及活化Treg (CD45RA⁺FOXP3^{hi})之使用FOXP3 (y軸)及CD45RA (x軸)之流式細胞術選通策略。(B)在刺激之前Treg子組中之CD25⁺細胞表面染色之表現。(C)對於三種食蟹猴(C1-C3)中之每一者CD4⁺CD25⁺ Treg子組：活化、記憶性及幼稚Treg之pSTAT5a反應。

圖21.食蟹猴血液中之習用CD4⁺記憶性T效應細胞pSTAT5a因應於DP47GS IgG-(IL-2)₂或DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之活化。使用來自圖11中所闡述三種猴供體之相同20 ng/mL經刺激血液試樣，檢驗習用CD4⁺記憶性T效應細胞中之pSTAT5a之誘導。(A)用於使用CD45RA (y軸)及CD25 (x軸)鑑別習用CD4⁺FOXP3⁻CD45RA⁻記憶性T效應細胞之流式細胞術選通策略。(B)全部CD4⁺FOXP3⁻CD45RA⁻記憶性T效應細胞之pSTAT5a反應。(C)亦為CD25⁻之記憶性T效應細胞之pSTAT5a反應。(D)亦為CD25⁺之記憶性T效應細胞之pSTAT5a反應。

圖22.食蟹猴周邊血T細胞子組中之pSTAT5a因應於DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之誘導。評價針對兩種健康成年供體不同劑量(0.03-300 ng/mL)之DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂對STAT5a磷酸化誘導之效應。展示針對以下各項之結果：CD4⁺ Treg子組(A-C)：活化(A)、記憶性(C)及幼稚(B) Treg及習用CD4⁺記憶性T效應細胞(D)。兩種猴獲得類似結果且展示來自一種供體之結果以闡釋DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之效

應。

圖23.在小鼠中，DP47GS IgG-IL-2具有優於DP47GS IgG-(IL-2)₂之藥物動力學(PK)性質，而DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂具有中間性質。(A)向NOD及NOD.*scid*小鼠經靜脈內(i.v.)注射0.3 mg/kg DP47GS IgG-IL-2或0.3 mg/kg DP47GS IgG-(IL-2)₂。(B)向NOD.*scid*.*IL2Rα*^{-/-}小鼠經靜脈內注射0.1 mg/kg DP47GS IgG-IL-2、0.3 mg/kg DP47GS IgG-(IL-2)₂或0.1 mg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂。在血清試樣中於指示時間下藉由基於mAb之捕獲分析來評價人類IL-2。

圖24.在使用Proleukin[®]、DP47GS IgG-IL-2、DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂治療之後，鼠類Treg中之CD25及FoxP3皆有所增加。使用Proleukin[®] (20,000及100,000 IU/小鼠，n=3)、DP47GS IgG-IL-2、DP47GS IgG-(IL-2)₂或DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (60、300或1,500 IU/小鼠，n=3)治療BALB/c小鼠，包含媒劑治療小鼠作為未刺激對照(n=4)。在治療之後24小時，評價脾臟Treg之CD25及FOXP3含量。觀察所有4種IL2分子中(A)細胞表面CD25之劑量依賴性變化及(B)細胞內FoxP3之劑量依賴性變化。數據表示為平均值±SD，黑條代表所使用之最高劑量且淺灰條代表最低劑量。

圖25.在正常健康成年生物幼稚食蟹猴中評價DP47GS IgG-IL-2及DP47GS IgG-(IL-2)₂之PK性質。(A)以短濃注形式以10、25及100 µg/kg (n=2/劑量)之劑量經靜脈內(i.v.)注射DP47GS IgG-IL-2。(B)以短濃注形式以10及25 µg/kg (n=2/劑量)之劑量經靜脈內注射DP47GS IgG-(IL-2)₂。在血清試樣中於指示時間藉由基於mAb之捕獲分析來評價人類IL-2。

圖26.DP47GS IgG-IL2在食蟹猴中具有增加調節性T細胞之劑量依賴性效應。以(A)絕對Treg細胞數/mm³全血及(B) Treg之倍數變化形式展示在治療後第7天全血CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺調節性T細胞(Treg)之

變化。所有數據表示為平均值 $\pm$ SD。開放條：DP47GS IgG-IL-2 (n=6)；陰影條：媒劑(n=3)。

圖27.DP47GS IgG-IL-2對食蟹猴中之Treg之時間及低劑量效應。(A)在投用2或6 $\mu\text{g/kg}$ DP47GS IgG-IL-2 (n分別為4及6)後Treg倍數增加之時間依賴性變化。(B)在投用2或6 $\mu\text{g/kg}$ DP47GS IgG-IL-2 (n分別為4及6)之後血液中之Treg絕對計數之時間依賴性變化。所有數據展示為平均值 $\pm$ SD形式。

圖28.單一劑量之Proleukin刺激食蟹猴中之瞬時劑量依賴性Treg反應。(A)在使用 3×10^4 至 3×10^5 IU/kg Proleukin進行單一劑量治療之後周邊血Treg數量之變化。(B)在使用 3×10^4 至 3×10^5 IU/kg Proleukin進行單一劑量治療之後Treg pSTAT5a之變化。數據展示為平均值 $\pm$ SD。

圖29.在食蟹猴中之Treg誘導中，低劑量DP47GS IgG-IL-2較高劑量Proleukin[®]更為有效。使用低劑量DP47GS IgG-IL-2或高劑量Proleukin治療正常健康食蟹猴(n=5之組)且在第10天測試調節性T細胞變化。在第0及7天，以16,800 IU/kg (12 $\mu\text{g/kg}$)之劑量經皮下給予DP47GS IgG-IL-2。每週3次(MWF)經皮下給予Proleukin治療(200,000 IU/kg)且總共5個劑量。以以下各項之平均值 $\pm$ SD形式展示結果：(A)總Treg變化/ mm^3 血液、(B) Treg之倍數增加及(C) Treg對習用CD4⁺FOXP3⁺細胞之比率之變化。開放條繪示IL-2治療且陰影條繪示媒劑對照。

圖30.作為用於DP47GS IgG-IL-2 Treg活體內活化之敏感性生物標記物之離體全血磷酸化STAT5。在向健康食蟹猴(n=5)活體內投與單一低劑量之DP47GS IgG-IL-2 (12 $\mu\text{g/kg}$)之後1及3天，收集全血且立即在無刺激下測試磷酸化STAT5 (pSTAT5a)。在治療之前第0天對每一猴實施取血且量測pSTAT5a之量(陰影條)並用於個別地評價治療後之

倍數變化(開放條)。展示(A) Treg pSTAT5a在第1及3天之倍數變化、(B)習用CD4⁺ CD45⁻記憶性T細胞中pSTAT5a之倍數變化及(C)幼稚T細胞pSTAT5a之倍數變化。數據展示為平均值± SD。

圖31. 作為用於低劑量DP47GS IgG-IL-2 Treg活體內活化之敏感性生物標記物之離體全血STAT5a。在向健康食蟹猴活體內投與單一低劑量之DP47GS IgG-IL-2之後第一至七天，收集全血且立即在無刺激下測試pSTAT5a。在治療之前第0天對每一猴實施取血以測定pSTAT5a未刺激含量並與治療後pSTAT5a變化進行比較。(A)在使用2 µg/kg DP47GS IgG-IL-2 (n=4)治療之前及之後之Treg pSTAT5a。(B)在使用6 µg/kg DP47GS IgG-IL-2 (n=6)治療之前及之後之Treg pSTAT5a。數據展示為平均值± SD。

圖32.離體食蟹猴全血Ki-67用作用於DP47GS IgG-IL-2誘導之活體內T細胞增殖之標記物。亦離體監測使用2及6 µg/kg如圖14中所闡述之DP47GS IgG-IL-2治療之食蟹猴中細胞內標記物Ki-67之變化以評價活體內增殖程度。在治療之前第0天量化細胞週期(Ki-67⁺)中細胞之正常穩態百分比且然後在接下來7至11天每天進行監測。展示(A) Treg之Ki-67⁺ %、(B)習用CD4⁺CD45⁻記憶性/效應T細胞之Ki-67⁺ %及(C)幼稚CD4⁺CD45RA⁺ T細胞之Ki-67⁺ %。數據展示為平均值± SD。

圖33. DP47GS IgG-(IL-2)₂對幼稚健康食蟹猴中之Treg之時間及低劑量效應。(A)在6 µg/kg DP47 IgG-(IL-2)₂之後Treg絕對數量之時間依賴性變化。(B)在治療之後Treg pSTAT5a之時間依賴性變化；(C) Treg倍數增加之時間依賴性變化；及(D) DP47Gs IgG-IL-2治療猴(開放條，2 µg/kg至36 µg/kg)與DP47GS IgG-(IL-2)₂治療猴(陰影條，6 µg/kg)之Treg倍數變化之對比。以平均值± SD (n=4至6)形式展示所有數據。

圖34.極低劑量之DP47GS IgG-(IL-2)₂對幼稚健康食蟹猴中之Treg

之時間及劑量依賴性效應。(A)在投與0.7及2 $\mu\text{g/kg}$ DP47GS IgG-(IL-2)₂後Treg倍數增加之時間依賴性變化。(B)在治療之前第0天及在治療之後第1-4天量測之Treg pSTAT5a之時間依賴性變化；(C) Teff/mem細胞pSTAT5a之時間依賴性變化。以平均值 $\pm$ SD (在0.7 $\mu\text{g/kg}$ 下n=3及在2 $\mu\text{g/kg}$ 下n=8)形式展示所有數據。

圖35.DP47GS IgG-IL-2與DP47GS IgG-(IL-2)₂及其增加全血食蟹猴Treg之能力之劑量依賴性對比。以平均值 $\pm$ SD (n=3至6)形式呈現所有數據。

圖36.使用次世代測序(Next generation sequencing, NGS)分析轉錄因子FOXP3及免疫阻抑分子CTLA-4之T細胞子組特異性DNA去甲基化。在使用最佳劑量之DP47GS IgG-IL-2 (25 $\mu\text{g/kg}$, n=4)及DP47GS IgG-(IL-2)₂ (6 $\mu\text{g/kg}$, n=4)進行治療之前及之後分析來自成年生物幼稚食蟹猴之血液。使用BD FACSAria自全血PBMC分選CD4⁺ T細胞子組且使用100,000個細胞/子組進行基因特異性DNA去甲基化。在兩種治療中看到類似結果且來自DP47GS IgG-(IL-2)₂治療猴之針對FOXP3之數據展示於頂組中且針對CTLA-4者展示於底組中(n=4, 平均值 $\pm$ SD)。

圖37.在正常健康生物幼稚食蟹猴中評價DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之PK性質。(A)以短濃注形式以30及100 $\mu\text{g/kg}$ (n=2/劑量)之劑量經靜脈內(iv)注射DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂。(B)在側背部以30及100 $\mu\text{g/kg}$ (n=2/劑量)之劑量經皮下(sc)注射0.2 ml DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂。在血漿試樣中於指示時間使用基於單株抗體之捕獲分析來評價人類IL-2。(C)在以30及100 $\mu\text{g/kg}$ 之劑量注射IgG-(IL-2N88D)₂之後於血漿中量測可溶性CD25(作為IL-2暴露之生物標記物)；在已知與食蟹猴sCD25交叉反應之基於人類sCD25 mAb之捕獲分析中量測食蟹猴sCD25。以平均值 $\pm$ SEM (n=4)形式展示結果。

圖38.DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂對幼稚健康食蟹猴中之Treg之活體內時間及劑量依賴性效應。在注射(A) 100 µg/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂或(B) 30 µg/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂後總Treg、CD4⁺記憶性Treg、CD4⁺幼稚Treg及CD8⁺FOXP3⁺ Treg之絕對數量($\times 10^6$ /ml血液)之時間依賴性變化。在注射100 µg/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ (C)或30 µg/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂ (D)後Treg之時間依賴性變化(總Treg、CD4⁺記憶性Treg、CD4⁺幼稚Treg及CD8⁺FOXP3⁺ Treg之CD4⁺或CD8⁺T細胞之%)。以平均值 $\pm$ SEM (n=4)形式展示結果。

圖39.DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂對幼稚健康食蟹猴中之淋巴球之活體內時間及劑量依賴性效應。以在注射100 µg/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂或30 µg/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂後總CD4⁺ T細胞之%形式展示CD4⁺記憶性T效應物之時間依賴性變化(A)。以在注射100 µg/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂或30 µg/kg DP47 IgG-(IL-2N88D)₂後CD4⁺記憶性T效應物之%形式展示CD4⁺CD25^{hi}記憶性T效應物之時間依賴性變化(B)。以平均值 $\pm$ SEM (n=4)形式展示結果。

圖40.離體全血pSTAT5a係用於活體內IL-2活化之敏感性生物標記物。在向食蟹猴活體內投與單一劑量之DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之後第1至11天，收集全血且立即在無刺激下測試pSTAT5a。在治療之前第0天對每一猴實施取血以測定pSTAT5a未刺激含量並與治療後pSTAT5a變化進行比較。(A)在使用100 µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂進行治療之前及之後之pSTAT5a (MFI，最大平均螢光強度)，n=4。(B)在使用30 µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂進行治療之前及之後之pSTAT5a，n=4。以指示細胞子組之平均值 $\pm$ SEM形式展示數據。

圖41.離體全血細胞表面CD25染色係用於活體內IL-2活化之敏感性生物標記物。在向食蟹猴活體內投與單一劑量之DP47GS IgG-(IL-

2N88D)₂之後第1至14天，收集全血且立即在無刺激下測試指示細胞類型之表面CD25。在治療之前第0天對每一猴實施取血以測定CD25未刺激含量並與治療後CD25變化進行比較。(A)在使用100 µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂進行治療之前及之後之CD25染色(最大MFI，平均螢光強度)，n=4。(B)在使用30 µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂進行治療之前及之後之CD25染色，n=4。以指示細胞子組之平均值± SEM形式展示數據。

圖42.離體全血細胞內Ki-67染色係用於活體內IL-2活化之後之細胞增殖之敏感性生物標記物。在向食蟹猴活體內投與單一劑量之DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之後第1至14天，收集全血且立即在無刺激下測試指示細胞類型之細胞內Ki-67。在治療之前第0天對每一猴實施取血以測定Ki-67⁺細胞未刺激含量且與治療後Ki-67⁺細胞%變化進行比較。(A)在使用100 µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂進行治療之前及之後之Ki-67染色(Ki-67⁺細胞%)，n=4。(B)在使用30 µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂進行治療之前及之後之Ki-67 (Ki-67⁺細胞%)染色，n=4。以指示細胞子組之平均值± SEM形式展示結果。

圖43.IL-2對食蟹猴Treg之活體內效應之對比匯總。展示Proleukin、IgG-IL-2、IgG-(IL-2)₂及IgG-(IL-2N88D)₂之總Treg之最大增加(以CD4⁺ T細胞之%形式)；為進行對比，將所有活體內劑量轉化成pmol/kg。每週3次(MWF)經2週給予Proleukin且以單一注射形式投與IL-2融合蛋白。以平均值± SEM形式展示結果；Proleukin (n=5)、IgG-IL-2 (n=6)、IgG-(IL-2)₂ (n=6)及IgG-(IL-2N88D)₂ (n=4)。

圖44.高劑量IL-2在食蟹猴中誘導嗜酸性球增多症。在使用Proleukin或IL-2免疫偶聯物之所有測試中監測血液嗜酸性球計數變化。在使用高劑量Proleukin (2×10^5 IU/kg，每週3次，2週)或較高劑量DP47GS IgG-IL-2進行治療之後7至14天檢測到嗜酸性球增多症，但

在使用 DP47GS IgG-(IL-2)₂ 或 DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ 時並未檢測到。IL-2劑量之基線嗜酸性球計數係開圓(展示為「0」)且實施測試兩次，一次係針對野生型IL-2分子測試且一次係針對DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂測試。數據展示為平均值±SD。

圖45.使用DP47GS IgG-IL-2進行活體內治療會阻抑鼠類綿羊紅血球延遲型超敏反應(DTH)。展示使用媒劑(100%反應)、IgG-IL-2 (4,000 IU/小鼠)或小鼠CTLA-4-Ig (作為陽性對照，200 µg/小鼠)治療之個別小鼠之所有數據。(A)來自NOD小鼠之結果及(B) C57BL/6小鼠之結果。以與非免疫小鼠相比爪重量之變化(Δ爪重量)之形式展示第4天DTH反應之等級。數據展示為平均值±SD。

圖46.在(A)在免疫之後21天之C57BL/6小鼠及(B)在免疫之後7天之NOD小鼠中，使用DP47GS IgG-IL-2 (4,000 IU/小鼠)進行活體內治療會阻抑對KLH之鼠類IgG抗體反應。數據展示為平均值±SD。

【實施方式】

定義

除非下文另有定義，否則本文所用之術語具有業內通用含義。

如本文中所使用，術語「融合蛋白」係指包括免疫球蛋白分子及IL-2分子之融合多肽分子，其中融合蛋白之組份藉由肽鍵直接或經由肽連接體彼此連接。清晰起見，融合蛋白之免疫球蛋白組份之個體肽鏈可以非共價方式(例如藉由二硫鍵)連接。

「融合」係指組份藉由肽鍵直接或經由一或多個肽連接體連接。

「特異性結合」意指該結合對抗原具有選擇性且可區別於不需要之相互作用或非特異性相互作用。免疫球蛋白與特定抗原結合之能力可經由酶聯免疫吸附分析(ELISA)或熟習此項技術者熟知之其他技術(例如表面電漿共振(SPR)技術(在BIAcore儀器上分析) (Liljeblad等

人, Glyco J 17, 323-329 (2000))及傳統結合分析(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)))來量測。在一實施例中, 免疫球蛋白與無關蛋白質之結合程度小於免疫球蛋白與抗原之結合之約10%, 如藉由(例如) SPR所量測。在某些實施例中, 結合抗原之免疫球蛋白具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 或 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例如 10^{-8} M 或更小, 例如 10^{-8} M 至 10^{-13} M , 例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M)之解離常數(K_D)。

「親和力」或「結合親和力」係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合配偶體(例如抗原)之間之非共價相互作用的總和強度。除非另外指示, 否則如本文中所使用, 「結合親和力」係指固有結合親和力, 其反映結合對之成員(例如抗體及抗原)之間之1:1相互作用。分子X對其配偶體Y之親和力通常可由解離常數(K_D)表示, 解離常數係解離速率常數與締合速率常數(分別為 $k_{\text{解離}}$ 及 $k_{\text{締合}}$)之比率。因此, 等效親和力可包括不同速率常數, 只要速率常數之比率保持相同即可。可藉由業內已知之常用方法(包含彼等本文所述者)來量測親和力。量測親和力之特定方法係表面電漿共振(SPR)。

「減小結合」(例如減小至Fc受體或IL-2受體之結合)係指降低各別相互作用之親和力, 如(例如)藉由SPR所量測。清晰起見, 該術語包含亦將親和力減小至零(或低於分析方法之檢測限值), 亦即完全廢除相互作用。與之相反, 「增加結合」係指增加各別相互作用之結合親和力。

如本文中所使用, 術語「抗原決定簇」與「抗原」同義, 且係指多肽大分子上抗體結合形成抗體-抗原複合物之位點(例如胺基酸之鄰近序列段或由非鄰近胺基酸之不同區域構成之構象構形)。可用抗原決定簇可發現於(例如)細胞表面上、血清中(自由存在)及/或細胞外基質(ECM)中。

如本文中所使用，術語「單鏈」係指包括由肽鍵線性連接之胺基酸單體之分子。

術語「抗體」在本文中係以最廣泛意義使用且涵蓋各種抗體結構，包含但不限於單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現期望抗原結合活性即可。

「抗體片段」係指除完整抗體外之分子，其包括完整抗體中結合完整抗體所結合之抗原的一部分。抗體片段之實例包含但不限於Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、雙特異性抗體、直鏈抗體、單鏈抗體分子(例如scFv)及單鏈抗體。

術語「免疫球蛋白分子」係指具有天然抗體結構之蛋白質。舉例而言，IgG類免疫球蛋白係約150,000道爾頓(dalton)之異源四聚體糖蛋白，其由二硫鍵鍵結之兩條輕鏈及兩條重鏈構成。自N末端至C末端，每一免疫球蛋白重鏈依次具有可變區(VH) (亦稱為可變重鏈結構域或重鏈可變結構域)及三個恆定結構域(CH1、CH2及CH3)(亦稱為重鏈恆定區)。類似地，自N末端至C末端，每一免疫球蛋白輕鏈依次具有可變區(VL) (亦稱為可變輕鏈結構域或輕鏈可變結構域)及恆定輕鏈(CL)結構域(亦稱為輕鏈恆定區)。可將免疫球蛋白之重鏈指定為5個種類中之一者，稱為 α 型(IgA)、 δ 型(IgD)、 ϵ 型(IgE)、 γ 型(IgG)或 μ 型(IgM)，其中之一些可進一步分為子類，例如 γ_1 型(IgG₁)、 γ_2 型(IgG₂)、 γ_3 型(IgG₃)、 γ_4 型(IgG₄)、 α_1 型(IgA₁)及 α_2 型(IgA₂)。基於免疫球蛋白之恆定結構域之胺基酸序列，可將該免疫球蛋白之輕鏈指定為兩個類型中之一者，稱為 κ 型(κ)及 λ 型(λ)。免疫球蛋白基本上由經由免疫球蛋白鉸鏈區連接之兩個Fab分子及Fc結構域組成。

如本文中所使用，「Fab片段」係指包括輕鏈(CL)之VL結構域及恆定結構域及重鏈之VH結構域及第一恆定結構域(CH1)之免疫球蛋白片段。

抗體或免疫球蛋白之「種類」係指重鏈所擁有之恆定結構域或恆定區之類型。存在5大類免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且該等類別中之若干種可進一步分成子類(同種型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同類別之免疫球蛋白之重鏈恆定結構域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

術語「可變區」或「可變結構域」係指免疫球蛋白或抗體重鏈或輕鏈中通常參與使免疫球蛋白或抗體與抗原結合之結構域。然而，本發明之融合蛋白中所包括之免疫球蛋白可包括並不賦予抗原結合特異性之可變區。免疫球蛋白或抗體之重鏈及輕鏈之可變結構域(分別為VH及VL)通常具有類似結構，其中每一結構域均包括4個保守框架區(FR)及三個超變區(HVR)。例如參見 Kindt 等人，Kuby Immunology，第6版，W.H. Freeman and Co.，第91頁(2007)。單一VH或VL結構域可足以賦予抗原結合特異性。

本文所用之術語「超變區」或「HVR」係指免疫球蛋白或抗體可變結構域區域中序列具有超變性及/或形成結構上經界定之環(「超變環」)中的每一者。通常，原始四鏈抗體包括六個HVR；三個位於VH中(H1、H2、H3)，且三個位於VL中(L1、L2、L3)。HVR通常包括來自超變環及/或來自「互補決定區」(CDR)之胺基酸殘基，後者具有最高序列可變性及/或涉及抗原識別。實例性超變環出現於胺基酸殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3)處(Chothia及Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917(1987))。實例性CDR (CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)出現於胺基酸殘基L1之24-34、L2之50-56、L3之89-97、H1之31-35B、H2之50-65及H3之95-102處(Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。除VH中之CDR1外，CDR

通常包括形成超變環之胺基酸殘基。CDR亦包括「特異性決定殘基」或「SDR」，其係接觸抗原之殘基。SDR含於CDR中稱為縮短-CDR (abbreviated-CDR)或a-CDR之區域內。實例性a-CDR (a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2及a-CDR-H3)出現於胺基酸殘基L1之31-34、L2之50-55、L3之89-96、H1之31-35B、H2之50-58及H3之95-102處(參見Almagro及Fransson, *Front. Biosci* 13, 1619-1633 (2008))。除非另外指示，否則可變結構域中之HVR殘基及其他殘基(例如FR殘基)在本文中係根據Kabat等人所述編號(見上文，稱為「Kabat編號」)。

「框架」或「FR」係指除超變區(HVR)殘基外之可變結構域殘基。可變結構域之FR通常由4個FR結構域：FR1、FR2、FR3及FR4組成。因此，HVR及FR序列通常出現於VH (或VL)中之下列序列中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

「人類免疫球蛋白」係具有對應於如下免疫球蛋白之胺基酸序列的胺基酸序列者：其由人類或人類細胞產生或源自利用人類免疫球蛋白譜或其他編碼人類免疫球蛋白之序列之非人類來源。人類免疫球蛋白之此定義明確排除包括非人類抗原結合殘基之人類化免疫球蛋白。

本文所用之術語「單株抗體」係指自實質上同源之抗體群體得之抗體，亦即，構成該群體之個別抗體相同及/或結合相同表位，但可能之變體抗體除外，例如含有天然突變或在產生單株抗體製劑期間產生，該等變體通常少量存在。與通常包含針對不同決定簇(表位)之不同抗體之多株抗體製劑相比，單株抗體製劑之每一單株抗體針對抗原上之單一決定簇。因此，修飾語「單株」指示自抗體之實質上同源群體獲得之抗體性質，且不應解釋為需要藉由任一特定方法產生抗體。舉例而言，根據本發明使用之單株抗體可藉由多種技術製得，包

含但不限於雜交瘤方法、重組DNA方法、噬菌體展示方法及利用含有所有或一部分人類免疫球蛋白基因座之轉基因動物之方法，該等方法及用於製備單株抗體之其他實例性方法闡述於本文中。

術語「Fc結構域」或「Fc區」在本文中用於定義免疫球蛋白重鏈中含有恆定區之至少一部分的C末端區域。該術語包含原始序列Fc區及變體Fc區。IgG Fc區包括IgG CH2及IgG CH3結構域。人類IgG Fc區之「CH2結構域」通常自約231位處之胺基酸殘基延伸至約340位處之胺基酸殘基。在一實施例中，碳水化合物鏈附接至CH2結構域。本文之CH2結構域可為原始序列CH2結構域或變體CH2結構域。「CH3結構域」包括Fc區中CH2結構域C末端之殘基伸展部分(亦即來自IgG之約341位處之胺基酸殘基至約447位處之胺基酸殘基)。本文之CH3區可為原始序列CH3結構域或變體CH3結構域(例如在一個鏈中引入隆凸(「凸起」)且在另一鏈中相應地引入空腔(「孔洞」)之CH3結構域；參見美國專利第5,821,333號，其以引入方式明確併入本文中)。該等變體CH3結構域可用於促進如本文所闡述之兩個不相同免疫球蛋白重鏈之異源二聚化。在一實施例中，人類IgG重鏈Fc區自Cys226或自Pro230延伸至重鏈之羧基末端。然而，可存在或可不存在Fc區之C末端離胺酸(Lys447)。除非在本文中另外指定，否則Fc區或恆定區中胺基酸殘基之編號係根據亦稱為EU指數之EU編號系統，如Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所闡述。

術語「效應物功能」係指彼等可歸因於免疫球蛋白之Fc區之生物學活性，其可隨免疫球蛋白同種型而有所變化。免疫球蛋白效應物功能之實例包含：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)、Fc受體結合、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、抗體依賴性細胞吞噬

作用(ADCP)、細胞激素分泌、免疫複合體調介之抗原呈遞細胞之抗原攝取、細胞表面受體(例如B細胞受體)之下調及B細胞活化。

「活化Fc受體」係在由免疫球蛋白之Fc區結合後引發刺激具有受體之細胞實施效應物功能之信號傳導事件的Fc受體。活化Fc受體包含 FcγRIIIa (CD16a)、FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32) 及 FcαRI (CD89)。特定活化Fc受體係人類FcγRIIIa (參見UniProt登錄編號：P08637 (141版))。

除非另外指示，否則本文所用之術語「介白素-2」或「IL-2」係指來自任一脊椎動物來源之任一原始IL-2，該脊椎動物來源包含哺乳動物，例如靈長類動物(例如人類)及齧齒類動物(例如小鼠及大鼠)。該術語涵蓋未處理IL-2以及在細胞處理中產生之任一形式的IL-2。該術語亦涵蓋天然IL-2變體，例如剪接變體或等位基因變體。實例性人類IL-2之胺基酸序列展示於SEQ ID NO: 1中。未處理人類IL-2另外包括N末端20胺基酸信號肽，該N末端20胺基酸信號肽不存在於成熟IL-2分子中。

「原始IL-2」(亦稱為「野生型IL-2」)意指天然IL-2。原始人類IL-2分子之序列展示於SEQ ID NO: 1中。出於本發明目的，術語野生型亦涵蓋包括一或多種與天然、原始IL-2相比並不改變IL-2受體結合之胺基酸突變(例如在對應於人類IL-2之殘基125之位置處將半胱胺酸取代為丙胺酸)之IL-2形式。在一些實施例中，出於本發明目的，野生型IL-2包括胺基酸取代C125A (參見SEQ ID NO: 3)。

除非另外指示，否則本文所用之術語「CD25」或「IL-2受體α」係指來自任一脊椎動物來源之任一原始CD25，該脊椎動物來源包含哺乳動物，例如靈長類動物(例如人類)及齧齒類動物(例如小鼠及大鼠)。該術語涵蓋「全長」未處理CD25以及自處理細胞產生之任一形式的CD25。該術語亦涵蓋CD25之天然變體，例如剪接變體或等位基

因變體。在某些實施例中，CD25係人類CD25。實例性人類CD25之胺基酸序列(具有信號序列Avi標籤及His標籤)展示於SEQ ID NO: 25中。

本文所用之術語「高親和力IL-2受體」係指異源三聚體形式之IL-2受體，其由受體 γ -亞單位(亦稱為常見細胞激素受體 γ -亞單位、 γ_c 或CD132)、受體 β -亞單位(亦稱為CD122或p70)及受體 α -亞單位(亦稱為CD25或p55)組成。與之相比，術語「中間親和力IL-2受體」或「IL-2受體 $\beta\gamma$ 」係指僅包含 γ 亞單位及 β 亞單位而沒有 α 亞單位之IL-2受體(關於綜述，例如參見Olejniczak及Kasprzak, Med Sci Monit 14, RA179-189 (2008))。實例性人類CD122及CD132之胺基酸序列(使用His標籤融合至Fc區)分別展示於SEQ ID NO 21及23中。

「調節性T細胞」或「Treg細胞」意指可阻抑其他T細胞之反應之特殊類型CD4⁺ T細胞(效應T細胞)。Treg細胞之特徵在於CD4、IL-2受體之 α 亞單位(CD25)及轉錄因子叉頭框蛋白P3 (FOXP3)之表現(Sakaguchi, Annu Rev Immunol 22, 531-62 (2004))，且在誘導及維持對抗原(包含彼等由腫瘤表現者)之周邊自身耐受性發揮關鍵作用。

「習用CD4⁺ T細胞」意指除調節性T細胞外之CD4⁺ T細胞。習用CD4⁺記憶性T細胞之特徵在於CD4、CD3、但非FOXP3之表現。「習用CD4⁺記憶性T細胞」係習用CD4⁺ T細胞之子組，其特徵進一步在於缺乏CD45RA表現，與之相比，「習用CD4⁺幼稚T細胞」表現CD45RA。

「選擇性活化Treg細胞」意指活化Treg細胞且基本上並不同時活化其他T細胞子組(例如CD4⁺ T輔助細胞、CD8⁺細胞毒性T細胞、NK T細胞)或天然殺傷(NK)細胞。鑑別及區分該等細胞類型之方法闡述於實例中。活化可包含誘導IL-2受體信號傳導(如(例如)藉由檢測磷酸化STAT5a所量測)、誘導增殖(如(例如)藉由檢測Ki-67所量測)及/或上調活化標記物(例如CD25)之表現。

術語「肽連接體」係指包括一或多個胺基酸、通常約2-20個胺基酸之肽。業內已知肽連接體或闡述於本文中。適宜非免疫原性連接體肽包含(例如) $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ 或 $G_4(SG_4)_n$ 肽連接體。「n」通常係介於1與10之間、通常介於2與4之間之數值。

術語「修飾」係指肽骨架(例如胺基酸序列)之任一操作或多肽之轉譯後修飾(例如糖基化)。

「凸起與孔洞修飾」係指CH3結構域中之兩個免疫球蛋白重鏈之間之界面內的修飾，其中i)在一個重鏈之CH3結構域中，胺基酸殘基經具有較大側鏈體積之胺基酸殘基代替，由此在一個重鏈之CH3結構域中之界面內生成隆凸(「凸起」)，其可定位於另一重鏈之CH3結構域中之界面內之空腔(「孔洞」)中，且ii)在另一重鏈之CH3結構域中，胺基酸殘基經具有較小側鏈體積之胺基酸殘基代替，由此在第二CH3結構域中之界面內生成空腔(「孔洞」)，在該空腔(「孔洞」)內可定位有第一CH3結構域中之界面內之隆凸(「凸起」)。在一實施例中，「凸起與孔洞修飾」包括一條抗體重鏈中之胺基酸取代T366W及視情況胺基酸取代S354C及另一條抗體重鏈中之胺基酸取代T366S、L368A、Y407V及視情況Y349C。凸起與孔洞技術闡述於(例如)US 5,731,168；US 7,695,936；Ridgway等人，Prot Eng 9, 617-621 (1996)及Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)中。通常，該方法涉及在第一多肽之界面處引入隆凸(「凸起」)且在第二多肽之界面處引入相應空腔(「孔洞」)，從而該隆凸可定位於空腔中以促進異源二聚體形成並防止同源二聚體形成。藉由使用較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)代替來自第一多肽界面之較小胺基酸側鏈來構築隆凸。藉由使用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)代替較大胺基酸側鏈來在第二多肽之界面上產生尺寸與隆凸相同或類似之補償性空腔。分別在S354位及Y349位處引入兩個半胱胺酸殘基會在Fc區中之兩個抗體重鏈之間形

成二硫橋鍵，從而進一步穩定二聚體(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001))。

胺基酸「取代」係指在多肽中使用另一胺基酸代替一種胺基酸。在一實施例中，使用另一具有類似結構及/或化學性質之胺基酸代替胺基酸，例如保守胺基酸代替。「保守」胺基酸取代可基於所涉及殘基在以下方面中之相似性來進行：極性、電荷、溶解度、疏水性、親水性及/或兩親性特性。舉例而言，非極性(疏水性)胺基酸包含丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、纈胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、色胺酸及甲硫胺酸；極性中性胺基酸包含甘胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、半胱胺酸、酪胺酸、天門冬醯胺酸及麩醯胺酸；帶正電荷(鹼性)胺基酸包含精胺酸、離胺酸及組胺酸；且帶負電荷(酸性)胺基酸包含天門冬胺酸及麩胺酸。非保守取代使得需要將該等種類之一種之成員與另一種類交換。舉例而言，胺基酸取代亦可使得使用具有不同結構及/或化學性質之另一胺基酸代替一種胺基酸，例如使用來自不同基團(例如鹼性基團)之另一胺基酸代替來自一種基團(例如極性基團)之胺基酸。可使用業內熟知之基因或化學方法生成胺基酸突變。基因方法可包含定點誘變、PCR、基因合成及諸如此類。預計亦可使用藉由除基因改造外之方法來改變胺基酸之側鏈基團的方法，例如化學修飾。可在本文中使用各種名稱來指示相同胺基酸取代。舉例而言，自免疫球蛋白重鏈之329位處之脯胺酸至甘胺酸之取代可指示為329G G329、G₃₂₉、P329G或Pro329Gly。

就參考肽序列而言，「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對序列並引入空位(視需要)以達到最大序列一致性百分比後候選序列中與參考肽序列中之胺基酸殘基一致之胺基酸殘基的百分比，且不將任何保守取代視為序列一致性之一部分。出於確定胺基酸序列一致性百分比之目的，比對可以熟習此項技術者所熟知之各種方式來達

成，例如使用可公開獲得之電腦軟體，例如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。彼等熟習此項技術者可確定用於比對序列之合適參數，包含在所比較序列之全長範圍內達成最大比對所需要之任何算法。然而，出於本文目的，使用序列對比電腦程式ALIGN-2來產生胺基酸序列一致性百分比值。ALIGN-2序列對比電腦程式係由Genentech公司設計，且原始碼與使用者文件已一起編入美國版權局，Washington D.C., 20559中，其中其以美國版權註冊號TXU510087註冊。ALIGN-2程式可自Genentech公司，South San Francisco, California公開獲得，或可自源代碼進行編譯。ALIGN-2程式應經編譯用於UNIX操作系統(包括數位UNIX V4.0D)中。所有序列比較參數均由ALIGN-2程式設定且不改變。在採用ALIGN-2進行胺基酸序列比較之情形下，給定胺基酸序列A相對於(to)、與(with)或對(against)給定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性百分比(或者可表達為相對於、與或對給定胺基酸序列B具有或包括一定胺基酸序列一致性%之給定胺基酸序列A)計算如下：

$$100 \text{ 乘以分數 } X/Y$$

其中X係在A與B之程式比對中由序列比對程式ALIGN-2評定為一致性匹配之胺基酸殘基數，且其中Y係B中胺基酸殘基之總數。應瞭解，若胺基酸序列A之長度不等於胺基酸序列B之長度，則A相對於B之胺基酸序列一致性百分比將不等於B相對於A之胺基酸序列一致性百分比。除非另外明確陳述，否則本文所用之所有胺基酸序列一致性百分比的值皆係根據前面緊接段落中所闡述使用ALIGN-2電腦程式獲得。

本文所互換使用之「多核苷酸」或「核酸」係指任一長度之核苷酸之聚合物，且包含DNA及RNA。核苷酸可為去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾核苷酸或鹼基及/或其類似物或任一可藉由DNA或

RNA聚合酶或藉由合成反應納入聚合物中之受質。多核苷酸可包括經修飾核苷酸，例如甲基化核苷酸及其類似物。非核苷酸組份可中斷核苷酸序列。多核苷酸可包括在合成之後進行之修飾，例如偶聯至標記。

具有與本發明參考核苷酸序列至少(例如) 95%「一致」之核苷酸序列的核酸或多核苷酸欲指，除去按參考核苷酸序列之每100個核苷酸計該多核苷酸序列可包含至多5處點突變外，該多核苷酸之核苷酸序列與參考序列一致。換言之，為獲得具有與參考核苷酸序列至少95%一致之核苷酸序列的多核苷酸，參考序列中最多5%核苷酸可缺失或經另一核苷酸取代，或可將佔參考序列中總核苷酸最多5%之大量核苷酸插入參考序列中。該等參考序列之改變可發生在參考核苷酸序列之5'或3'末端位置或在彼等末端位置之間之任何位置，其係個別地散佈在參考序列殘基中之各殘基之間或在參考序列內呈一或多個鄰近基團形式。作為實際情況，可使用已知電腦程式(例如上文針對多肽所論述者(例如ALIGN-2))按慣例確定任一特定多核苷酸分子序列與本發明核苷酸序列是否為至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。

本文所用之術語「載體」係指能夠轉運與其連接之另一核酸的核酸分子。該術語包含呈自複製核酸結構之載體以及納入引入其之宿主細胞基因組中的載體。某些載體能夠引導與其可操作連接之核酸的表現。該等載體在本文中稱為「表現載體」。

術語「宿主細胞」、「宿主細胞系」及「宿主細胞培養物」可互換使用且係指已引入外源核酸之細胞，包含該等細胞之子代。宿主細胞包含「轉化體」及「經轉化細胞」，其包含原代經轉化細胞及源自其之子代(與傳代次數無關)。子代之核酸含量可與親代細胞並不完全相同，但可含有突變。本文包含經篩選或選擇用於原始經轉化細胞

中之具有相同功能或生物活性的突變體子代。宿主細胞係任一類型之可用於生成本發明之融合蛋白之細胞系統。宿主細胞包含培養細胞，例如哺乳動物培養細胞，例如CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髓瘤細胞、P3X63小鼠骨髓瘤細胞、PER細胞、PER.C6細胞或雜交瘤細胞、酵母細胞、昆蟲細胞及植物細胞(僅舉幾個例子)，且亦包括轉基因動物、轉基因植物或培養植物或動物組織中所含細胞。

藥劑之「有效量」係指在投與該藥劑之細胞或組織中產生生理學變化所需之量。

藥劑(例如醫藥組合物)之「治療有效量」係指在所需時間內以所需劑量有效達成期望治療或預防結果之量。舉例而言，治療有效量之藥劑會消除、降低、延遲、最小化或防止疾病之不良效應。

「個體」(individual或subject)係哺乳動物。哺乳動物包含但不限於家養動物(例如牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如人類及非人類靈長類動物，例如猴子)、兔及齧齒類動物(例如小鼠及大鼠)。較佳地，個體係人類。

術語「醫藥組合物」係指如下製劑：其係呈使得其中所含活性成份之生物活性有效之形式，且不含對將投與調配物之個體具有不可接受之毒性的其他組份。

「醫藥上可接受之載劑」係指醫藥組合物中除活性成份外對個體無毒之成份。醫藥上可接受之載劑包含但不限於緩衝劑、賦形劑、穩定劑或防腐劑。

如本文中所使用，「治療(treatment)」(及其語法變體，例如「treat」或「treating」)係指欲改變所治療個體之疾病之自然過程的臨床干預，且可出於預防性目的或在臨床病理學過程期間實施。治療之期望效應包含但不限於預防疾病發生或復發、減輕症狀、減弱疾病

之任何直接或間接病理結果、預防轉移、降低疾病進展速率、改善或緩和疾病狀態及緩解或改良預後。在一些實施例中，使用本發明抗體來延遲疾病發生或減緩疾病進展。

「自體免疫疾病」係指源自且指向個體自身組織之非惡性疾病或病症。自體免疫疾病或病症之實例包含但不限於發炎性反應，例如發炎性皮膚疾病，包含牛皮癬及皮炎(例如異位性皮炎)；與發炎性腸病有關之反應(例如克羅恩氏病及潰瘍性結腸炎)；皮炎；過敏性病狀，例如濕疹及哮喘；類風濕性關節炎；全身性紅斑狼瘡(SLE) (包含但不限於狼瘡性腎炎、皮膚狼瘡)；糖尿病(例如1型糖尿病或胰島素依賴性糖尿病)；多發性硬化及幼年發作型糖尿病。

本發明之融合蛋白質

本發明提供新穎免疫球蛋白-IL-2融合蛋白，其具有用於如本文所闡述之治療方法之尤其有利性質。

在第一態樣中，本發明提供融合蛋白，其包括(i)免疫球蛋白分子及(ii)包括胺基酸突變之兩個突變體介白素-2 (IL-2)分子，該胺基酸突變使得與野生型IL-2分子相比突變體IL-2分子至中間親和力IL-2受體之親和力減小。

在一實施例中，該融合蛋白基本上由免疫球蛋白分子、包括胺基酸突變(與野生型IL-2分子相比其減小突變體IL-2分子至中間親和力IL-2受體之親和力)之兩個突變體介白素-2 (IL-2)分子及視情況一或多種肽連接體組成。

如實例中所展示，與包括單一IL-2分子之相應融合蛋白相比，包括兩個IL-2分子之融合蛋白令人吃驚地大大改良調節性T細胞活化之效能及選擇性。另外，僅包括至中間親和力IL-2受體之減小結合之兩個(而非僅一個)突變體IL-2分子之融合蛋白保留對調節性T細胞的顯著刺激活性。

在一實施例中，該免疫球蛋白分子係IgG類免疫球蛋白分子、尤其IgG₁子類免疫球蛋白分子。在一實施例中，該免疫球蛋白分子係人類免疫球蛋白分子，亦即其包括完全人類可變及恆定區。實例性人類IgG₁恆定區之序列展示於SEQ ID NO: 8中。IgG類免疫球蛋白分子包括(i)兩條免疫球蛋白輕鏈，其各自自N末端至C末端包括輕鏈可變結構域(VL)及輕鏈恆定結構域(CL)，及(ii)兩條免疫球蛋白重鏈，其各自自N末端至C末端包括重鏈可變結構域(VH)、重鏈恆定結構域(CH)₁、免疫球蛋白鉸鏈區、CH₂結構域及CH₃結構域。後兩個結構域形成免疫球蛋白分子之Fc區之一部分。兩個重鏈在Fc區中發生二聚化。

在本發明之融合蛋白之一實施例中，該兩個突變體IL-2分子各自在其N末端胺基酸處視情況經由肽連接體融合至該免疫球蛋白分子之一條免疫球蛋白重鏈之C末端胺基酸。兩個(相同) IL-2分子至免疫球蛋白重鏈之融合使得簡單產生融合蛋白，從而避免形成不期望副產物且消除對於促進不相同重鏈之異源二聚化之修飾(例如凸起與孔洞修飾)之需要。

在本發明之融合蛋白之某些實施例中，該兩個突變體IL-2分子經由肽連接體融合至該免疫球蛋白分子。在一實施例中，該兩個突變體IL-2分子各自經由肽連接體融合至該免疫球蛋白分子。在一實施例中，該兩個突變體IL-2分子在其N末端胺基酸處各自經由肽連接體融合至該免疫球蛋白分子之一條免疫球蛋白重鏈之C末端胺基酸。在一實施例中，每一該等突變體IL-2分子經由具有相同胺基酸序列之肽連接體融合至該免疫球蛋白分子。在一實施例中，該肽連接體包括至少10個胺基酸。在特定實施例中，該肽連接體包括至少15個胺基酸。不期望受限於理論，此長度之肽連接體可提供突變體IL-2分子最佳地結合至IL-2受體、尤其高親和力(異源三聚體) IL-2受體之靈活性。在具體實施例中，該肽連接體包括15個胺基酸。在甚至更具體實施例中，

該肽連接體包括胺基酸序列(G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66)。在一實施例中，該肽連接體係15個胺基酸之長度。在一實施例中，該肽連接體具有胺基酸序列(G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66)。在一實施例中，該肽連接體由15個胺基酸組成。在一實施例中，該肽連接體由胺基酸序列(G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66)組成。

與游離(未融合) IL-2相比，使IL-2分子融合至免疫球蛋白分子會提供有益藥物動力學性質，包含長血清半衰期(因經由結合至FcRn進行再循環，且分子大小遠大於腎過濾臨限值)。另外，存在免疫球蛋白分子亦使得能夠藉由(例如)蛋白質A親和層析簡單純化融合蛋白。有趣的是，如實例中所展示，包括兩個突變體IL-2分子(具有至中間親和力IL-2受體之減小結合)之融合蛋白之血清半衰期長於包括兩個野生型IL-2分子之相應融合蛋白。融合至免疫球蛋白分子(亦即天然類型之分子)亦可經由形成抗藥物抗體來最小化融合蛋白之毒性。

儘管存在免疫球蛋白分子、具體而言免疫球蛋白分子之Fc區有益於融合蛋白之藥物動力學性質，但可同時引起融合蛋白至表現Fc受體之細胞而非含有IL-2受體較佳之細胞之不期望靶向。另外，Fc受體結合可使得釋放(促發炎性)細胞激素且不期望地活化除調節性T細胞外之各種免疫細胞。因此，在某些實施例中，本發明之融合蛋白中所包括之該免疫球蛋白分子包括修飾，與無該修飾之相應免疫球蛋白分子相比，該修飾使免疫球蛋白分子至Fc受體之結合親和力減小。在具體實施例中，該Fc受體係Fc γ 受體、尤其人類Fc γ 受體。可容易地(例如)藉由ELISA或藉由表面電漿共振(SPR)使用標準設備(例如BIAcore儀器(GE Healthcare))來測定與Fc受體之結合親和力，且Fc受體(例如)可藉由重組表現獲得。用於量測結合親和力之具體闡釋性及實例性實施例闡述於下文中。根據一實施例，藉由表面電漿共振使用BIAcore® T100機器(GE Healthcare)在25°C下使用固定於CM5晶片上

之配體(Fc受體)來量測至Fc受體之結合親和力。簡言之，根據供應商說明書，使用N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)來活化羧甲基化之右旋糖酐生物感測器晶片(CM5, GE Healthcare)。使用10 mM乙酸鈉(pH 5.5)將重組配體稀釋至0.5-30 $\mu\text{g/ml}$ ，然後以10 $\mu\text{l/min}$ 之流速注射以達成大約100-5000個反應單位(RU)之偶聯蛋白。注射配體後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基團。對於動力學量測而言，在25°C下以大約30-50 $\mu\text{l/min}$ 之流速在HBS-EP+(GE Healthcare, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05%表面活性劑P20, pH 7.4)中注射抗體之三倍至五倍連續稀釋液(介於約0.01 nM至300 nM之間)。使用簡單一對一Langmuir結合模型(BIACORE® T100, 評估軟體, 版本1.1.1)藉由同時擬合締合及解離感測圖譜來計算締合速率($k_{\text{締合}}$)及解離速率($k_{\text{解離}}$)。以比率 $k_{\text{解離}}/k_{\text{締合}}$ 之形式來計算平衡解離常數(K_D)。例如參見Chen等人, J. Mol Biol 293, 865-881 (1999)。另一選擇為，可使用已知表現特定Fc受體之細胞系(例如表現Fc γ IIIa受體之NK細胞)來評估抗體至Fc受體之結合親和力。

在一實施例中，修飾包括一或多個使得免疫球蛋白至Fc受體之結合親和力減小之胺基酸突變。在一實施例中，胺基酸突變係胺基酸取代。通常，相同之一或多個胺基酸突變存在於兩個免疫球蛋白重鏈中之每一者中。在一實施例中，該胺基酸突變將免疫球蛋白至Fc受體之結合親和力減小至先前之至少1/2、至少1/5或至少1/10。在存在一個以上使得免疫球蛋白至Fc受體之結合親和力減小之胺基酸突變之實施例中，該等胺基酸突變之組合可將免疫球蛋白至Fc受體之結合親和力減小至先前之至少1/10、至少1/20或甚至至少1/50。在一實施例中，與無該修飾之相應免疫球蛋白分子相比，該免疫球蛋白分子展現小於20%、尤其小於10%、更尤其小於5%之至Fc受體之結合親和力。

在一實施例中，該Fc受體係活化Fc受體。在具體實施例中，該Fc受體係選自FcγRIIIa (CD16a)、FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32)及FcαRI (CD89)之群。在具體實施例中，Fc受體係Fcγ受體、更具體而言FcγRIIIa、FcγRI或FcγRIIa受體。較佳地，至該等受體中之每一者之結合親和力有所減小。在甚至更具體實施例中，該Fc受體係FcγRIIIa、尤其人類FcγRIIIa。在一些實施例中，至補體組份之結合親和力、至C1q之特異性結合親和力亦有所減小。在一實施例中，至新生Fc受體(FcRn)之結合親和力並不減小。在免疫球蛋白分子展現大於約70%之未修飾形式之免疫球蛋白分子至FcRn之結合親和力時，達成至FcRn之實質上類似結合，亦即保留免疫球蛋白分子至該受體之結合親和力。本發明之融合蛋白中所包括之免疫球蛋白分子可展現大於約80%及甚至大於約90%之該親和力。

在一實施例中，減小免疫球蛋白分子至Fc受體之結合親和力之該修飾位於免疫球蛋白分子之Fc區、尤其CH2區中。在一實施例中，該免疫球蛋白分子在免疫球蛋白重鏈之329位(EU編號)處包括胺基酸取代。在更具體實施例中，該胺基酸取代係P329A或P329G、尤其P329G。在一實施例中，該免疫球蛋白分子在免疫球蛋白重鏈之234及235位(EU編號)處包括胺基酸取代。在具體實施例中，該等胺基酸取代係L234A及L235A (LALA)。在一實施例中，該免疫球蛋白分子在抗體重鏈之329位(EU編號)處包括胺基酸取代且在選自免疫球蛋白重鏈之228、233、234、235、297及331位(EU編號)處之位置處包括另一胺基酸取代。在更具體實施例中，另一胺基酸取代係S228P、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S。在特定實施例中，該免疫球蛋白分子在免疫球蛋白重鏈之P329、L234及L235位(EU編號)處包括胺基酸取代。在更特定實施例中，該免疫球蛋白分子在免疫球蛋白重鏈中包括胺基酸取代L234A、L235A及P329G

(LALA P329G ; EU編號)。胺基酸取代之此組合尤其有效廢除人類IgG類免疫球蛋白之Fc γ 受體結合，如PCT公開案第WO 2012/130831號中所闡述，其全部內容以引入方式併入本文中。PCT公開案第WO 2012/130831號亦闡述製備該經修飾免疫球蛋白之方法及測定其性質(例如Fc受體結合或效應物功能)之方法。

包括免疫球蛋白重鏈修飾之免疫球蛋白可藉由胺基酸缺失、取代、插入或修飾使用業內熟知之基因或化學方法製得。基因方法可包含編碼DNA序列之位點特異性誘變、PCR、基因合成及諸如此類。可(例如)藉由測序來驗證正確之核苷酸變化。

與相應未修飾免疫球蛋白或抗體相比，包括減小Fc受體結合之修飾之免疫球蛋白或抗體通常具有減小之效應物功能、尤其減小之ADCC。因此，在一實施例中，減小免疫球蛋白分子至Fc受體之結合親和力之該修飾減小免疫球蛋白分子之效應物功能。在具體實施例中，該效應物功能係抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)。在一實施例中，ADCC減小至由無該修飾之相應免疫球蛋白分子誘導之ADCC之小於20%。可藉由業內已知之方法量測免疫球蛋白或抗體之效應物功能。用以評價所關注分子之ADCC活性之活體外分析之實例闡述於以下文獻中：美國專利第5,500,362號；Hellstrom等人，Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)及Hellstrom等人，Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)；美國專利第5,821,337號；Bruggemann等人，J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)。另一選擇為，可使用非放射性分析方法(例如參見用於流式細胞術之ACTI™非放射性細胞毒性分析(CellTechnology公司，Mountain View, CA)及CytoTox 96®非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI))。可用於該等分析之效應細胞包含周邊血單核細胞(PBMC)及天然殺傷(NK)細胞。另一選擇為或另外，可在體內評價所關注分子之ADCC活性，例如在動物

模型中評價，例如Clynes等人，Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)中所揭示之動物模型。在一些實施例中，免疫球蛋白分子至補體組份、具體而言至C1q之結合亦有所減小。因此，補體依賴性細胞毒性(CDC)亦可有所減小。可實施C1q結合分析以測定免疫球蛋白是否能夠結合C1q且由此具有CDC活性。例如參見WO 2006/029879及WO 2005/100402中之C1q及C3c結合ELISA。為評價補體活化，可實施CDC分析(例如參見Gazzano-Santoro等人，J Immunol Methods 202, 163 (1996)；Cragg等人，Blood 101, 1045-1052 (2003)；及Cragg及Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004))。

除上文及PCT公開案第WO 2012/130831號中所闡述之免疫球蛋白分子外，具有減小之Fc受體結合及/或效應物功能之免疫球蛋白亦包含彼等取代Fc區殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多者者(美國專利第6,737,056號)。該等Fc突變體包含在胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或更多者處具有取代之Fc突變體，包含在殘基265及297處經丙胺酸取代之所謂的「DANA」Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。

與IgG₁免疫球蛋白相比，IgG₄子類免疫球蛋白展現減小之Fc受體結合親和力及減小之效應物功能。因此，在一些實施例中，本發明之融合蛋白中所包括之該免疫球蛋白分子係IgG₄子類免疫球蛋白、尤其人類IgG₄子類免疫球蛋白。在一實施例中，該IgG₄子類免疫球蛋白在Fc區中之S228位(EU編號)處包括胺基酸取代、具體而言胺基酸取代S228P。為進一步減小Fc受體結合親和力及/或效應物功能，在一實施例中，該IgG₄子類免疫球蛋白在L235位處包括胺基酸取代、具體而言胺基酸取代L235E (EU編號)。在另一實施例中，該IgG₄子類免疫球蛋白在P329位處包括胺基酸取代、具體而言胺基酸取代P329G (EU編號)。在特定實施例中，該IgG₄子類免疫球蛋白在位置S228、L235及

P329處包括胺基酸取代、具體而言胺基酸取代S228P、L235E及P329G (EU編號)。該等經修飾IgG₄子類免疫球蛋白及其Fc γ 受體結合性質闡述於PCT公開案第WO 2012/130831號中，其全部內容以引入方式併入本文中。

在一實施例中，該免疫球蛋白分子能夠特異性結合至抗原。在一實施例中，該免疫球蛋白分子係單株抗體。在一實施例中，該免疫球蛋白分子不能特異性結合至抗原，尤其不能特異性結合至人類抗原。可(例如)藉由如本文所闡述之ELISA或表面電漿共振來測定此一免疫球蛋白分子至抗原之特異性結合之不存在(亦即可區別於非特異性相互作用之任一結合之不存在)。此一免疫球蛋白分子尤其可用於(例如)增強融合蛋白之血清半衰期，其中不期望靶向特定組織。

在一實施例中，該免疫球蛋白分子包括基於人類Vh3-23種系序列之重鏈可變區序列。在具體實施例中，該免疫球蛋白分子包括與SEQ ID NO: 9之序列至少95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之重鏈可變區序列。在一實施例中，該免疫球蛋白分子包括基於人類Vk3-20種系序列之輕鏈可變區序列。在具體實施例中，該免疫球蛋白分子包括與SEQ ID NO: 11之序列至少95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之輕鏈可變區序列。在甚至更具體實施例中，該免疫球蛋白分子包括SEQ ID NO: 9之重鏈可變區序列及SEQ ID NO: 11之輕鏈可變區序列。包括該等可變區序列之免疫球蛋白分子不能特異性結合至抗原、尤其人類抗原。其缺乏至正常組織以及PBMC之結合，並無多反應性且在活體內藉由成像並不展示非特異性累積(數據未展示)。可變區序列完全係基於人類種系序列，重鏈CDR 3除外，其中引入GSG序列以生成非結合性免疫球蛋白。

在一實施例中，該等突變體IL-2分子在對應於人類IL-2 (SEQ ID NO: 1)之殘基88之位置處包括胺基酸突變。在一實施例中，該胺基酸

突變係胺基酸取代。在更具體實施例中，該胺基酸取代係選自N88D、N88R、N88I及N88G之群。在特定實施例中，該胺基酸取代係N88D。在一實施例中，該等突變體IL-2分子係人類IL-2分子。在具體實施例中，該等突變體IL-2分子包括SEQ ID NO: 60之序列(IL-2 N88D)。在一實施例中，該等突變體IL-2分子包括僅一種與野生型IL-2分子相比減小突變體IL-2分子至中間親和力IL-2受體之親和力之胺基酸突變。在一實施例中，該等突變體IL-2分子並不包括與野生型IL-2分子相比改變突變體IL-2分子至高親和力IL-2受體之親和力之胺基酸突變。在一實施例中，該等突變體IL-2分子僅包括與野生型IL-2分子相比改變突變體IL-2分子至IL-2受體之親和力之單一胺基酸突變。

在一實施例中，該等突變體IL-2分子在對應於人類IL-2之殘基125之位置處進一步包括胺基酸取代。在一實施例中，該胺基酸取代係C125A。在具體實施例中，該等突變體IL-2分子包括SEQ ID NO: 62之序列(具有胺基酸取代C125A之IL-2 N88D)。另一選擇為，125位處之半胱胺酸可經另一中性胺基酸(例如絲胺酸、蘇胺酸或纈胺酸)代替，從而分別得到C125S IL-2、C125T IL-2或C125V IL-2，如美國專利第4,518,584號中所闡述。如其中所闡述，亦可缺失IL-2之N末端丙胺酸殘基以得到諸如des-A1 C125S或des-A1 C125A等突變體。另一選擇為或連同一起，IL-2分子可包含如下突變：通常存在於野生型人類IL-2之104位處之甲硫胺酸由諸如丙胺酸等中性胺基酸代替(參見美國專利第5,206,344號)。人類IL-2中之該等修飾可提供諸如增加之表現或穩定性等其他優點。

本發明之融合蛋白中所包括之突變體IL-2分子亦可為未糖基化IL-2分子。舉例而言，在融合蛋白表現於諸如CHO或HEK細胞等哺乳動物細胞中時，消除IL-2分子之O-糖基化位點會產生更均質產物。因此，在某些實施例中，突變體IL-2分子進一步包括修飾，該修飾消除

IL-2在對應於人類IL-2之殘基3之位置處之O-糖基化位點。在一實施例中，該修飾(其消除IL-2在對應於人類IL-2之殘基3之位置處之O-糖基化位點)係胺基酸取代。實例性胺基酸取代包含T3A、T3G、T3Q、T3E、T3N、T3D、T3R、T3K及T3P。在具體實施例中，該修飾係胺基酸取代T3A。在具體實施例中，該等突變體IL-2分子包括SEQ ID NO: 64之序列(IL-2 T3A N88D)。

在特定實施例中，突變體IL-2分子包括胺基酸取代T3A、N88D及C125A。在具體實施例中，該等突變體IL-2分子包括SEQ ID NO: 58之序列(IL-2 T3A N88D C125A)。

在一實施例中，與包括兩個野生型IL-2分子之相應融合蛋白至IL-2 $\beta\gamma$ 受體之結合相比，本發明之融合蛋白至IL-2 $\beta\gamma$ 受體之結合減小至至少1/1.5、較佳地至少1/2或至少1/3。在一實施例中，在25°C下藉由SPR量測時，本發明之融合蛋白以至少2倍於包括兩個野生型IL-2分子之相應融合蛋白之親和力常數(K_D)的 K_D 結合至IL-2 $\beta\gamma$ 受體。在具體實施例中，該IL-2 $\beta\gamma$ 受體係人類IL-2 $\beta\gamma$ 受體。在一實施例中，本發明之融合蛋白至IL-2 α 受體之結合約等於包括兩個野生型IL-2分子之相應融合蛋白至IL-2 α 受體之結合。在一實施例中，在25°C下藉由SPR量測時，本發明之融合蛋白以約等於包括兩個野生型IL-2分子之相應融合蛋白之親和力常數(K_D)的 K_D 結合至IL-2 α 受體。在具體實施例中，該IL-2 α 受體係人類IL-2 α 受體。藉由SPR量測IL-2 $\beta\gamma$ 或IL-2 α 受體結合親和力之方法闡述於本文中。根據一實施例，藉由表面電漿共振使用BIAcore® T200機器(GE Healthcare)在25°C下使用固定於CM5或鏈黴抗生物素晶片上之IL-2受體來量測結合親和力(K_D)。以比率 $k_{\text{解離}}/k_{\text{結合}}$ 形式來計算親和力常數(K_D)。例如參見Chen等人，J. Mol Biol 293, 865-881 (1999)。

在特定態樣中，本發明提供包括以下部分之融合蛋白：(i) IgG₁

子類免疫球蛋白分子，其在免疫球蛋白重鏈中包括胺基酸取代L234A、L235A及P329G (EU編號)，及(ii)兩個包括胺基酸取代N88D之突變體介白素-2 (IL-2)分子，在其N末端胺基酸處各自經由肽連接體融合至一條免疫球蛋白重鏈之C末端胺基酸。在一實施例中，該免疫球蛋白分子及該等IL-2分子係人類分子。在具體實施例中，該免疫球蛋白分子包括SEQ ID NO: 9之重鏈可變區序列及SEQ ID NO: 11之輕鏈可變區序列。在另一具體實施例中，該等IL-2分子各自包括SEQ ID NO: 58之胺基酸序列。在另一實施例中，該肽連接體包括胺基酸序列(G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66)。在甚至更具體實施例中，該融合蛋白包括與SEQ ID NO: 50之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之多肽序列；及與SEQ ID NO: 19之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之多肽序列。

如實例中所展示，本發明之融合蛋白選擇性活化調節性T細胞(亦即基本上並不同時活化其他T細胞子組及/或天然殺傷(NK)細胞)。因此，在一態樣中，本發明提供包括免疫球蛋白分子及兩個突變體IL-2分子之融合蛋白，其中該融合蛋白較效應T細胞及NK細胞、尤其較習用CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞及NK細胞選擇性活化調節性T細胞。在一實施例中，該融合蛋白以至少10倍、至少100倍或至少1000倍於效應T細胞及NK細胞來活化調節性T細胞。在一實施例中，該融合蛋白較習用CD4⁺記憶性T細胞選擇性活化調節性T細胞。在一實施例中，該融合蛋白以至少10倍、至少100倍或至少1000倍於習用CD4⁺記憶性T細胞來活化調節性T細胞。在一實施例中，藉由量測細胞內STAT、尤其STAT5磷酸化程度來測定該活化。在一實施例中，藉由流式細胞術分析來進行細胞內STAT磷酸化程度之該量測。在一實施例中，該融合蛋白誘導調節性T細胞IL-2中之受體信號傳導之EC₅₀值為誘導效

應T細胞及NK細胞中之IL-2受體信號傳導之 EC_{50} 值的至少1/10、至少1/100或至少1/1000。在一實施例中，IL-2受體信號傳導之該誘導係誘導STAT磷酸化。在一實施例中，該融合蛋白誘導調節性T細胞中之IL-2受體信號傳導之 EC_{50} 值為其誘導習用 $CD4^+$ 記憶性T細胞中之IL-2受體信號傳導之 EC_{50} 值的至少1/10、至少1/100或至少1/1000。在一實施例中，IL-2受體信號傳導之該誘導係誘導STAT磷酸化。

在另一態樣中，本發明尤其提供用於在活體外或在活體內選擇性活化調節性T細胞之融合蛋白。在一實施例中，該用途包括使調節性T細胞與該融合蛋白在活體外或在活體內接觸。在一實施例中，該用途進一步包括使其他(非調節性) T細胞與該融合蛋白接觸。在一實施例中，該用途係活體外用途且以約10 ng/mL或更小、尤其約1 ng/mL或更小之濃度使用該融合蛋白。在另一實施例中，該用途係活體內用途且以約100 μ g/kg體重或更小、尤其約25 μ g/kg體重或更小、更尤其約10 μ g/kg體重或更小之劑量使用該融合蛋白(其中「體重」係指投與融合蛋白之個體之體重)。

本發明亦提供在活體外或在活體內選擇性活化調節性T細胞之方法，其包括使該等調節性T細胞與本發明之融合蛋白接觸。在一實施例中，該方法進一步包括使其他(非調節性) T細胞與該融合蛋白接觸。在一實施例中，該活化包括誘導增殖及/或誘導IL-2受體信號傳導。在一實施例中，該方法係活體外方法且以約10 ng/mL或更小、尤其約1 ng/mL或更小之濃度使用該融合蛋白。在另一實施例中，該方法係活體內方法且以約100 μ g/kg體重或更小、尤其約25 μ g/kg體重或更小、更尤其約10 μ g/kg體重或更小之劑量使用該融合蛋白(其中「體重」係指投與融合蛋白之個體之體重)。

根據前述段落中所闡述之融合蛋白、用途或方法之某些實施例，該活化包括誘導調節性T細胞增殖及/或誘導調節性T細胞中之IL-

2受體信號傳導。可(例如)藉由檢測細胞內增殖標記物Ki-67來量測增殖誘導，如實例中所闡述。在一實施例中，與非活化調節性T細胞之增殖相比，藉由本發明之融合蛋白活化之調節性T細胞之增殖增加至少約1.5倍、至少約2倍或至少約3倍。在一實施例中，與未與本發明之融合蛋白接觸之其他(非調節性) T細胞及/或NK細胞之增殖相比，與該融合蛋白接觸之相應細胞之增殖增加小於約1.5倍、小於約1.2倍或小於約1.1倍。可(例如)藉由檢測磷酸化STAT5來量測IL-2受體信號傳導之誘導，如實例中所闡述。在一實施例中，與非活化調節性T細胞中之IL-2受體信號傳導相比，藉由本發明之融合蛋白活化之調節性T細胞中之IL-2受體信號傳導增加至少約1.5倍、至少約2倍、至少約3倍或至少約5倍。在一實施例中，與未與本發明之融合蛋白接觸之其他(非調節性) T細胞及/或NK細胞之IL-2受體信號傳導相比，與該融合蛋白接觸之相應細胞之IL-2受體信號傳導增加小於約1.5倍數或小於約1.2倍或小於約1.1倍。

多核苷酸

本發明另外提供編碼如本文所闡述之融合體之多核苷酸或其片段。

本發明多核苷酸包含彼等與SEQ ID NO 10、12、20、51、59、61、63及65中所陳述之序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致者(包含其功能片段或變體)。

本發明之編碼融合蛋白之多核苷酸可表示為編碼整個融合蛋白之單一多核苷酸或表示為多個(例如兩個或更多個)共表現之多核苷酸。藉由共表現之多核苷酸編碼之多肽可經由(例如)二硫鍵或其他方式進行締合以形成功能融合蛋白。舉例而言，可藉由來自免疫球蛋白之重鏈部分之單獨多核苷酸來編碼免疫球蛋白之輕鏈部分。在共表現時，重鏈多肽與輕鏈多肽締合形成免疫球蛋白。

在一實施例中，本發明係關於編碼免疫球蛋白分子及兩個IL-2分子之融合蛋白之多核苷酸或其片段，其中該多核苷酸包括編碼如SEQ ID NO 9或11中所展示之可變區序列之序列。在另一實施例中，本發明係關於編碼免疫球蛋白分子及兩個IL-2分子之融合蛋白之多核苷酸或其片段，其中該多核苷酸包括編碼如SEQ ID NO 19或50中所展示之多肽序列之序列。在另一實施例中，本發明另外係關於編碼免疫球蛋白分子及兩個IL-2分子之融合蛋白之多核苷酸或其片段，其中該多核苷酸包括與SEQ ID NO 10、12、20、51、59、61、63或65中所展示之核酸序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之序列。在另一實施例中，本發明係關於編碼免疫球蛋白分子及兩個IL-2分子之融合蛋白之多核苷酸或其片段，其中該多核苷酸包括SEQ ID NO 10、12、20、51、59、61、63或65中所展示之核酸序列。在另一實施例中，本發明係關於編碼免疫球蛋白分子及兩個IL-2分子之融合蛋白之多核苷酸或其片段，其中該多核苷酸包括編碼與SEQ ID NO 9或11之胺基酸序列至少約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之可變區序列之序列。在另一實施例中，本發明係關於編碼免疫球蛋白分子及兩個IL-2分子之融合蛋白之多核苷酸或其片段，其中該多核苷酸包括編碼與SEQ ID NO 19或50之胺基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致之多肽序列之序列。本發明涵蓋編碼免疫球蛋白分子及兩個IL-2分子之融合蛋白之多核苷酸或其片段，其中該多核苷酸包括編碼SEQ ID NO 9或11中具有保守胺基酸取代之可變區序列之序列。本發明亦涵蓋編碼免疫球蛋白分子及兩個IL-2分子之融合蛋白之多核苷酸或其片段，其中該多核苷酸包括編碼SEQ ID NO 19或50中具有保守胺基酸取代之多肽序列之序列。

在某些實施例中，多核苷酸或核酸係DNA。在其他實施例中，

本發明多核苷酸係(例如)呈信使RNA (mRNA)形式之RNA。本發明RNA可為單鏈或雙鏈。

重組方法

可(例如)藉由固態肽合成(例如Merrifield固相合成)或重組產生來獲得本發明之融合蛋白。對於重組產生而言，將一或多個(例如)如上文所闡述編碼融合蛋白(片段)之多核苷酸分離並插入一或多個載體中，以在宿主細胞中進一步選殖及/或表現。可易於使用習用程序分離並測序該多核苷酸。在一實施例中，提供包括本發明多核苷酸中之一或多者之載體、較佳地表現載體。為彼等熟習此項技術者熟知之方法可用於構建含有融合蛋白(片段)之編碼序列以及適當轉錄/轉譯控制信號之表現載體。該等方法包含活體外重組DNA技術、合成技術及活體內重組/遺傳重組。例如參見闡述於以下文獻中之技術：Maniatis等人，MOLECULAR選殖: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor實驗室，N.Y. (1989)；及Ausubel等人，CURRENT ROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989)。表現載體可為質粒、病毒之一部分，或可為核酸片段。表現載體包含表現序列盒，在該表現序列盒中，編碼融合蛋白(片段)之多核苷酸(亦即編碼區)經選殖與啟動子及/或其他轉錄或轉譯控制要素可操作締合。如本文中所使用，「編碼區」係由轉譯成胺基酸之密碼子組成之核酸部分。儘管「終止密碼子」(TAG、TGA或TAA)並不轉譯成胺基酸，但其可視為編碼區之一部分(若存在)，但任一毗鄰序列(例如啟動子、核糖體結合位點、轉錄終止子、內含子、5'及3'非轉譯區及諸如此類)並非編碼區之一部分。兩個或更多個編碼區可存在於單一多核苷酸構築體中(例如位於單一載體上)或單獨多核苷酸構築體中(例如位於單獨(不同)載體上)。另外，任一載體皆可含有單一編碼區，或可包括兩個或更多個編碼區，舉例而言，

本發明載體可編碼一或多種多肽，該一或多種多肽以後轉譯或共轉譯方式經由溶蛋白性裂解分離成最終蛋白質。此外，本發明之載體、多核苷酸或核酸可編碼異源性編碼區，該等異源性編碼區融合或並不融合至編碼本發明之融合蛋白(片段)或其變體或衍生物之多核苷酸。異源性編碼區包含但不限於特定要素或基序，例如分泌信號肽或異源性功能結構域。可操作締合係如下情形：以與基因產物之表現處於調節序列之影響或控制下之方式使用於基因產物之編碼區(例如多肽)與一或多個調節序列進行締合。兩個DNA片段(例如多肽編碼區及與其有關之啟動子)在以下情形下為「可操作締合」：誘導啟動子功能會引起編碼期望基因產物之mRNA之轉錄，且兩個DNA片段間之鏈接性質並不干擾表現調節序列引導基因產物表現之能力或干擾DNA模板轉錄之能力。因此，若啟動子能夠實現編碼多肽之核酸之轉錄，則啟動子區域與該核酸可操作地締合。啟動子可為僅在預定細胞中引導DNA之實質性轉錄之細胞特異性啟動子。除啟動子外，其他轉錄控制要素(例如增強子、操作子、抑制子及轉錄終止子信號)可與多核苷酸可操作地締合以引導細胞特異性轉錄。適宜啟動子及其他轉錄控制區揭示於本文中。各種轉錄控制區已為彼等熟習此項技術者所習知。該等轉錄控制區包含但不限於在脊椎動物細胞中發揮作用之轉錄控制區，例如但不限於來自巨細胞病毒(例如立即早期啟動子，與內含子-A連結)、猿猴病毒40(例如早期啟動子)及反轉錄病毒(例如Rous肉瘤病毒)之啟動子及增強子區段。其他轉錄控制區包含彼等衍生自脊椎動物基因者(例如肌動蛋白、熱激蛋白、牛生長激素及兔 α -珠蛋白)以及能夠控制真核細胞中之基因表現之其他序列。其他適宜轉錄控制區包含組織特異性啟動子及增強子以及誘導型啟動子(例如誘導型啟動子四環素)。類似地，各種轉譯控制要素已為彼等熟習此項技術者所習知。該等轉譯控制要素包含但不限於核糖體結合位點、轉譯起始及終止密

碼子及衍生自病毒系統之要素(尤其內核糖體進入位點或IRES，亦稱為CITE序列)。表現序列盒亦可包含其他特徵，例如複製起點及/或染色體整合要素(例如反轉錄病毒長末端重複(LTR)或腺相關病毒(AAV)反轉末端重複(ITR))。

本發明多核苷酸及核酸編碼區可與編碼引導由本發明多核苷酸編碼之多肽之分泌之分泌或信號肽的其他編碼區相連。舉例而言，若期望融合體之分泌，則可將編碼信號序列之DNA置於編碼本發明之融合蛋白或其片段之核酸的上游。根據信號假說，由哺乳動物細胞分泌之蛋白質具有信號肽或分泌前導序列，一旦在粗糙內質網中輸出生長蛋白鏈，則該信號肽或分泌前導序列自成熟蛋白質發生裂解。彼等熟習此項技術者應瞭解，由脊椎動物細胞分泌之多肽通常具有融合至多肽之N-末端之信號肽，該信號肽自轉譯之多肽發生裂解而產生分泌或「成熟」形式之多肽。在某些實施例中，使用原始信號肽(例如免疫球蛋白重鏈或輕鏈信號肽)，或使用依然能夠引導可操作地與該序列締合之多肽之分泌之該序列的功能衍生物。另一選擇為，可使用異源性哺乳動物信號肽或其功能衍生物。舉例而言，野生型前導序列可經人類組織纖維蛋白溶酶原激活劑(TPA)或小鼠 β -葡萄糖苷酸酶之前導序列取代。實例性分泌信號肽之胺基酸及核苷酸序列展示於SEQ ID NO 39-47中。

在編碼多核苷酸之融合蛋白(片段)之內部或末端處可包含編碼短蛋白質序列之DNA，該短蛋白質序列可用於促進後續純化(例如組胺酸標籤)或有助於標記融合蛋白。

在另一實施例中，提供包括一或多個本發明多核苷酸之宿主細胞。在某些實施例中，提供包括一或多個本發明載體之宿主細胞。多核苷酸及載體可單獨或組合納入本文所闡述分別與多核苷酸及載體有關之特徵中之任一者。在一該實施例中，宿主細胞包括(例如已轉化

或轉染)含有多核苷酸之載體，該多核苷酸編碼本發明之融合蛋白(之一部分)。如本文中所使用，術語「宿主細胞」係指可經改造而生成本發明之融合蛋白或其片段之任一類細胞系統。適於複製融合蛋白並支持其表現之宿主細胞已為業內所熟知。該等細胞可視需要經特定表現載體轉染或轉導，且可生長大量含有載體之細胞用於接種大規模發酵罐以獲得足量用於臨床應用之融合蛋白。適宜宿主細胞包含原核微生物(例如大腸桿菌(*E. coli*))或各種真核細胞(例如中國倉鼠卵巢細胞(CHO)、昆蟲細胞或諸如此類)。舉例而言，多肽可在細菌中產生，尤其在不需糖基化時。在表現之後，可以可溶性部分形式自細菌細胞漿液分離多肽且可進一步純化。除原核生物外，真核微生物(例如絲狀真菌或酵母)係用於編碼多肽之載體之適宜選殖或表現宿主，包含糖基化路徑已進行「人類化」以產生具有部分地或完全人類糖基化模式之多肽之真菌及酵母菌株。參見Gerngross, *Nat Biotech* 22, 1409-1414 (2004)及Li等人, *Nat Biotech* 24, 210-215 (2006)。用於表現(糖基化)多肽之適宜宿主細胞亦衍生自多細胞有機體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包含植物及昆蟲細胞。已確定多種桿狀病毒株可與昆蟲細胞聯合使用，尤其用於轉染草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)細胞。亦可利用植物細胞培養物作為宿主。例如參見美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號(闡述用於在轉基因植物中產生抗體之PLANTIBODIES™技術)。亦可使用脊椎動物細胞作為宿主。舉例而言，可使用適於懸浮液生長之哺乳動物細胞系。有用哺乳動物宿主細胞系之其他實例係經SV40 (COS-7)轉化之猴腎CV1細胞系、人類胚腎細胞系(293或293T細胞，如(例如) Graham等人, *J Gen Virol* 36, 59 (1977)中所闡述)、幼倉鼠腎細胞(BHK)、小鼠支持細胞(TM4細胞，如(例如)Mather, *Biol Reprod* 23, 243-251 (1980)中所闡述)、猴腎細胞

(CV1)、非洲綠猴腎細胞(VERO-76)、人類子宮頸上皮癌細胞(HELA)、犬腎細胞(MDCK)、布法羅大鼠(buffalo rat)肝細胞(BRL 3A)、人類肺細胞(W138)、人類肝細胞(Hep G2)、小鼠乳房腫瘤細胞(MMT 060562)、TRI細胞(如(例如)Mather等人, *Annals N.Y. Acad Sci* 383, 44-68 (1982)中所闡述)、MRC 5細胞及FS4細胞。其他有用哺乳動物宿主細胞系包含中國倉鼠卵巢(CHO)細胞, 包含dhfr⁻ CHO細胞(Urlaub等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 4216 (1980)); 及骨髓瘤細胞系, 例如YO、NS0、P3X63及Sp2/0。關於適於蛋白質產生之某些哺乳動物宿主細胞系之綜述, 例如參見Yazaki及Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷(B.K.C. Lo編輯, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268頁(2003)。宿主細胞包含培養細胞(僅舉幾個為例, 例如哺乳動物培養細胞、酵母細胞、昆蟲細胞、細菌細胞及植物細胞), 但亦包含包括於轉基因動物、轉基因植物或培養植物或動物組織內之細胞。在一實施例中, 宿主細胞係真核細胞、較佳地哺乳動物細胞, 例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、人類胚胎腎(HEK)細胞或淋巴細胞(例如, YO、NS0、Sp20細胞)。

業內已知在該等系統中表現外源基因之標準技術。表現包括免疫球蛋白之重鏈或輕鏈之多肽之細胞可經改造以亦表現其他抗體鏈, 從而表現之產物係具有重鏈及輕鏈之免疫球蛋白。

在一實施例中, 提供產生本發明之融合蛋白之方法, 其中該方法包括在適於表現融合蛋白之條件下培養包括編碼如本文所提供融合蛋白之多核苷酸的宿主細胞, 及自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收融合蛋白。

在本發明之融合蛋白中, 組份(免疫球蛋白分子及IL-2分子)以基因方式彼此融合。可設計融合蛋白, 從而其組份直接彼此融合或間接經由連接體序列融合。鏈接之組成長度可根據業內熟知之方法確定且

可測試其效能。亦可包含其他序列以納入裂解位點來視需要分離融合蛋白之個別組份，例如內肽酶識別序列。

在某些實施例中，本發明之融合蛋白至少包括能夠結合至抗原之免疫球蛋白可變區。可變區可形成天然或非天然抗體及其片段之一部分並衍生自該等天然或非天然抗體及其片段。產生多株抗體及單株抗體之方法已為業內所熟知(例如參見Harlow及Lane，「Antibodies, a laboratory manual」，Cold Spring Harbor實驗室，1988)。非天然抗體可使用固相肽合成來構築，可以重組方式產生(例如，如美國專利第4,186,567號中所闡述)或可(例如)藉由篩選包括可變重鏈及可變輕鏈之組合文庫獲得(例如參見頒予McCafferty之美國專利第5,969,108號)。

免疫球蛋白之任一動物物種皆可用於本發明中。可用於本發明中之非限制免疫球蛋白可為鼠類、靈長類動物或人類來源。若融合蛋白意欲用於人類應用，則可使用嵌合形式之免疫球蛋白，其中免疫球蛋白之恆定區來自人類。人類化或完全人類形式之免疫球蛋白亦可根據業內熟知之方法來製備(例如參見頒予Winter之美國專利第5,565,332號)。可藉由各種方法來達成人類化，包含但不限於(a)將非人類(例如供體抗體) CDR接枝於保留或不保留關鍵性框架殘基之人類(例如接受者抗體)框架及恆定區(例如彼等對於保留良好抗原結合親和力或抗體功能較為重要者)，(b)僅將非人類特異性決定區(SDR或a-CDR；對於抗體-抗原相互作用較為關鍵之殘基)接枝於人類框架及恆定區上，或(c)移植整個非人類可變結構域，但使用人類樣部分藉由代替表面殘基將其「覆蓋」。人類化抗體及其製備方法參見(例如)Almagro及Fransson，Front Biosci 13, 1619-1633 (2008)中，且進一步闡述於(例如)以下文獻中：Riechmann等人，Nature 332, 323-329 (1988)；Queen等人，Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033

(1989)；美國專利第5,821,337號、第7,527,791號、第6,982,321號及第7,087,409號；Jones等人，*Nature* 321, 522-525 (1986)；Morrison等人，*Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984)；Morrison及Oi，*Adv Immunol* 44, 65-92 (1988)；Verhoeyen等人，*Science* 239, 1534-1536 (1988)；Padlan，*Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994)；Kashmiri等人，*Methods* 36, 25-34 (2005)(闡述SDR (a-CDR)接枝)；Padlan，*Mol Immunol* 28, 489-498 (1991)(闡述「表面重修」)；Dall'Acqua等人，*Methods* 36, 43-60 (2005)(闡述「FR重排」)；及Osbourn等人，*Methods* 36, 61-68 (2005)及Klimka等人，*Br J Cancer* 83, 252-260 (2000)(闡述FR重排之「引導選擇」方式)。本發明之特定免疫球蛋白係人類免疫球蛋白。可使用業內已知之各種技術產生人類抗體及人類可變區。人類抗體概述於van Dijk及van de Winkel，*Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001)及Lonberg，*Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008)中。人類可變區可形成藉由雜交瘤方法製得之人類單株抗體之一部分並衍生自該人類單株抗體(例如參見*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*，第51-63頁(Marcel Dekker公司，New York, 1987))。亦可藉由以下方式來製備人類抗體及人類可變區：將免疫原投與已進行修飾而因應抗原激發產生具有人類可變區之完整人類抗體或完整抗體之轉基因動物(例如參見Lonberg，*Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005))。亦可藉由分離選自人類源噬菌體顯示文庫之Fv純系可變區序列來生成人類抗體及人類可變區(例如參見Hoogenboom等人，*Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O'Brien等人編輯，Human Press, Totowa, NJ, 2001)；及McCafferty等人，*Nature* 348, 552-554；Clackson等人，*Nature* 352, 624-628 (1991))。噬菌體通常展示呈單鏈Fv (scFv)片段或呈Fab片段之抗體片段。

在某些實施例中，根據(例如) PCT公開案WO 2012/020006 (參見

與親和力成熟相關之實例)或美國專利申請公開案第2004/0132066號(其全部內容以引用方式併入本文中)中所揭示之方法，改造本發明之融合蛋白中所包括之免疫球蛋白以具有增強之結合親和力。可經由酶聯免疫吸附分析(ELISA)或熟習此項技術者熟知之其他技術(例如表面電漿共振技術(Liljeblad等人，*Glyco J* 17, 323-329 (2000))及傳統結合分析(Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)))來量測本發明之融合蛋白結合特異性抗原決定簇之能力。可使用競爭分析來鑑別與參考抗體競爭結合至特定抗原之抗體。在某些實施例中，此一競爭抗體結合藉由參考抗體結合之相同表位(例如線性或構象表位)。定位抗體所結合之表位之詳細實例性方法提供於Morris (1996)「*Epitope Mapping Protocols*」，*Methods in Molecular Biology*第66卷(Humana Press, Totowa, NJ)中。在實例性競爭分析中，在包括結合抗原之第一經標記抗體及第二未經標記抗體之溶液中培育固定抗原，其中測試該第二未經標記抗體與該第一抗體競爭結合該抗原之能力。第二抗體可存在於雜交瘤上清液中。作為對照，在包括第一經標記抗體但不包括第二未經標記抗體之溶液中培育固定抗原。在允許第一抗體結合抗原之條件下培育之後，去除過量之未結合抗體，且量測與固定抗原締合之標記的量。若與固定抗原締合之標記之量相對於對照試樣在測試試樣中實質上有所減小，則此表明第二抗體與第一抗體競爭結合抗原。參見Harlow及Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor實驗室，Cold Spring Harbor, NY)。

可藉由業內已知之技術來純化如本文所闡述製得之融合蛋白，例如高效液相層析、離子交換層析、凝膠電泳、親和層析、尺寸排除層析及諸如此類。用於純化特定蛋白質之實際條件部分地取決於諸如淨電荷、疏水性、親水性等因素，且為彼等熟習此項技術者所易知。對於親和層析純化而言，可使用結合融合蛋白之抗體、配體、受體或

抗原。舉例而言，對於本發明之融合蛋白之親和層析純化而言，可使用具有蛋白質A或蛋白質G之基質。可基本上如實例中所闡述連續使用蛋白質A或G親和層析及尺寸排除層析來分離融合蛋白。可藉由各種熟知分析方法中之任一者來測定融合蛋白之純度，包含凝膠電泳、高壓液相層析及諸如此類。舉例而言，如實例中所闡述表現之融合蛋白展示為完整蛋白質並進行適當組合，如藉由還原及非還原SDS-PAGE所示(例如參見圖4)。

組合物、調配物及投與途徑

在另一態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包括本文所提供融合蛋白中之任一者以(例如)用於下述治療方法中之任一者中。在一實施例中，醫藥組合物包括本文所提供之任一融合蛋白及醫藥上可接受之載劑。在另一實施例中，醫藥組合物包括本文所提供融合蛋白中之任一者及至少一種其他治療劑，例如如下文所闡述。

另外提供以適於活體內投與之形式產生本發明之融合蛋白之方法，該方法包括：(a)獲得本發明之融合蛋白，及(b)將融合蛋白與至少一種醫藥上可接受之載劑一起調配，藉此調配用於活體內投與之融合蛋白製劑。

本發明之醫藥組合物包括治療有效量之一或多種溶解或分散於醫藥上可接受之載劑中之融合蛋白。片語「醫藥或藥理學可接受」係指如下分子實體及組合物：在視需要投與諸如人類等動物時在所用劑量及濃度下通常對接受者無毒，亦即並不產生不良、過敏或其他不適反應。彼等熟習此項技術者根據本揭示內容已知含有至少一種融合蛋白及視情況其他活性成份之醫藥組合物之製備，如藉由Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版，Mack Printing公司，1990 (以引用方式併入本文中)所例示。另外，對於動物(例如人類)投與而言，應理解，製劑應符合FDA Office of Biological Standards或其他國家中之相

應當局所需之無菌性、致熱原性、一般安全性及純度標準。較佳組合物係凍乾之調配物或水溶液。如本文中所使用，術語「醫藥上可接受之載劑」包含可為熟習此項技術者已知之任一及所有溶劑、緩衝劑、分散介質、包衣、表面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗細菌劑、抗真菌劑)、等滲劑、吸收延遲劑、鹽、防腐劑、抗氧化劑、蛋白質、藥物、藥物穩定劑、聚合物、凝膠、黏結劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、矯味劑、染料、該等類似材料及其組合(例如參見 Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版，Mack Printing公司，1990，第1289頁-1329頁，其以引用方式併入本文中)。除任何與活性成份不相容之習用載劑外，本發明涵蓋其於治療或醫藥組合物中之用途。

端視組合物欲以固體、液體抑或氣溶膠形式投與及組合物是否需要無菌來以注射形式用於該等投與途徑，組合物可包括不同類型之載劑。本發明之融合蛋白(及任一其他治療劑)可藉由如熟習此項技術者已知之任一方法或任一方法組合來投與(例如參見 Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版，Mack Printing公司，1990，其以引用方式併入本文中)。非經腸投與、特定而言靜脈內注射最常用於投與諸如本發明之融合蛋白等多肽分子。

非經腸組合物包含彼等經設計用於藉由注射投與者，例如皮下、皮內、病灶內、靜脈內、動脈內、肌內、鞘內或腹膜腔內注射。對於注射而言，可將本發明之融合蛋白調配於水溶液、較佳生理上相容之緩衝液(例如漢克氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理緩衝鹽水)中。該溶液可含有諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑等調配劑。另一選擇為，融合蛋白可呈粉末形式，以便在使用之前使用適宜媒劑(例如無菌無致熱源水)構造。藉由將所需量之本發明之融合蛋白與(視需要)下文列示之各種其他成份一起納入適當溶

劑中來製備無菌可注射溶液。無菌性可藉由(例如)使用無菌過濾膜進行過濾來容易地達成。通常，分散液係藉由將各種經滅菌活性成份納入含有基本分散介質及/或其他成份之無菌媒劑中來製備。在用於製備滅菌可注射溶液、懸浮液或乳液之滅菌粉末之情形下，較佳製備方法為真空乾燥或冷凍乾燥技術，其由先前經滅菌過濾之液體介質產生活性成份及任何其他期望成份之粉末。液體介質視需要應經適當緩衝且液體稀釋劑首先在注射之前使用足夠鹽水或葡萄糖調節為等滲。組合物在製造及儲存條件下必須穩定，且必須防止受到諸如細菌及真菌等微生物之污染作用。應瞭解，內毒素污染應保持最小在安全量，例如小於0.5 ng/mg蛋白質。適宜醫藥上可接受之載劑包含但不限於：緩衝劑，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包含抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六甲雙銨；氯苄烷銨；氯化苄銨松寧(benzethonium chloride)；苯酚；丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，例如聚乙烷基吡咯啉酮；胺基酸，例如甘胺酸、麩醯胺酸、天門冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、二糖及其他碳水化合物，包含葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，例如EDTA；糖，例如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨醇；成鹽抗衡離子，例如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子型表面活性劑，例如聚乙二醇(PEG)。水性注射懸浮液可含有增加懸浮液黏度之化合物，例如羧甲基纖維素鈉、山梨醇、右旋糖酐或諸如此類。視情況，該懸浮液亦可含有適宜穩定劑或增加該等化合物之溶解度之試劑以容許製備高濃度溶液。另外，該等活性化合物之懸浮液可製備成適宜的油性注射懸浮液。適宜之親脂性溶劑或媒劑包含脂肪油

(例如芝麻油)或合成脂肪酸酯(例如油酸乙酯或甘油三酯)或脂質體。

可藉助習用混合、溶解、乳化、囊封、包埋或凍乾過程來製造包括本發明之融合蛋白之醫藥組合物。醫藥組合物可以習用方式使用一或多種生理上可接受且有利於將蛋白質處理成可用於醫藥之製劑的載劑、稀釋劑、賦形劑或輔助劑加以調配。適宜調配物端視所選投與途徑而定。

可將融合蛋白調配成呈游離酸或鹼、中性或鹽形式之組合物。醫藥上可接受之鹽係實質上維持游離酸或鹼之生物活性之鹽。該等鹽包含酸加成鹽，例如彼等使用蛋白組合物之游離胺基形成者，或使用無機酸(例如鹽酸或磷酸)或有機酸(例如乙酸、草酸、酒石酸或苦杏仁酸)形成者。使用游離羧基形成之鹽亦可衍生自諸如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣或氫氧化鐵等無機鹼或諸如異丙胺、三甲胺、組胺酸或普魯卡因(procaine)等有機鹼。醫藥鹽往往較相應游離鹼形式更易溶於水性及其他質子溶劑中。

治療方法及組合物

本文所提供融合蛋白中之任一者皆可用於治療方法中。

為用於治療方法中，以與良好醫學實踐一致之方式來調配、投用及投與本發明之融合蛋白。在此上下文中需考慮之因素包含所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個體患者之臨床病狀、病因、藥劑之遞送位點、投與方法、投與時間安排及從業醫師所知之其他因素。

在一態樣中，提供用作醫藥之本發明之融合蛋白。在其他態樣中，提供用於治療疾病之本發明之融合蛋白。在某些實施例中，提供用於治療方法中之本發明之融合蛋白。在一實施例中，本發明提供用於治療有需要之個體之疾病之如本文所闡述之融合蛋白。在某些實施例中，本發明提供用於治療患有疾病之個體之方法中之融合蛋白，該

方法包括向個體投與治療有效量之融合蛋白。在某些實施例中，擬治療疾病係自體免疫疾病。實例性自體免疫疾病包含1型糖尿病、牛皮癬、哮喘、類風濕性關節炎、發炎性腸病、克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎、全身性紅斑狼瘡(SLE)及多發性硬化。在一實施例中，疾病係移植排斥或移植物抗宿主疾病。在特定實施例中，疾病係選自1型糖尿病、發炎性腸病、克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎、SLE及多發性硬化之群。在更特定實施例中，疾病係1型糖尿病。在另一特定實施例中，疾病係發炎性腸病。在另一特定實施例中，疾病係多發性硬化。在其他實施例中，疾病係哮喘、肺纖維化或阻塞性肺疾病。在其他實施例中，疾病係心血管疾病、尤其動脈粥樣硬化及急性冠狀動脈症候群。在其他實施例中，疾病係過敏性病狀、尤其食物過敏。在某些實施例中，該方法進一步包括向該個體投與治療有效量之至少一種其他治療劑(例如若該擬治療疾病係自體免疫疾病，則該其他治療劑為免疫抑制劑)。根據上述實施例中之任一者，「個體」係哺乳動物，較佳係人類。

在另一態樣中，本發明提供本發明之融合蛋白在製造或製備醫藥中之用途，該醫藥用於治療有需要之個體之疾病。在一實施例中，該藥劑用於治療疾病之方法中，該方法包括向患有疾病之個體投與治療有效量之醫藥。在某些實施例中，擬治療疾病係自體免疫疾病。在一實施例中，疾病係移植排斥或移植物抗宿主疾病。在特定實施例中，疾病係選自1型糖尿病、發炎性腸病、克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎、SLE及多發性硬化之群。在更特定實施例中，疾病係1型糖尿病。在另一特定實施例中，疾病係發炎性腸病。在另一特定實施例中，疾病係多發性硬化。在其他實施例中，疾病係哮喘、肺纖維化或阻塞性肺疾病。在其他實施例中，疾病係心血管疾病、尤其動脈粥樣硬化及急性冠狀動脈症候群。在其他實施例中，疾病係過敏性病狀、

尤其食物過敏。在一實施例中，該方法進一步包括向該個體投與治療有效量之至少一種其他治療劑(例如若該擬治療疾病係自體免疫疾病，則該其他治療劑為免疫阻抑劑)。根據上述實施例中之任一者，「個體」可為哺乳動物，較佳係人類。

在另一態樣中，本發明提供治療個體之疾病之方法，該方法包括向該個體投與治療有效量之本發明之融合蛋白。在一實施例中，向該個體投與以醫藥上可接受之形式包括本發明之融合蛋白之組合物。在某些實施例中，擬治療疾病係自體免疫疾病。在一實施例中，疾病係移植排斥或移植物抗宿主疾病。在特定實施例中，疾病係選自1型糖尿病、發炎性腸病、克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎、SLE及多發性硬化之群。在更特定實施例中，疾病係1型糖尿病。在另一特定實施例中，疾病係發炎性腸病。在另一特定實施例中，疾病係多發性硬化。在其他實施例中，疾病係哮喘、肺纖維化或阻塞性肺疾病。在其他實施例中，疾病係過敏性病狀、尤其食物過敏。在其他實施例中，疾病係心血管疾病、尤其動脈粥樣硬化及急性冠狀動脈症候群。在某些實施例中，該方法進一步包括向該個體投與治療有效量之至少一種其他治療劑(例如若該擬治療疾病係自體免疫疾病，則該其他治療劑為免疫阻抑劑)。根據上述實施例中之任一者，「個體」可為哺乳動物，較佳係人類。

在一些實施例中，將有效量之本發明之融合蛋白投與細胞。在其他實施例中，將治療有效量之本發明之融合蛋白投與個體以用於治療疾病。

為預防或治療疾病，本發明之融合蛋白之適當劑量(在單獨使用或與一或多種其他治療劑組合使用時)取決於以下因素：擬治療疾病之類型、投與途徑、患者之體重、融合蛋白之類型、疾病之嚴重程度及病程、投與融合蛋白係用於預防目的抑或治療目的、先前或同時之

治療干預、患者之臨床史及對於融合蛋白之反應及主治醫師之決定。在任一情形下，負責投與之執業醫師將決定組合物中活性成份之濃度及用於各個體之適當劑量。本文涵蓋各種投藥方案，包含但不限於在不同時間點單次或多次投與、濃注投與及脈衝輸注。

融合蛋白質係一次性或經一系列治療以適宜方式投與患者。端視疾病之類型及嚴重程度，不論(例如)藉由一或多次分開投與或藉由連續輸注來投與，約1 $\mu\text{g/kg}$ 至15 mg/kg (例如0.1 mg/kg 至10 mg/kg)融合蛋白可為投與患者之初始候選劑量。端視上述因素而定，一種典型日劑量可介於約1 $\mu\text{g/kg}$ 至100 mg/kg 之間或更高。在經若干天或更長時間重複投與時，端視病狀而定，治療通常持續至對疾病症狀之期望阻抑出現為止。融合蛋白之一實例性劑量範圍為約0.005 mg/kg 至約10 mg/kg 。在其他非限制性實例中，每次投與之劑量亦可包括約1 $\mu\text{g/kg}$ /體重、約5 $\mu\text{g/kg}$ /體重、約10 $\mu\text{g/kg}$ /體重、約50 $\mu\text{g/kg}$ /體重、約100 $\mu\text{g/kg}$ /體重、約200 $\mu\text{g/kg}$ /體重、約350 $\mu\text{g/kg}$ /體重、約500 $\mu\text{g/kg}$ /體重、約1 mg/kg /體重、約5 mg/kg /體重、約10 mg/kg /體重、約50 mg/kg /體重、約100 mg/kg /體重、約200 mg/kg /體重、約350 mg/kg /體重、約500 mg/kg /體重至約1000 mg/kg /體重或更高及其中衍生之任一範圍。在來自本文所列示數值之衍生範圍之非限制性實例中，基於上述數值，可投與約5 mg/kg /體重至約100 mg/kg /體重、約5 $\mu\text{g/kg}$ 體重至約500 mg/kg 體重等之範圍。因此，可向患者投與一或多個約0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、5.0 mg/kg 或10 mg/kg (或其任一組合)之劑量。該等劑量可間歇性投與，例如每週一次或每三週一次(例如以便患者接受約兩次至約20次或(例如)約6次劑量之融合蛋白)。可在開始時投與較高負荷劑量，隨後投與一或多個較低劑量。然而，可使用其他劑量方案。此療法之進展可容易地藉由習用技術及分析來監測。

通常以有效達成預期目的之量來使用本發明之融合蛋白。為用

於治療或預防病狀，本發明之融合蛋白或其醫藥組合物應以治療有效量投與或應用。治療有效量之確定為彼等熟習此項技術者所熟知，尤其可根據本文所提供之詳細揭示內容確定。

對於全身性投與而言，最初可自活體外分析(例如細胞培養物分析)來估計治療有效劑量。然後可將劑量調配用於動物模型中以達成循環濃度範圍，該循環濃度範圍包含在細胞培養物中測定之 IC_{50} 。該資訊可用於更準確地確定人類可用之劑量。

亦可自活體內數據(例如動物模型)使用業內熟知之技術來估計初始劑量。熟習此項技術者可易於基於動物數據來優化在人類中之投與。

可個別地調節劑量及間隔以提供足以維持治療效應之融合蛋白之血漿濃度。用於藉由注射投與之常用患者劑量介於約0.1 mg/kg/日至50 mg/kg/日、通常約0.5 mg/kg/日至1 mg/kg/日之間。可藉由每天投與多個劑量來達成治療有效之血漿濃度。可(例如)藉由HPLC來量測血漿濃度。

在局部投與或選擇性攝取之情形下，融合蛋白之有效局部濃度可與血漿濃度無關。熟習此項技術者能夠無需過多實驗即優化治療有效之局部劑量。

本文所闡述融合蛋白之治療有效劑量通常提供治療益處且不會引起實質性毒性。可藉由標準醫藥程序在細胞培養物或實驗動物中測定融合蛋白之毒性及治療效能。可使用細胞培養分析及動物研究來測定 LD_{50} (對50%群體致死之劑量)及 ED_{50} (對50%群體治療有效之劑量)。毒性及治療效應之間之劑量比率即為治療指數，其可表示為比率 LD_{50}/ED_{50} 。展現大治療指數之融合蛋白較佳。在一實施例中，本發明之融合蛋白展現高治療指數。自細胞培養分析及動物研究獲得之數據可用於調配用於人類之劑量範圍。該劑量較佳地在具有極低毒性

或無毒性之循環濃度(包含ED₅₀)的範圍內。該劑量端視諸如以下等各種要素可在此範圍內有所變化：所用劑型、所用投與途徑、個體之身體狀況及諸如此類。實際調配物、投與途徑及劑量可由個體醫師根據患者之病狀來選擇(例如參見Fingl等人，1975，The Pharmacological Basis of Therapeutics，第1章，第1頁，其全部內容以引用方式併入本文中)。

使用本發明之融合蛋白治療患者之主治醫師知曉因毒性、器官功能障礙及諸如此類而終止、間斷或調節投與之方式及時間。反之，若臨床反應不夠(排除毒性)，則主治醫師亦應知曉調節治療至更高程度。在所關注病症之管控中所投與劑量之數量級應隨擬治療病狀之嚴重程度、投與途徑及諸如此類而有所變化。舉例而言，病狀之嚴重程度可部分地藉由標準預測評估方法來評估。另外，該劑量且(可能)劑量頻率亦應根據個體患者之年齡、體重及反應而有所變化。

其他藥劑及治療

本發明之融合蛋白可與一或多種其他藥劑組合投與療法中。舉例而言，本發明之融合蛋白可與至少一種其他治療劑共投與。術語「治療劑」涵蓋投與用以治療需要治療之個體之症狀或疾病之任一藥劑。該其他治療劑可包括適用於所治療特定指徵之任一活性成份，較佳係彼等具有並不不利地彼此影響之互補活性者。在某些實施例中，其他治療劑係免疫阻抑劑。

該等其他藥劑適於以對欲達成目的有效之量以組合形式存在。該等其他藥劑之有效量端視所用融合蛋白之量、病症或治療之類型及上文所論述之其他因素而定。融合蛋白通常以相同劑量且以如本文所闡述之投與途徑或本文所闡述劑量之約1%至99%或以經驗/臨床上確定為適當之任一劑量及任一途徑使用。

上述該等組合療法涵蓋組合投與(其中兩種或更多種治療劑包含

於同一或分開組合物中)及分開投與(在此情形下，可在投與其他治療劑及/或佐劑之前、同時及/或之後投與本發明之融合蛋白)。

製品

在本發明另一態樣中，提供含有可用於治療、預防及/或診斷上述病症之材料的製品。該製品包括容器及位於該容器上或與該容器相連之標記或包裝插頁。適宜容器包含(例如)瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。該等容器可由諸如玻璃或塑膠等多種材料形成。容器裝有自身或與另一組合物組合時可有效治療、預防及/或診斷病狀之組合物，且可具有無菌存取通道(舉例而言，該容器可為靜脈內溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。該組合物中之至少一種活性劑係本發明之融合蛋白。標記或包裝插頁指示該組合物用於治療選定病狀。另外，該製品可包括(a)含有組合物之第一容器，其中該組合物包括本發明之融合蛋白；及(b)含有組合物之第二容器，其中該組合物包括另一治療劑。本發明此實施例中之製品可進一步包括指示組合物可用於治療特定病狀之包裝插頁。另一選擇為或另外，該製品可進一步包括第二(或第三)容器，該容器包括醫藥上可接受之緩衝液，例如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液及右旋糖溶液。其可進一步包含自商業及使用者角度來看期望之其他材料，包含其他緩衝劑、稀釋劑、濾膜、針及注射器。

實例

以下係本發明方法及組合物之實例。應理解，鑒於上文所提供之一般說明可實踐各種其他實施例。

重組DNA技術

使用標準方法來處理DNA，如Sambrook等人，Molecular cloning: A laboratory manual；Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所闡述。根據製造商說明書來使用分子生

物學試劑。關於人類免疫球蛋白輕鏈及重鏈之核苷酸序列之一般資訊在以下文獻中給出：Kabat, E.A.等人，(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，NIH公開案第91-3242號。

DNA測序

藉由雙鏈測序測定DNA序列。

基因合成

所需之期望基因區段係藉由PCR使用適當模板來生成，或藉由Geneart AG(Regensburg, Germany)自合成寡核苷酸及PCR產物藉由自動基因合成來合成。在沒有精確基因序列可用之情形下，基於來自最近同源物之序列來設計寡核苷酸引物，且藉由RT-PCR自源自適當組織之RNA來分離基因。將側接有獨特限制性內切酶裂解位點之基因區段選殖至標準選殖/測序載體中。自轉化細菌純化質粒DNA並藉由UV譜測定濃度。藉由DNA測序來證實亞選殖基因片段之DNA序列。使用適宜限制性位點來設計基因區段以容許亞選殖於各別表現載體中。所有構築體經設計具有編碼前導肽之5'-端DNA序列，該前導肽用於靶向真核細胞中進行分泌之蛋白質。SEQ ID NO 39-47給出實例性前導肽及編碼其之多核苷酸序列。

IL-2R $\beta\gamma$ 亞單位-Fc融合體及IL-2R α 亞單位Fc融合體之製備

為研究IL-2受體結合親和力，生成表現異源二聚體IL-2受體之工具。使IL-2受體之 β 亞單位融合至Fc分子，使用「凸起與孔洞」技術(Merchant等人，Nat Biotech.16, 677-681 (1998))改造該Fc分子以發生異源二聚合(Fc(孔洞)) (參見SEQ ID NO 21及22 (人類)、SEQ ID NO 27及28 (小鼠)及SEQ ID NO 33及34 (食蟹猴))。然後使IL-2受體之 γ 亞單位融合至Fc (凸起)變體(參見SEQ ID NO 23及24 (人類)、SEQ ID NO 29及30 (小鼠)及SEQ ID NO 35及36 (食蟹猴))，使該Fc (凸起)變體與Fc (孔洞)進行異源二聚合。然後使用此異源二聚體Fc-融合蛋白作

為受質來分析IL-2/IL-2受體相互作用。將IL-2R α 亞單位表示為具有AcTev裂解位點及Avi His標籤之單體鏈(SEQ ID NO 25及26 (人類)、SEQ ID NO 31及32 (小鼠)及SEQ ID NO 37及38 (食蟹猴))。使各別IL-2R亞單位在具有血清(對於IL-2R $\beta\gamma$ 亞單位構築體而言)及無血清(對於 α 亞單位構築體而言)之HEK EBNA 293細胞中瞬時表現。在蛋白質A (GE Healthcare)中、隨後使用尺寸排除層析(GE Healthcare, Superdex 200)來純化IL-2R $\beta\gamma$ 亞單位構築體。經由His標籤在NiNTA管柱(Qiagen)上、隨後使用尺寸排除層析(GE Healthcare, Superdex 75)來純化IL-2R α 亞單位。在SEQ ID NO 21-38中給出各種受體構築體之胺基酸及相應核苷酸序列。

融合蛋白之製備

藉由基因合成及/或經典分子生物學技術來生成DNA序列並亞選殖至哺乳動物表現載體中，使該等DNA序列處於MPSV啟動子之控制下並位於合成polyA位點上游，每一載體皆攜載EBV OriP序列。藉由使用磷酸鈣轉染共轉染指數生長之HEK293-EBNA細胞與哺乳動物表現載體來產生應用於下文實例中之融合蛋白。另一選擇為，藉由聚乙稀亞胺(PEI)使用各別表現載體來轉染在懸浮液中生長之HEK293細胞。另一選擇為，將穩定轉染之CHO細胞池或CHO細胞純系用於無血清培養基中之產生。隨後，自上清液純化融合蛋白。簡言之，藉由在20 mM磷酸鈉、20 mM檸檬酸鈉(pH 7.5)中平衡之使用蛋白質A (HiTrap ProtA, GE Healthcare)之一個親和步驟來純化融合蛋白。裝載上清液之後，首先使用20 mM磷酸鈉、20 mM檸檬酸鈉(pH 7.5)洗滌管柱，且隨後使用13.3 mM磷酸鈉、20 mM檸檬酸鈉、500 mM氯化鈉(pH 5.45)洗滌。使用20 mM檸檬酸鈉、100 mM氯化鈉、100 mM甘胺酸(pH 3)或10 mM檸檬酸鈉(pH 3.0)洗脫融合蛋白。使用0.5 M Na_2HPO_4 (pH 8.0)中和該等部分(1:10)，彙集，且藉由尺寸排除層析

(HiLoad 16/60 Superdex 200, GE Healthcare或HiLoad 26/60 Superdex 200, GE Healthcare)在最終調配物緩衝液：20 mM組胺酸、140 mM NaCl (pH 6.0)中純化。藉由使用根據胺基酸序列計算之莫耳消光係數量測280 nm下之光學密度(OD)來測定純化蛋白質試樣中之蛋白質濃度。亦基於胺基酸序列來測定分子量。藉由SDS-PAGE在存在及不存在還原劑(5 mM 1,4-二硫蘇糖醇)來分析融合蛋白之純度及分子量並使用考馬斯藍(Coomassie blue) (SimpleBlue™ SafeStain, Invitrogen)染色。根據製造商說明書使用NuPAGE® Pre-Cast凝膠系統(Invitrogen) (4-20% Tris-甘胺酸凝膠或3-12% Bis-Tris)。另一選擇為，藉由CE-SDS分析在存在及不存在還原劑下使用Caliper LabChip GXII系統(Caliper Lifescience)根據製造商說明書來分析分子之純度及分子量。使用Superdex 200 10/300GL分析型尺寸排除管柱(GE Healthcare)在2 mM MOPS、150 mM NaCl、0.02% NaN₃之pH 7.3運行緩衝液中於25°C下分析融合蛋白試樣之聚集物含量。另一選擇為，使用TSKgel G3000 SW XL分析型尺寸排除管柱(Tosoh)在25 mM K₂HPO₄、125 mM NaCl、200 mM L-精胺酸單鹽酸鹽、0.02% (w/v) NaN₃之pH 6.7運行緩衝液中於25°C下來分析抗體試樣之聚集物含量。

DP47GS IgG-IL-2、DP47GS IgG-(IL-2)₂、DP47GS IgG-IL-2 N88D、DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂及DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂構築體之純化及表徵之結果分別展示於圖1、2、3、4及5中。

IL-2受體親和力

藉由表面電漿共振(SPR)在Biacore T200 (GE Healthcare)上針對人類、鼠類及食蟹猴IL-2R βγ異源二聚體使用重組IL-2R βγ異源二聚體在下列條件下測定融合蛋白之親和力：配體：固定於SA晶片上之生物素化人類、鼠類及食蟹猴IL-2R β凸起γ孔洞異源二聚體(固定化程度分別為194、114及116 RU)，分析物：DP47GS IgG-IL-2 (參見SEQ ID

NO 13、15及19)、DP47GS IgG-(IL-2)₂ (參見SEQ ID NO 17及19)、DP47GS IgG-IL-2 N88D (參見SEQ ID NO 15、19及48)、DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ (參見SEQ ID NO 19及50)及DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ (參見SEQ ID NO 19及52)，溫度：25℃，緩衝劑：HBS-EP，分析物濃度：100 nM至1.2 nM (1:3稀釋)，流速：30 μl/min，締合：120 s，解離：600 s (用於2個最高濃度)及、120 s (用於較低濃度)，再生：60 s 3M MgCl₂，擬合：1:1 蘭格繆爾結合模型(Langmuir binding model)，RI≠0，Rmax=局部。基於動力學速率常數k_{締合}及k_{解離}來測定親和力。亦針對人類、鼠類及食蟹猴IL-2R α亞單位使用重組單體IL-2R α亞單位在下列條件下來測定融合蛋白之親和力：配體：經由胺偶合固定於CM5晶片上之人類、鼠類及食蟹猴IL-2R α亞單位(固定化程度分別為240、245及220 RU)，分析物：DP47GS IgG-IL-2 (參見SEQ ID NO 13、15及19)、DP47GS IgG-(IL-2)₂ (參見SEQ ID NO 17及19)、DP47GS IgG-IL-2 N88D (參見SEQ ID NO 15、19及48)、DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂ (參見SEQ ID NO 19及50)及 DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂ (參見SEQ ID NO 19及52)，溫度：25℃，緩衝液：HBS-EP，分析物濃度：300 nM至0.41 nM (1:3稀釋)，流速：30 μl/min，締合：120 s，解離：180 s，再生：10 mM甘胺酸(pH 1.5)，60 s。藉由穩態分析測定親和力。

在表1中給出基於IL-2R βγ異源二聚體動力學及IL-2R α亞單位穩態之親和力量測結果。

表1.融合蛋白至IL-2R βγ及IL-2R α之結合。

K _D ，nM	Hu IL-2R βγ	Cy IL-2R βγ	Mu IL-2R βγ	Hu IL- 2R α	Cy IL- 2R α	Mu IL- 2R α
DP47GS IgG-IL-2	0.15	0.60	0.85	51	81	112
DP47GS IgG-(IL-2) ₂	0.11	0.17	0.37	20	31	26

DP47GS IgG-IL-2 N88D	0.93	1.3	2.4	18	31	48
DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂	0.24	0.57	2.1	22	30	25
DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂	0.16	0.29	0.36	24	32	26

人類DP47GS IgG - IL-2融合體及其突變體不僅結合至3條不同人類IL-2受體鏈 α 、 β 及 γ ，且亦結合至來自食蟹猴及小鼠之各別受體鏈，但平均而言親和力往往略低於後兩個物種。該等細胞激素融合體至人類及食蟹猴 α 鏈之親和力相當，鼠類 α 鏈與人類 α 鏈相比具有約2倍親和力差異，此係針對僅攜載一個細胞激素部分之分子所觀察。對於具有兩個細胞激素部分之分子而言，此差異並不存在，此最可能係由於抗體親抗原性。DP47GS IgG-IL-2及DP47GS IgG-IL-2 N88D至 α 鏈之親和力理論上應相等，此乃因N88D突變應並不影響 α 鏈界面。N88定位於IL-2受體 β 鏈界面中且誘變至D會降低親和力，如比較DP47GS IgG-IL-2及DP47GS IgG-IL-2 N88D至所有三種物種之IL-2R $\beta\gamma$ 之結合可觀察到(分別為0.15 nM、0.60 nM及0.85 nM與0.93 nM、1.3 nM及2.4 nM)。對於攜載兩種突變IL-2細胞激素之DP47GS IgG-(IL-2 N88D)₂而言，至少針對人類IL-2R $\beta\gamma$ ，此差異較不明顯，此最可能係由於抗體親抗原性。DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-(IL-2 E95A)₂在至所有三種物種之IL-2R $\beta\gamma$ 之結合中展現極類似抗體親抗原性。儘管E95亦定位於IL-2受體 β 鏈界面中，但誘變至A (至少在兩種該等突變體融合至IgG時)並不顯著降低抗體親抗原性。

IL-2受體在免疫細胞上之表現

高親和力三聚IL-2受體由 α (IL-2RA, CD25)、 β (IL-2RB, CD122)及 γ (IL-2RG, CD132)鏈構成且具有約10 pM之 K_D 。單獨之CD25對IL-2僅具有低親和力(K_D 約為10 nM)。IL-2RB/IL-2RG二聚體(其在不存在

IL-2RA下表現於一些細胞類型上)亦結合IL-2，但具有中間親和力(K_D 約為1 nM)。經由IL-2受體之信號傳導係藉由IL-2RB及IL-2RG鏈調介。根據晶體結構分析，IL-2RA似乎並不接觸IL-2RB或IL-2RG。已提出，三聚受體之協同性之基礎在於在CD25捕獲於細胞表面處之IL-2以呈遞至IL-2RB及IL-2RG時發生熵減少，或另一選擇為發生CD25誘導之IL-2構象改變，由此使複合物穩定。在FOXP3⁺調節性CD4⁺ T細胞中，與受體之 β 及 γ 鏈相比存在大大化學計量過量之IL-2RA，從而證實了 α 鏈之二聚體或甚至更大複合物有助於IL-2結合之假設。亦證實，一種細胞上之CD25可以高親和力細胞間相互作用將IL-2呈遞至另一細胞上之IL-2RB/IL-2RG二聚體，從而突出顯示了構成高親和力IL-2受體之三種鏈之間之獨特關係。

藉由FACS測定CD4⁺ Treg子組、NK細胞子組及NKT細胞以及CD4⁺及CD8⁺習用T細胞子組上之CD25 (IL-2RA)及CD122 (IL-2RB)表現(圖6及7)。使用細胞表面標記物來定義CD4⁺ Treg子組、NKT細胞及NK細胞(圖6)。為優化CD25及CD122之染色，並不實施細胞內FoxP3染色。簡言之，使用150 μ l由健康志願者捐助之血液，將螢光抗體在室溫下於暗處培育45 min (在開始時及在20 min之後渦旋)。使用BD裂解緩衝液(BD FACS裂解溶液，349202)將紅血球裂解9分鐘且洗滌(2 ml PBS + 0.1% BSA)剩餘細胞並固定(1% PFA)。在LSRFortessaTM細胞分析儀(Becton Dickinson)上分析細胞且使用FloJo軟體(TreeStar)分析數據。使用TCR $\alpha\beta$ -FITC (IP26, BioLegend)、CD4-Alexa Fluor[®] 700 (RPA-T4, BioLegend)、CD127-PE/CY7 (ebioRDR5, Ebioscience)、CD45RA-Pacific Blue (HI100, BioLegend)、CD25-APC (2A3, M-A251, BD Biosciences)及CD122-PE (TU27, BioLegend)之特異性抗體來鑑別Treg子組。在單獨管中使用TCR $\alpha\beta$ -FITC、CD4-Alexa Fluor[®] 700、CD8-PE/CY7 (HTT8a, BioLegend)、CD56-Pacific Blue (HCD56,

BioLegend)、CD25-APC及CD122-PE之特異性抗體將NK及NKT細胞染色。在基於FSC/SSC選通淋巴球且排除雙聯體後，將幼稚Treg鑑別為 $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD127}^-\text{CD25}^+\text{CD45RA}^+$ ，將記憶性Treg鑑別為 $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD127}^-\text{CD25}^+\text{CD45RA}^-$ 且將活化Treg鑑別為 $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD127}^-\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD45RA}^-$ 。將NK細胞鑑別為 $\text{TCR}\alpha\beta^-\text{CD56}^{-/\text{dim}}$ 且將活化NK細胞鑑別為 $\text{TCR}\alpha\beta^-\text{CD56}^{\text{ss}}$ 。將NKT細胞鑑別為 $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD56}^+$ 。使用偶聯至APC及PE之同種型對照(IC)以分別估計用於CD25及CD122之背景螢光。

類似地，使用細胞表面標記物來定義幼稚及記憶性習用 CD4^+ T細胞(圖7A及7B)、記憶性習用 CD8^+ T細胞及 CD45RA^+ CD8^+ T細胞(幼稚及TEMRA子組之組合；TEMRA係指經回復以表現CD45RA之效應記憶性T細胞)(圖7C及7D)。如上所述來實施染色及分析。使用上述相同管來表徵 CD4^+ Treg，將 CD4^+ 習用幼稚T細胞鑑別為 $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD127}^+\text{CD25}^{-/+}\text{CD45RA}^+$ 且將 CD4^+ 習用記憶性T細胞鑑別為 $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD127}^+\text{CD25}^{-/+}\text{CD45RA}^-$ 。使用 $\text{TCR}\alpha\beta$ -FITC、 CD8 -Alexa Fluor[®] 700 (HTT8a, BioLegend)、 CD28-PE/CY7 (CD28.2 , BioLegend)、 $\text{CD45RA-Pacific Blue}$ 、 CD25-APC 及 CD122-PE 定義 CD8^+ T細胞。將 CD8^+ 記憶性T細胞鑑別為 $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD8}^+\text{CD45RA}^-$ 。將 CD8^+ 幼稚及TEMRA細胞鑑別為 $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD8}^+\text{CD45RA}^+$ 。並不使用 CD28 來區分 CD8^+ 幼稚T細胞與 CD8^+ TEMRA T細胞，此乃因 CD28 標記物並未包含於下述pSTAT5a分析中(參見圖8)。在一些測試(圖15)中，如下所述來定義其他子組：中樞記憶性 CD4^+ T細胞($\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD56}^-\text{FOXP3}^-\text{CD45RA}^-\text{CD127}^+\text{CD25}^{-/+}$)、效應記憶性 CD4^+ T細胞($\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD56}^-\text{FOXP3}^-\text{CD45RA}^-\text{CD127}^-\text{CD25}^{-/+}$)、中樞記憶性 CD8^+ T細胞($\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD8}^+\text{CD56}^-\text{FOXP3}^-\text{CD45RA}^-\text{CD127}^+\text{CD25}^{-/+}$)、效應記憶性 CD8^+ T細胞($\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD8}^+\text{CD56}^-\text{FOXP3}^-\text{CD45RA}^-\text{CD127}^-$

CD25^{-/+}) 及 TEMRA CD8⁺ 細胞 (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8⁺CD56⁻FOXP3⁻CD45RA⁺CD127⁻CD25^{-/+})。

在圖6及7中，展示針對人類周邊血中之T細胞、NK細胞及NK T細胞之子組之IL-2RA及IL-2RB的細胞特異性表現 (IL-2RG在造血細胞中具有基本上普遍之表現，此乃因其與大量細胞激素受體進行配偶)。最高含量之IL-2RA存在於以下三種調節性CD4⁺ T細胞(Treg)群體中：幼稚(CD45RA⁺CD25⁺)細胞、記憶性(CD45RA⁻CD25⁺)細胞及活化(CD45RA⁻CD25^{hi})細胞(圖6A)。平均而言，習用記憶性CD4⁺ T細胞較Treg表現大約1/10之CD25 (圖7A)。CD25在幼稚CD4⁺ T細胞中之表現在供體之間顯著變化，但總是低於在記憶性CD4⁺ T細胞中所觀察者(圖7A)。CD25在NK、NKT及CD8 T細胞中之表現極低或不可檢測，CD56⁺ NK細胞除外(圖6C及7C)。CD56⁺ NK及CD56⁺ NK細胞表現最高含量之IL-2RB (圖6D)，大約為任一T細胞子組(包含NKT細胞)之10倍(圖6B、6D、7B、7D)。

人類周邊血細胞子組中之pSTAT5a之誘導

在三聚IL-2R之IL-2誘導之寡聚後，分別與IL-2RB及IL-2RG之細胞內結構域有關之JAK1及JAK3細胞質蛋白質酪胺酸激酶變得活化。該等激酶磷酸化某些用作繼而磷酸化之STAT5a及STAT5b之停泊位點之IL-2RB酪胺酸殘基。若干信號傳導路徑之IL-2誘導之活化最終使得轉錄有助於各種與IL-2/IL-2R路有關之功能徑的靶基因。因各種細胞類型表現不同含量之IL-2受體IL-2RA及IL-2RB分子(圖6及7)，故藉由多色流式細胞術量測個別細胞內之pSTAT5a含量以理解藉由高親和力及中間親和力之各種組合受體調介之IL-2綜合信號傳導反應。

在人類CD4⁺ Treg子組、幼稚及記憶性習用CD4⁺ T細胞、記憶性習用CD8⁺ T細胞、CD45RA⁺ CD8 T細胞、NKT細胞及NK細胞中評價各種劑量之DP47GS IgG-IL-2、DP47GS IgG-(IL-2)₂、DP47GS IgG-

(IL-2E95A)₂、DP47GS IgG-IL-2N88D及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂對STAT5a磷酸化誘導之效應(圖8-14及表2及3)。在單一管中表徵每一劑量之所有子組。簡言之，將來自健康人類成人志願者之血液收集至肝素化管中。將各種濃度之DP47GS IgG-IL-2融合蛋白添加至500 µl血液中且在37°C下培育。在30分鐘之後，使用預升溫裂解/固定緩衝液(Becton Dickinson 558049號)在37°C下將血液裂解且固定10分鐘，使用含有0.2% BSA之PBS洗滌2次，隨後使用-20°C預冷卻甲醇(Sigma, Biotech等級號：494437)在冰上滲透化20分鐘。然後使用含有0.2% BSA之PBS將細胞深度洗滌4次，隨後使用一組螢光抗體實施FACS染色以區分不同淋巴球及NK細胞子群體及pSTAT5a狀態。所利用抗體係抗CD4-Alexa Fluor[®] 700 (純系RPA-T4)、CD3-PerCP/Cy5.5 (UCHT1)、CD45RA-PE/Cy7 (HI100)、CD8-Brilliant Violet 605 (RPA-T8)、CD56-Brilliant Violet 421 (HCD56)、FOXP3-PE (259D) (皆來自BioLegend)、CD25-APC (純系M-A251及2A3)及pSTAT5a-Alexa Fluor[®] 488 (pY694) (Becton Dickinson)。使用LSRFortessa[™]細胞分析儀(Becton Dickinson)獲取試樣且使用FlowJo軟體(FlowJo, LLC)分析數據。在選通淋巴球且排除雙聯體之後，將Tregs定義為CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺且再分為CD45⁻FOXP3^{hi} (活化Treg)、CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻FOXP3⁺ (記憶性Treg)及CD3⁺CD4⁺CD45⁺FOXP3⁺ (幼稚Treg)。將習用CD4⁺ T細胞定義為CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ (幼稚)及CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻ (記憶性)。將CD8 T細胞定義為CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻ (記憶性)及CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺。將NKT細胞定義為CD3⁺CD56⁺且將NK細胞定義為CD3⁻CD56⁺ (活化NK細胞)或CD3⁻CD56⁺ (NK細胞)。在所有細胞子組中於所有劑量下量化細胞內pSTAT5a含量。

圖8展示DP47GS IgG-IL-2免疫偶聯物對來自三種個別供體(各自

在不同日期測試)之人類周邊血中之T細胞、NK細胞及NK T細胞之劑量反應。DP47GS IgG-IL-2反應性層級在所有三種供體中相同且與在使用重組人類IL-2 (Proleukin®)時所觀察者(數據未展示)相同。所有三種Treg群體：活化(CD45RA⁺CD25^{hi})、記憶性(CD45RA⁺CD25⁺)及幼稚(CD45RA⁺CD25⁺)皆在0.1 ng/ml DP47GS IgG-IL-2濃度下增加pSTAT5a含量，而其他細胞群體需要大於1 ng/ml (CD56⁺ NK及記憶性CD4⁺ T細胞)或10-100 ng/ml (記憶性CD8⁺ T細胞、CD56⁺ NK細胞、幼稚CD4⁺ T細胞、NKT細胞及CD45RA⁺ CD8⁺ T細胞)之DP47 IgG-IL-2來產生可檢測之pSTAT5a增加。亦參見圖11中對DP47GS IgG-IL-2顯示高敏感性之Treg群體之更詳細劑量反應。顯而易見，與T細胞子組中之IL-2RB表現相比IL-2RB在含有中間含量CD56之NK細胞中之高表現(圖6D)不足以獲得Treg樣IL-2敏感性。總而言之，活化、記憶性及幼稚Treg子組對DP47GS IgG-IL-2展示最大敏感性，而CD56⁺ NK細胞及CD4⁺ 習用記憶性T效應細胞之敏感性為其1/50至1/20。在針對pSTAT5a增加所分析之其他細胞子組中，CD8⁺記憶性T效應細胞、CD4⁺幼稚T效應細胞、NKT細胞、「靜止」NK細胞(陽性，並不針對CD56實施光鮮染色)及CD8⁺幼稚T效應物+ CD45RA⁺記憶性細胞對IgG-IL-2免疫偶聯物相對不敏感。

圖9展示DP47GS IgG-(IL-2)₂對來自5種個別供體(各自在不同日期測試)之人類周邊血中之T細胞、NK細胞及NK T細胞之劑量反應。如針對DP47GS IgG-IL-2所觀察(圖8)，三種Treg子組係對DP47GS IgG-(IL-2)₂誘導之pSTAT5a最敏感之細胞(圖9及11)且針對所有5種供體中之其他細胞子組發現類似層級劑量反應。

為更易於比較 DP47GS IgG-IL-2 及 DP47GS IgG-(IL-2)₂，將pSTAT5a值正規化(圖10)。為將MFI值正規化，將每一選通子組之特定未刺激pSTAT5a MFI值自該細胞子組之所有經刺激MFI值減去。將

所得值除以在劑量反應中藉由該子組獲得之最高pSTAT5a MFI值。基於達到50%之針對該子組所觀察之最大pSTAT5a MFI所需之IL-2融合蛋白的量來估計EC₅₀。如圖10中所展示，DP47GS IgG-(IL2)₂免疫偶聯物在組成型表現CD25之細胞中產生更強之力pSTAT5a誘導，此可能係由於免疫偶聯物對高親和力IL-2受體之抗體親抗原性有所增加。在直接比較DP47GS IgG-(IL-2)₂與DP47GS IgG-IL-2時，觀察到pSTAT5a活化之EC₅₀在Treg中低5-9倍。表2匯總藉由DP47GS IgG-IL-2與DP47GS IgG-(IL-2)₂在不同細胞子組中達成之pSTAT5a活化之代表性EC₅₀值及倍數差。

表2.藉由DP47GS IgG-IL-2與DP47GS IgG-(IL-2)₂在不同細胞子組中達成之pSTAT5a活化之EC₅₀值及倍數差。

T細胞	IgG-IL-2	IgG-(IL-2) ₂	倍數變化
活化Treg	0.10 ng/mL	0.020 ng/mL	5
記憶性Treg	0.22 ng/mL	0.033 ng/mL	7
幼稚Treg	0.20 ng/mL	0.023 ng/mL	9
CD56 ⁺ NK	2.0 ng/mL	0.63 ng/mL	3
CD4 ⁺ 記憶性Teff	5 ng/mL	0.7 ng/mL	7
NK細胞	35 ng/mL	10 ng/mL	4

即使在極端限制濃度下，與DP47GS IgG-IL-2相比，DP47GS IgG-(IL-2)₂亦產生較高含量之pSTAT5a (圖11)。對於此實驗而言，在同一天個別地測試來自三種健康志願者之血液對在IL-2限制濃度下2倍滴定DP47 IgG-IL-2及DP47 IgG-(IL-2)₂之反應。圖11中之圖形代表三種供體之pSTAT5a MFI之平均值± SD。除個別地檢驗之三種Treg子組(圖11B-D)外，應用選通以評價總CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺ Treg中之pSTAT5a (圖11A)。結果明確指示，Treg之DP47GS IgG-(IL-2)₂活化之效力增加5-10倍，但在IL-2/分子IgG中僅增加2倍。如上所述實施多色

流式細胞術(參見圖8)。

與DP47GS IgG-IL-2相比， $CD4^+$ 習用記憶性T效應細胞亦對較低(7倍)濃度之DP47GS IgG-(IL-2)₂具有反應。儘管在比較DP47GS IgG-(IL-2)₂與DP47 IgG-IL-2時 $CD56^{\text{hi}}$ NK細胞及 $CD56^+$ NK細胞之 EC_{50} 值較低，但分別僅低3倍及4倍。此可能係由於該等細胞依賴於中間親和力IL-2受體進行IL-2介導之信號傳導。Treg細胞對NK細胞之 ED_{50} 之此差示移位將Treg活化傾向增加數倍。

圖12展示DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂對來自三種個別供體(各自在不同日期測試)之人類周邊血中之T細胞、NK細胞及NK T細胞之劑量反應。設計IL-2E95A分子且預計會減小IL-2R $\beta\gamma$ 結合活性，但實際上與野生型IL-2展現類似IL-2R $\beta\gamma$ 受體結合性質。DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂之反應性層級在所有三種供體中相同且與在相同供體中使用野生型IL-2免疫偶聯物DP47GS IgG-(IL-2)₂所觀察者相同。所有三種Treg群體：活化($CD45RA^-CD25^{\text{hi}}$)、記憶性($CD45RA^-CD25^+$)及幼稚($CD45RA^+CD25^+$)在小於0.1 ng/ml之DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂濃度下皆增加pSTAT5a含量，而其他細胞群體需要1 ng/ml ($CD56^{\text{hi}}$ NK及 $CD4^+$ 習用記憶性T效應細胞)或10-100 ng/ml (記憶性 $CD8^+$ T細胞、 $CD56^+$ NK細胞、幼稚 $CD4^+$ T細胞、NKT細胞及 $CD45RA^+CD8^+$ T細胞)之DP47 IgG-(IL-2E95A)₂來產生可檢測之pSTAT5a增加。顯而易見，與T細胞子組中之IL-2RB表現相比，含有中間含量 $CD56$ 之NK細胞中IL-2RB之高表現(圖6D)不足以獲得Treg樣IL-2敏感性。總而言之，活化、記憶性及幼稚Treg子組對DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂展示最大敏感性，而 $CD56^{\text{hi}}$ NK細胞及 $CD4^+$ 習用記憶性T效應細胞之敏感性為其1/50至1/20。在針對pSTAT5a增加所分析之其他細胞子組中， $CD8^+$ 記憶性T效應細胞、 $CD4^+$ 幼稚T效應細胞、NKT細胞、「靜止」NK細胞(陽性，並不針對 $CD56$ 實施光鮮染色)及 $CD8^+ CD45RA^+$ 幼稚T效應

細胞對IgG-(IL-2E95A)₂免疫偶聯物相對不敏感。

圖13展示DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂對來自5種個別供體(各自在不同日期測試)之人類周邊血中之T細胞、NK細胞及NK T細胞之劑量反應。設計IL-2N88D分子以減小IL2Rβγ結合活性且與E95A點突變不同，其對IL2Rβγ之結合親和力小6.2倍(藉由Biacore分析，表1，K_D 0.15 nM對0.93 nM)。如針對迄今為止之所有IL-2免疫偶聯物所觀察，三種Treg子組係對DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之pSTAT5a活化最敏感之細胞且針對所有5種供體中之其他細胞子組發現類似層級劑量反應。尤其注意的是，在使用DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂刺激時，CD4⁺記憶性T效應細胞缺乏反應性；即使在1000 ng/ml之劑量下，其亦具有刺激此重要自體免疫細胞群體之較小效應。

在此實例中，經獨特設計之IL-2單一點突變N88D顯著減小對期望細胞群體CD4⁺記憶性T效應細胞之刺激活性，其皆同時維持新穎及改良之治療實體所需之Treg刺激效應。

為比較野生型IL-2 DP47GS IgG-(IL-2)₂與E95A及N88D IL-2點突變免疫偶聯物，針對每一所測試細胞類型繪製彼此之pSTAT5a值圖線(圖14)。DPS47GS IgG-(IL-2E95A)₂與其野生型對等部分DP47GS IgG-(IL-2)₂展示相同之刺激每一人類細胞群體之活性且具有可重疊劑量反應曲線。與之相比，IL2Rβγ結合較小之分子DP47GS IgG-IL-2N88D及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂對CD4⁺記憶性T效應細胞具有較小效應，且僅二價偶聯物DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂維持對不同Treg群體之顯著刺激活性。

圖15中之結果展示自其他10種人類血液供體收集之全血pSTAT5a反應。在單獨日期，測試每一供體以比較寬(≥ 6 log))滴定範圍之DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂。如先前使用DP47GS IgG-(IL-2)₂所看到(圖9)，記憶性Treg及幼稚Treg係對DP47GS IgG-(IL-

2)₂及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂誘導之pSTAT5a最敏感之細胞(圖15A、B)；而每一融合蛋白刺激最大pSTAT5a反應，其區別在於活化拐點所需之濃度以及最大活化劑量。與野生型IL-2融合蛋白相比，CD56^亮 NK細胞呈現為對DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之敏感性小於Treg之細胞子組(圖15C)；活化拐點較高且在此情形下不曾達成最大效應，即使在所測試之最高劑量下(5000 ng/ml)。與DP47GS IgG-(IL-2)₂不同，NK細胞對DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂無反應(圖15D)。中樞記憶性CD4⁺ T細胞(圖15E)及效應記憶性CD4⁺ T細胞(圖15F)對DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂相對無反應，其中活化拐點為DP47GS IgG-(IL-2)₂之1000倍且在所測試之最高劑量下僅誘導部分反應(5000 ng/ml)。儘管DP47GS IgG-(IL-2)₂誘導不同活化程度，但DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂對下列細胞子組並無效應：幼稚CD4⁺ T細胞(圖15G)、中樞記憶性CD8⁺ T細胞(圖15H)、效應記憶性CD8⁺ T細胞(圖15I)、幼稚CD8⁺ T細胞(圖15J)、效應記憶性CD45RA⁺ CD8⁺ T細胞(圖15K)、NKT細胞(圖15L)及CD3⁺CD4⁻CD8⁻CD56⁻ T細胞(圖15M)。

EC₅₀值展示於表3中且係基於達到50%之針對該細胞子組所觀察之最大pSTAT5a反應所需之IL-2融合蛋白的量。類似於野生型IL-2對等部分 DP47GS IgG-(IL-2)₂，DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂在組成型表現高親和力受體CD25 (IL2Rα)之Treg細胞中產生最強力之pSTAT5a誘導，此可能係由於其增加了對高親和力IL-2受體之抗體親抗原性。對DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂及DP47GS IgG-(IL-2)₂之劑量反應可重疊。使用DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂及DP47GS IgG-(IL-2)₂在Treg中所達成之pSTAT5a活化之EC₅₀為單價DP47GS IgG-IL-2之1/7至1/6。同樣，單價DP47GS IgG-IL-2之Treg活化之EC₅₀為二價DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之1/10至1/7。且最後，二價DP47GS IgG-(IL-2)₂之Treg活化之EC₅₀為二價DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之1/61至1/36。

DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂治療自體免疫病症之最顯著免疫學優點最佳地闡釋於表3中，其中顯示DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂具有Treg活化對CD4⁺記憶性T效應細胞之明顯特異性界限(>320倍至>500倍)。與之相比，DP47GS IgG-(IL-2)₂ (13至14倍)及DP47GS IgG-IL-2 (10至16倍)之Tregs對CD4⁺記憶性T效應細胞之特異性界限顯著較小。

表3.DP47GS IgG-(IL-2E95A)₂、DP47GS IgG-IL-2及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂在不同細胞子組中達成之pSTAT5a活化之EC₅₀值及特異性倍數差異。

人類細胞子組	IgG-IL-2 ED ₅₀ (pM)	IgG-(IL-2) ₂ ED ₅₀ (pM)	IgG-(IL-2N88D) ₂ ED ₅₀ (pM)
記憶性Treg	2.2	0.31	11.4
幼稚Treg	1.8	0.29	17.7
CD4 ⁺ 記憶性T效應物	29	4	>5700
特異性倍數：			
記憶性Treg對CD4 ⁺ 記憶性Teff	10	13	>500
幼稚Treg對CD4 ⁺ 記憶性Teff	16	14	>320

IL-2融合蛋白對人類NK細胞及CD8⁺ T細胞在活體外之差異效應：在活體外於除IL-2外無其他刺激下在已知有益於NK細胞及CD8⁺ T細胞之存活及生長之條件下培養新鮮人類周邊血單核細胞(PBMC)。人類NK細胞可再分成彼等表現較小或並無可檢測CD56者(稱為CD56^{-dim})及表現高含量CD56之「活化」子組(稱為CD56^亮)；血液中之大部分NK細胞係CD56^{-dim}且小部分歸類為CD56^亮。稱為CD56^亮之「活化」NK細胞可視為缺乏CD56表現之NK細胞前體(亦即CD56^{-dim})。在活體外使用DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (各自在0、5、50及500 ng/ml下) 6天之後，NK CD56^{-dim}細胞、NK CD56^亮細胞及CD8⁺ T細胞之生長及存活檢測到差異。在CD56^亮細胞(中值為101 × 10³對38 × 10³, p<0.005) (圖16A)亦及CD8⁺ T細胞(中值為13.6 × 10³個

細胞對 2.5×10^3 個細胞， $p < 0.0001$) (圖16B)使用DP47GS IgG-(IL-2)₂刺激最大增加之刺激之間看到細胞數具有顯著差異。

IL-2融合蛋白在人類化小鼠中之效應

使用弱輻照新生NOD.*Prkdc^{scid} IL2rg^{null}* (NSG)小鼠作為免疫妥協宿主且向其植入經腹膜腔內注射之人類胎肝CD34⁺幹細胞來構築人類化小鼠。在8至10週齡時，測試來自每一小鼠之血液以確保發生人類植入。比較Proleukin及DP47GS IgG-(IL-2)₂發現，在活體內影響之主要細胞係NK細胞及Treg；在DP47GS IgG-(IL-2)₂治療後，NK細胞及Treg發生實質性增加且NK細胞相應地具有較大反應。Proleukin之活體內效應類似，但組內對NK細胞及Treg之效應較不一致且增加程度小於DP47GS IgG-(IL-2)₂。人類化小鼠亦能夠區分IL-2融合蛋白之活體內效應。野生型DP47GS IgG-(IL-2)₂增加Treg (圖17A)及NK細胞(圖17B)，而DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂對NK細胞並無效應(圖17B)，但將Treg增加至顯著大於野生型IgG-(IL-2)₂之程度(圖17A)。

人類化NSG小鼠之長期結果係其存活時間較短，此乃因人類異種移植物抗宿主反應導致重量損失及多系統器官衰竭。每週兩次投與媒劑並無效應且在開始治療之後得到36天中值存活期(圖18)。類似於媒劑，使用DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂進行治療得到37天之中值存活期。與之相比，每週兩次使用DP47GS IgG-(IL-2)₂進行治療將此組之中值存活時間縮短至21天(圖18，與DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂相比 $p < 0.0037$)。

在移植物抗宿主反應之預定嚴重程度指示每一小鼠之生命期到達終點時(重量損失 $\geq 15\%$)，在血液中評價人類細胞組合物。在發生危及生命之移植物抗宿主反應時，在治療組之血液中看到Treg、NK細胞及CD8⁺ T細胞之最終組成具有顯著差異(圖19)。在媒劑治療小鼠中，人類Treg佔總人類CD45⁺細胞之小於1%且NK及CD8⁺ T細胞佔血

液中人類CD45⁺細胞之約3%。使用DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂進行治療將NK及CD8⁺ T細胞分別增加至2%及5%，而將Treg增加至6%。與之相比，野生型DP47GS IgG-(IL-2)₂治療將NK細胞及CD8⁺ T細胞之分數增加至總人類CD45⁺細胞之30%且將Treg增加至3.5%，此或許可闡釋此組中存活時間與DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂治療小鼠相比具有顯著減小。

食蟹猴周邊血細胞子組中之pSTAT5a之誘導

如在人類周邊血中所觀察，在使用IL-2 (Proleukin)刺激之食蟹猴周邊血中之Treg子組中，pSTAT5a具有優先及類似劑量依賴性誘導(數據未展示)。在直接對比DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-IL-2誘導三種Treg子組中之pSTAT5a之能力時，與DP47GS IgG-IL-2相比，需要1/8至1/2之DP47GS IgG-(IL-2)₂來達到50%之最大pSTAT5a含量。表4匯總藉由DP47GS IgG-IL-2與DP47GS IgG-(IL-2)₂在不同食蟹猴Treg子組中達成之pSTAT5a活化之EC₅₀值，結果顯著類似於彼等使用人類周邊血所看到者(表3)。

類似於人類全血，使用細胞表面及細胞內標記物來鑑別來自正常健康食蟹猴之全血中之調節性T細胞子組及習用T細胞。在同一天自三個健康食蟹猴在肝素鈉管中收集血樣且將各種濃度之DP47GS IgG-IL-2或DP47GS IgG-(IL-2)₂添加至500 μl血液中並在37°C下培育。在37°C下保持10 min之後，將試樣裂解且使用預升溫BD裂解/固定緩衝液(BD Biosciences)固定。在洗滌之後，在冰上使用1 mL甲醇將細胞滲透化30 min。將試樣洗滌3次且使用一組FOXP3-Alexa Fluor[®] 647 (純系：259D, BioLegend)、CD4-V500 (純系：L200, BD Biosciences)、CD45RA-V450 (純系：5H9, BD Biosciences)、CD25-PE (純系：4E3, eBioscience)、pSTAT5a- Alexa Fluor[®] 488 (純系：47, BD Biosciences)及Ki-67-PerCP-Cy5.5 (純系：B56, BD Biosciences)在4°C

下染色1小時。藉由LSRFortessa™細胞分析儀(Becton Dickinson)獲取所有試樣且然後使用FlowJo軟體 (FlowJo, LLC)分析。

表4.因應於DP47GS IgG-IL-2及DP47GS IgG-(IL-2)₂食蟹猴周邊血Treg子組中之pSTAT5a誘導。

T細胞	IgG-IL-2	IgG-(IL-2) ₂	倍數變化
活化Treg	0.07 ng/mL	0.02 ng/mL	4
記憶性Treg	0.21 ng/mL	0.025 ng/mL	8
幼稚Treg	0.04 ng/mL	0.02 ng/mL	2

在另一實驗中，類似於使用人類血液之pSTAT5a分析，在活體外使用PBS（作為媒劑對照）、DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂刺激來自正常健康成年食蟹猴之新鮮肝素化血液且檢驗對Treg子組及習用CD4⁺記憶性T效應細胞中之STAT5a磷酸化之效應。基於在≤ 1 ng/mL下之最大人類Treg反應及在該劑量範圍內習用CD4⁺記憶性T效應細胞之近最大反應來選擇20 ng/mL刺激劑量(結果示於圖9中)。

實驗條件如上所述。在同一天自三個健康食蟹猴(供體C1、C2、C3)於肝素鈉管中收集血樣且將20 ng/mL DP47GS IgG-(IL-2)₂或DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂添加至500 μl血液中並在37℃下培育20 min，然後進行裂解及分析。

用於將食蟹猴CD4⁺CD25⁺ Treg分成幼稚(FOXP3⁺CD45RA⁺)、記憶性(FOXP3⁺CD45RA⁻)及活化(FOXP3^{hi}CD45RA⁻)子組以用於分析之流式細胞術選通策略展示於圖20A中。在人類中，來自每一供體之三個CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg子組表現高含量之高親和力IL-2受體CD25(圖20B)。在使用20 ng/mL DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂活體外刺激後，來自所有三種供體之Treg產生顯著STAT5a磷酸化(圖20C)。類似於人類，與幼稚Treg相比，食蟹猴活化及記憶性

Treg展示較大pSTAT5a誘導可能。

人類用CD4⁺記憶性T效應細胞儘管並不與Treg一般敏感，但能夠經IL-2刺激，且在使用pSTAT5a作為活化生物標記物時DP47GS IgG-(IL-2)₂之估計ED₉₀為20 ng/mL (圖14)。食蟹猴習用CD4⁺記憶性T效應細胞可類似地在血液中鑑別為CD4⁺FOXP3⁻CD45RA⁻細胞，其中大部分細胞係CD25⁻且較小子組係CD25⁺ (圖21A)。在作為整體群體考慮時，來自所有三種供體之食蟹猴記憶性Teff細胞對20 ng/mL DP47GS IgG-(IL-2)₂具有反應且pSTAT5A有所增加，而20 ng/mL DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂對pSTAT5a具有較小(食蟹猴2)或無效應(食蟹猴1及3) (圖21B)。在將記憶性Teff細胞進一步再分成CD25⁻及CD25⁺子組時，對DP47GS IgG-(IL-2)₂之反應主要發現於CD25⁺子組中(圖21D)，且在CD25⁻子組中具有較小反應(圖21C)。與之相比，DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂對CD25⁻記憶性Teff細胞並無效應(圖21C)且對CD25⁺子組具有小70-80%之刺激活性(圖21D)。

新鮮正常食蟹猴血液中之其他研究直接比較不同濃度之DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂以劑量反應方式刺激不同T細胞子組(亦即活化、幼稚及記憶性Treg及CD4⁺記憶性T效應細胞)中之pSTAT5a的能力。DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂以劑量依賴性方式刺激Treg，其中野生型二價IL-2融合蛋白在每一Treg子組中之效力約為二價IL-2N88D融合蛋白之10倍(圖22A-C)。與之相比，在評價CD4⁺記憶性T效應細胞之pSTAT5a誘導時，在兩種分子之間看到明顯差異(圖22D)。DP47GS IgG-(IL-2)₂呈現約300 ng/mL之EC₉₀，而DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂在該高劑量下實際上並無效應。食蟹猴pSTAT5a刺激之EC₅₀值以及刺激Treg與CD4⁺記憶性T效應細胞之相對倍數特異性展示於表5中。食蟹猴全血中之該等結果極其類似於使用人類全血之結果(圖14及表3)且表明食蟹猴中之研究可高度預

測人類臨床試驗之值。

表5.食蟹猴T細胞子組中藉由DP47GS IgG-(IL-2)₂及DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂達成之pSTAT5a活化之EC₅₀值及倍數特異性差異。

食蟹猴Treg	IgG-(IL-2) ₂ (ng/mL)	IgG-(IL-2 N88D) ₂ (ng/mL)
活化Treg	0.1	0.7
記憶性Treg	0.1	1.1
幼稚Treg	0.06	0.8
CD4 ⁺ 記憶性T效應物	1.2	>1,000
倍數特異性：		
活化Treg對CD4 ⁺ 記憶性Teff	12	>1,400
記憶性Treg對CD4 ⁺ 記憶性Teff	12	>900
幼稚Treg對CD4 ⁺ 記憶性Teff	20	>1,200

小鼠中之藥物代謝動力學性質

在小鼠中實施功能研究之前，在NOD、NOD.scid及NOD.scid.II2ra^{-/-}小鼠中評估野生型及N88D單價與二價IL-2免疫偶聯物之藥物動力學(PK)性質(圖23)。

向NOD及NOD.scid小鼠(n=3)經靜脈內(i.v.)注射存於含有0.5%小鼠血清之PBS中之0.3 mg/kg/小鼠DP47GS IgG-IL-2或DP47GS IgG-(IL-2)₂，且在注射之後不同時間(自2分鐘至168小時)實施取血(圖23A)。在小鼠血清試樣中藉由使用小鼠抗人類IL-2 mAb (BD Pharmingen，555051號，純系5344.111)塗覆96孔板以捕獲IL-2來評價人類IL-2。然後使用生物素化小鼠抗人類IL-2 mAb (BD Pharmingen，555040號，純系B33-2)檢測IL-2。觀測IL-2結合且使用鎢偶聯鏈黴抗生物素量化。在前24小時中，DP47GS IgG-(IL-2)₂較DP47GS IgG-IL-2在NOD及NOD.scid小鼠中更快速地清除。在48小時時，每一血清含量皆處於類似濃度下且皆低於72小時時之檢測限值。IL-2檢測限值為0.05 ng/mL

且藉由點線指示。單價及二價IgG-IL-2免疫偶聯物在無適應性免疫系統之小鼠中皆具有令人吃驚之快速清除，此表明在小鼠中存在非造血IL-2室或「池」且可驅使IL-2免疫偶聯物之快速活體內清除。

為測試此假設，在亦缺乏高親和力IL-2受體IL2R α (CD25)之NOD.scid小鼠、亦即 NOD.scid.II2ra^{-/-}小鼠中實施PK研究(圖23B)。在NOD.scid. II2ra^{-/-}小鼠中，DP47GS IgG-(IL-2)₂儘管係以三倍劑量(0.3 mg/kg)給予，但較0.1 mg/kg DP47GS IgG-IL-2及0.1 mg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂在前24至48小時內更快速地清除。然而，在48小時之後，每一偶聯物之血液濃度顯示緩慢穩定消除期，其中在6天時在血液中具有可易於檢測之IL-2。令人吃驚的是，在該等高親和力IL-2受體缺陷小鼠中，DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂分子具有略快於IgG-IL-2之初始24小時分佈期，但然後在6天時(測試其之最後時間)顯示類似於野生型單價免疫偶聯物之消除期。DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之該等數據尤其相關，此乃因NOD.scid.II2ra^{-/-}小鼠中之PK結果似乎高度預測非人類靈長類動物中之PK結果。

在使用IL-2治療之後小鼠Treg中之FOXP3及CD25增加

為比較不同分子形式及構形之人類IL-2在活體內刺激FoxP3⁺ Treg之能力，向小鼠經皮下注射媒劑、Proleukin (重組人類IL-2)、DP47GS IgG-IL-2、DP47GS IgG-(IL-2)₂或DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂且在先前確定之24小時最佳時間時評價Treg中細胞表面CD25及細胞內FOXP3之表現變化(圖24)。向幼小健康BALB/c小鼠(n=3/治療組，n=4/媒劑小組)經皮下注射Proleukin (20,000或100,000 IU/小鼠)、DP47GS IgG-IL-2 (60、300或1500 IU/小鼠)、DP47GS IgG-(IL-2)₂ (60、300或1500 IU/小鼠)或DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (60、300或1500 IU/小鼠)。以包括100 μ l含有0.5%無菌過濾小鼠血清之pH 7.2無菌PBS之媒劑遞送劑量。在24小時之後，對小鼠實施無痛處死且切下脾臟。在1 ml L-

15培養基中生成脾細胞之單一細胞懸浮液且儲存於冰上，直至進一步處理為止。將單一細胞懸浮液之40 μ l經過濾等分試樣轉移至FACS管中且使用2 ml FACS緩衝液洗滌($600 \times g$, 5 min)。然後將實驗與指向以下細胞表面抗原之螢光色素偶聯抗體一起培育：CD4 (純系RM4-5, 螢光色素A700)、CD25 (eBio7D4, Af488)、CD44 (IM7, e605)、CD62L (MEL-14, PE)、ICOS (C398.4A, PE/Cy7)、CD103 (2E7, APC)。在4°C下於100 μ l FACS緩衝液(PBS pH 7.2 + 0.2% BSA)中實施染色30 min。在細胞表面染色後，使用4 ml FACS緩衝液($600 \times g$, 5 min)洗滌試樣，然後實施細胞內染色(根據eBioscience細胞內染色方案)。簡言之，將試樣再懸浮於200 μ l固定/滲透化緩衝液(eBioscience 00-5521號)中且在4°C下培育1 h。向試樣中添加1 ml 1 $\times$ 滲透化緩衝液(eBioscience 00-8333號)，然後添加3 ml FACS緩衝液且洗滌($600 \times g$, 5 min)。在4°C下於100 μ l 1 $\times$ 滲透化緩衝液中將細胞內抗原Ki-67 (B56, PerCP Cy5.5)及FOXP3 (FJK-16S, e450)染色1 h。使用4 ml FACS緩衝液($600 \times g$, 5 min -兩次)洗滌試樣且在BD FortessaTM分析儀上獲取數據並使用FlowJo軟體(FlowJo, LLC)分析。自淋巴球門內之單聯體將Treg定義為CD4⁺FOXP3⁺；自此群體，計算所有試樣之CD25及FOXP3平均螢光強度(MFI)。

如圖24中所展示，三種IL-2免疫偶聯物等效地刺激小鼠Treg中CD25 (24A)及FoxP3 (24B)之表現且在60、300及1500 IU/小鼠劑量之範圍內展示一致劑量依賴性反應。在每一情形下，1500 IU之每一免疫偶聯物(黑條)較100,000 IU之Proleukin (黑條)顯著地更有效。在大部分情形下，300 IU之免疫偶聯物(深灰條)等效於100,000 IU之Proleukin，且60 IU之免疫偶聯物(淺灰條)等效於20,000 IU之Proleukin (淺灰條)。在所有治療組中，數據展示為平均值 $\pm$ SD。

食蟹猴中之藥物動力學性質

在非人類靈長類動物中實施功能研究之前，在生物幼稚健康成年食蟹猴中評估IL-2免疫偶聯物之藥物動力學(PK)性質(圖25)。向猴(n=2/劑量)經靜脈內(i.v.)注射短濃注之存於含有0.5%食蟹猴血清之PBS中之無菌DP47GS IgG-IL-2或DP47GS IgG-(IL-2)₂，且在注射之後之不同時間(自30分鐘至72小時)實施取血。在食蟹猴血清試樣中藉由使用小鼠抗人類IL-2 mAb (BD Pharmingen，目錄編號：555051，純系5344.111)塗覆96孔板以捕獲人類IL-2來評價人類IL-2。然後使用生物素化小鼠抗人類IL-2 mAb (BD Pharmingen，目錄編號：555040，純系B33-2)檢測人類IL-2。觀測IL-2結合且使用鎔偶聯鏈黴抗生物素量化。分析使用食蟹猴血清之檢測濃度為0.05 ng/mL IL-2 (圖中之點線)。在治療之前獲取之食蟹猴血清並無可檢測IL-2 (由此< 0.05 ng/mL)。

在食蟹猴血清中在經靜脈內注射所有劑量之DP47GS IgG-IL-2 (圖25A)及DP47GS IgG-(IL-2)₂之後自30分鐘至48小時檢測IL-2 (圖25B)。在72小時時，對於使用10 µg/kg及25 µg/kg DP47GS IgG-IL-2或DP47GS IgG-(IL-2)₂治療之所有動物，IL-2之血清含量低於檢測限值(0.05 ng/mL，點線)。在100 µg/kg DP47GS IgG-IL-2之劑量之後，在72小時時仍存在可檢測血清IL-2。

食蟹猴中之Treg數量之誘導

使用DP47GS IgG-IL-2活體內治療之食蟹猴動物中之絕對Treg數量具有劑量依賴性增加且在投藥後7天具有高於基線之倍數增加(分別為圖26A及26B)。在所有測試中使用3歲至6歲之兩種性別之正常健康食蟹猴且動物並不使用一次以上。在麻醉下，將各種劑量之DP47GS IgG-IL-2 (n=4-6)或媒劑(n=3)經皮下注射於側背部上。DP47GS IgG-IL-2之個別劑量係基於體重且經調配以含有0.5%無菌正常食蟹猴血清之pH 7.2無菌PBS媒劑進行注射。在治療後之不同時間收集血樣且使

用Advia Automated Hematology分析儀以及上文詳述之細胞表面及細胞內標記物(表4之實驗程序)測試血液學變化(CBC及分類)。在治療後7天全血 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ 、調節性T細胞之變化以絕對細胞數/ mm^3 全血(圖26A)及Treg倍數變化(圖26B)展示於圖26中；所有數據皆以平均值 $\pm$ SD形式表示。在25 $\mu g/kg$ 及36 $\mu g/kg$ DP47GS IgG-IL-2之較高劑量下，分別觀察到Treg平均增加近3倍(111-255%之範圍， $n=6$)及4倍(110-470%之範圍， $n=6$)。DP47GS IgG-IL-2之SC劑量之進一步減小(12、6及2 $\mu g/kg$)繼續產生相應減小之Treg數量變化及倍數變化。不期望受限於理論，使用12 $\mu g/kg$ DP47GS IgG-IL2劑量時Treg之約2倍增加(介於67-133%之間， $n=6$)可代表對於一些自體免疫及發炎性疾病Treg之期望增加。人類中之Treg數量具有較大範圍(20-90 Treg/ mm^3 血液；4%至10% $CD4^+$ T細胞)且可合理地假設個體內由IL-2誘導之Treg增加會整體性增加功能阻抑。

在評估DP47GS IgG-IL-2之較低劑量(2-6 $\mu g/kg$)時，收集更頻繁血液試樣以鑑別在DP47GS IgG-IL-2投與後檢測Treg變化之最佳時間(圖27)。儘管在7天時存在Treg變化，但最大刺激出現於第4天，此快於使用較高劑量之DP47GS IgG-IL-2所量測者(第7天，圖26)。

在藉由用於刺激Treg及其他IL-2反應性細胞IL-2中之pSTAT5a之活性單位直接比較時，Proleukin及DP47GS IgG-IL-2在活體外於人類及食蟹猴全血分析中相當(數據未展示)。在Proleukin在人類中具有已知短半衰期之情形下，在食蟹猴中進行單一劑量研究以評價活體內Treg誘導及活化。Proleukin產生Treg之劑量及時間依賴性變化，如藉由絕對數量之倍數變化以及pSTAT5a活化所量測。儘管Treg數量增加為標稱值(圖28A: 10-40%)，但Proleukin[®]誘導之Treg pSTAT5a增加在治療之後一天係實質性且劑量依賴性的(圖28B)，但活體內持續時間短且在第2天至第3天恢復正常。

DP47GS IgG-IL-2活體內誘導食蟹猴中之Treg增加之能力與Proleukin之對比展示於圖29中。使用低劑量之DP47GS IgG-IL-2或高劑量之Proleukin治療正常健康食蟹猴(n=5之組)且在第10天測試調節性T細胞之變化。在第0及7天，以16,800 IU/kg之劑量(展示於圖26中之12 µg/kg劑量)經皮下給予DP47 IgG-IL-2。基於將Proleukin給予1型糖尿病患者(4.5×10^6 IU/人，3次/週)且展示增加Treg之公開著作及圖28中之單一劑量數據，每週3次(M/W/F)經皮下給予Proleukin總共5個劑量，各自以200,000 IU/kg給予(4.5×10^6 IU/人之食蟹猴當量)。以下參數之結果以平均值± SD形式展示於圖29中：總Treg變化/mm³血液(圖29A)、Treg數量之倍數增加(圖29B)及Treg對習用CD4⁺ FOXP3⁺細胞之比率之變化(圖29C)。

儘管經10天時段投與接近1/30之DP47GS IgG-IL-2活性，但DP47GS IgG-IL-2所誘導之Treg數量增加大於Proleukin (圖29A, p=0.06)。與Proleukin相比在投用DP47GS IgG-IL-2之猴中，Treg數量高於基線之倍數增加(圖29B)及Tregs相對於習用CD4⁺ T細胞之增加(圖29C)亦較大(分別為p=0.0011及p=0.016)。在人類中，通常使用CD4⁺調節性T細胞(通常定義為FOXP3⁺及表面標記物之組合)對非調節性CD4⁺ T細胞(稱為習用或效應細胞)之比率來定義患者中隨時間之Treg功能含量。

食蟹猴周邊血細胞子組對低劑量DP47GS IgG-IL-2治療之活體內反應

低劑量IL-2治療之活體內細胞特異性係關鍵參數。已測得，可藉由離體量測在食蟹猴或小鼠投藥之後於不同時間所獲取血液中之pSTAT5a含量來敏感性監測由DP47GS IgG-IL-2或Proleukin誘導之活體內細胞活化。可在活體外監測之所有細胞群體之活體內反應(圖8-10)亦可離體檢驗。

在向健康食蟹猴(n=5)活體內投與單一低劑量之DP47GS IgG-IL-2

(12 $\mu\text{g/kg}$)之後1及3天，收集全血且如上所述測試STAT5a磷酸化(表4之實驗程序)。在治療之前第0天對每一猴實施取血且量測STAT5a磷酸化程度且個別地用於評價治療後倍數變化。在第1及3天Treg中之pSTAT5a之倍數變化展示於圖30A中，習用 $\text{CD4}^+\text{CD45RA}^-$ 記憶性T效應細胞中之pSTAT5a之倍數變化展示於圖30B中，且習用 $\text{CD4}^+\text{CD45RA}^+$ 幼稚T效應細胞中之pSTAT5a之倍數變化展示於圖30C中。結果明確展示，在單一低劑量(12 $\mu\text{g/kg}$)之DP47GS IgG-IL-2之後一及三天獲得之食蟹猴血液與記憶性及幼稚 CD4^+ T細胞相比在Treg細胞中展示優先pSTAT5a增加(圖30A-C)。對於產生持續活體內Treg活化狀態，單一低劑量DP47GS IgG-IL-2明顯優於單一高劑量Proleukin (圖28B)。

使用STAT5a磷酸化作為Treg活化之活體內生物標記物之初始研究僅在使用單一劑量Proleukin 1天時(圖28B)及使用低劑量(12 $\mu\text{g/kg}$) DP47GS IgG-IL-2 1及3天時(圖30A)看到最大pSTAT5a。與額外採樣時間組合DP47GS IgG-IL-2之進一步滴定展示，活體內pSTAT5a信號可在第7天跌落回正常之前維持4天(圖31A、31B)。針對2 $\mu\text{g/kg}$ (31A, $n=4$)及6 $\mu\text{g/kg}$ (31B, $n=6$)劑量之pSTAT5a信號之MFI (平均螢光強度)表明，發生小於最大pSTAT5a信號傳導之pSTAT5a信號傳導(參見圖33B)。該等極低劑量之DP47GS IgG-IL-2甚至提供Treg之持續活體內信號傳導且優於Proleukin (圖28B)。該等結果支持以下假設：極低量長效IL-2 (亦即DP47GS IgG-IL-2但非Proleukin)可在活體內於延長時間段內刺激Treg，由此減小再確立顯性自身耐受性並改良疾病結果所需之治療頻率。在低劑量IL-2治療之後周邊血中Treg細胞之增加可反映身體中細胞之分佈變化而非反映細胞實際增加。為證實活體內Treg增加至少部分地係由於IL-2治療誘導細胞分裂，評價增殖之細胞內標記物Ki-67。Ki-67係可在 G_1 、S、 G_2 及有絲分裂期間於細胞核中檢測

到但不存在於細胞週期G₀期中之靜止細胞中之蛋白質。亦如所闡述監測使用2 µg/kg及6 µg/kg上述DP47GS IgG-IL-2治療之食蟹猴(圖31)中細胞內標記物Ki-67之離體變化(表4之實驗程序)以評價活體內增殖程度。將在第0天細胞週期中之細胞(Ki-67⁺)之百分比與在治療後1至11天細胞Ki-67⁺之百分比進行比較。Ki-67⁺ Treg展示於圖32A中，習用CD4⁺CD45⁺記憶性T效應細胞展示於圖32B中，且習用CD4⁺CD45RA⁺幼稚T效應細胞展示於圖32C中。在單一低劑量DP47GS IgG-IL-2 (6 µg/kg)之後一至七天獲得之食蟹猴血細胞與習用CD4⁺幼稚T效應細胞相比展示Treg之優先Ki-67增加(圖32A與32C)。與幼稚T效應細胞不同，DP47GS IgG-IL-2 (6 µg/kg)能夠刺激習用記憶性CD4⁺ T效應細胞之增殖(圖32B)。在最低劑量之DP47GS IgG-IL-2 (2 µg/kg)下，與6 µg/kg劑量相比細胞週期及增殖具有最小活化。

在人類及食蟹猴全血分析中，總體而言，二價DP47GS IgG-(IL-2)₂對Treg之活體外活性大約為單價DP47GS IgG-IL-2之6倍(表2及4)。因此，食蟹猴中之第一劑量為所測試DP47GS IgG-IL-2之最高劑量(36 µg/kg)之1/6。以6 µg/kg (n=4)投與之DP47GS IgG-(IL-2)₂大大增加了在治療之後14天仍遠高於正常值之循環Treg (圖33A)，使得在1週時恢復正常之Treg具有顯著及延長之pSTAT5a (圖33B)，且Treg數量大約增加3倍(圖33C)。將由DP47GS IgG-IL-2誘導之倍數變化(來自圖26，開放條)與6 µg/kg劑量之二價DP47GS IgG-(IL-2)₂ (陰影條) (圖33D)進行比較。類似於人類及食蟹猴全血分析，DP47GS IgG-(IL-2)₂展現增強之活體內效力，其超過IL-2/IgG分子中之2倍。

將額外劑量之二價DP47GS IgG-(IL-2)₂給予食蟹猴以評價其在極低劑量(2 µg/kg及0.7 µg/kg)下之活體內效應(圖34)。儘管2 µg/kg產生中等倍數變化(46%之平均值，介於20%至70%之間，n=8)，但0.7 µg/kg劑量對T細胞數具有較小效應(平均增加16%，n=3) (圖34A)。兩

種低劑量皆刺激Treg中之pSTAT5a增加(圖34B，各自n=3)，而對Teff/mem細胞pSTAT5a具有較小效應(圖34C，各自n=3)。

單價及二價野生型IL-2融合蛋白療法之主要效應及其增加食蟹猴中之Treg之能力呈現於圖35中。兩種形式之長效IgG-IL-2皆係Treg之強力誘導劑，其在活體內可使用pSTAT5a作為活化生物標記物且在此圖中作為循環Treg數量之倍數增加來追蹤。DP47GS IgG-(IL-2)₂ (藉由加倍IgG之C末端處之IL-2分子來達成其增強效力)較DP47GS IgG-IL-2具有劑量依賴性優良性。

食蟹猴T細胞子組中之FOXP3及CTLA-4之DNA去甲基化。

功能活性Treg能夠產生免疫阻抑細胞激素CTLA-4、IL-10及TGFβ且需要轉錄因子FOXP3之穩定表現。人類及食蟹猴Treg中之FOXP3表現依賴於FOXP3基因座內Treg特異性去甲基化區(TSDR)中10個CpG DNA甲基化位點之去甲基化。同樣，CTLA-4之表現及產生依賴於人類及食蟹猴CTLA-4基因座中之7個CpG DNA甲基化位點之去甲基化。因此，在使用以先前所展示顯著增加血液中之Treg數量之劑量及時間給予之DP47GS IgG-IL-2 (n=4 μg/kg、25 μg/kg，皮下)及DP47GS IgG-(IL-2)₂ (n=4 μg/kg、6 μg/kg，皮下)進行治療之前及之後，評價FOXP3及CTLA-4在各種CD4⁺ T細胞子組中之去甲基化狀態。在研究中僅使用生物幼稚成年雄性食蟹猴且其重量介於9.1 kg至10.9 kg之間。在初始基線血液收集之後3週投與治療且在4-5天後收集治療後血液。使用FACSAria™ (Becton Dickinson)將來自30 mL肝素化血液之PBMC分選至相關CD4⁺子組(包含Treg (CD4⁺CD25⁺CD127^{low})、記憶性T效應(CD4⁺CD45RA⁻)、幼稚T效應(CD4⁺CD45RA⁺)及CD4⁺CD25⁻CD127⁻細胞)中。

以100,000個細胞之等分試樣形式冷凍經分選細胞子組且以乾燥沈澱物形式儲存於-80°C下以容許一起處理所有試樣。將細胞沈澱物

解凍且萃取DNA並在單一步驟中使用Epitect Fast Lyse All套組 (Qiagen)遵循製造商說明書進行亞硫酸氫鹽處理。在含有10 μ l Multiplex PCR套組 (Qiagen)、6 μ l水、0.5 μ l FOXP3正向引物 tgtaaacgacggccagtTTTAGAAGTTGTATGGGGGATGTT (SEQ ID NO: 54)、0.5 μ l FOXP3反向引物 caggaaacagctatgaccAAAATATCT ACCCTCTTCTCTTCCTC (SEQ ID NO: 55)、0.5 μ l CTLA-4正向引物 tgtaaacgacggccagtGGGTTTGGTTATGAAGGAGTA TGA (SEQ ID NO: 56)及0.5 μ l CTLA-4反向引物 caggaaacagctatgaccTTCACCTAATTTCCACTAAAAATACCC (SEQ ID NO: 57)之20 μ l第一輪雙重PCR中使用5 ng (2 μ l) DNA亞硫酸氫鹽。第一輪PCR循環為：在95°C下15分鐘，隨後係在95°C下30秒、在60°C下90秒及在72°C下60秒之20個循環，隨後係在72°C下10分鐘。使用AMPure XP珠粒 (Becton Coulter)根據製造商說明書純化PCR產物，且在20 μ l水中洗脫。實施第二輪PCR，其經由15 μ l含有7.5 μ l Multiplex PCR套組 (Qiagen)、6.5 μ l第一輪PCR產物及1 μ l指數引物之PCR添加向每一試樣之開頭添加獨特指數序列。第二輪PCR循環條件為：在95°C下15分鐘，隨後係在95°C下30秒、在54°C下90秒及在72°C下60秒之7個循環，隨後係在72°C下5分鐘。使用AMPure XP珠粒純化PCR產物且在15 μ l水中洗脫，且使用4 μ l利用Shimadzu MultiNA來量化PCR產物之量。彙集等莫耳濃度之每一試樣以製備測序文庫，使用Kapa Illumina文庫量化套組進行量化。使用Illumina MiSeq利用v3試劑及2 $\times$ 300 bp成對試驗對文庫進行測序。使用bespoke python腳本對測序數據實施解多工且使用Cutadapt程式去除測序銜接子。使用FLASH合併正向及反向讀數且提取每一甲基化位點之序列。

使用DP47GS IgG-IL-2及DP47GS IgG-(IL-2)₂治療食蟹猴誘導所治療所有動物之血液中之Treg數量發生實質性增加，此類似於在使用

相同治療方案之前所看到者(圖33及35)。重要的是，在使用DP47GS IgG-IL-2及DP47GS IgG-(IL-2)₂治療後Treg之快速及明顯增加並不不利地影響或減小FOXP3 (圖36，頂組)或CTLA-4 (圖36，底組)之去甲基化狀態。在兩種分子中看到類似結果且DP47GS IgG-(IL-2)₂之數據展示於圖36中。FOXP3及CTLA-4之去甲基化狀態未受治療影響且並未由其減小指示，儘管絕對數量發生實質性增加，但所有Treg維持其天然成熟功能免疫阻抑表型。非人類靈長類動物中之該等Treg FOXP3及CTLA-4去甲基化結果表明，在人類中使用低劑量長效IgG-(IL-2)₂樣分子進行治療應能夠增加完全功能成熟Treg之數量，此繼而校正人類自體免疫疾病以及其他慢性免疫介導之慢性發炎性疾病中存在之免疫調節不平衡。

食蟹猴中之DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之藥物動力學

在生物幼稚食蟹猴中評估DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之PK性質(圖37)。向猴(n=2/劑量)經靜脈內(iv)及經皮下(sc)注射存於含有0.5%食蟹猴血清之PBS中之30 µg/kg或100 µg/kg無菌DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂且在注射之後之不同時間(自30分鐘至14天)實施取血。如先前所闡述在食蟹猴血漿試樣中評價人類IL-2。分析中之使用食蟹猴血漿之檢測量為0.05 ng/mL IL-2。在治療之前獲取之食蟹猴血漿並無可檢測IL-2(由此< 0.05 ng/mL)。

與僅可在48至72小時時檢測血液濃度之野生型融合蛋白之PK (圖25)不同，在來自所有動物之食蟹猴血漿中於至14天之所有時間點使用靜脈內(圖37A)及皮下(圖37B)投與途徑檢測DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂。血漿濃度在前二至三天與劑量成正比且與野生型IL-2融合分子相比顯示延長半衰期。

作為IL-2暴露之活體內生物標記物，量測可溶性CD25 (sCD25, IL-2RA)之血漿濃度(圖37C)。在夾心式免疫分析中使用捕獲

(MAB623, R&D Systems)及生物素化檢測(BAF223, R&D Systems)抗體、使用Eu⁺⁺偶聯鏈黴抗生物素且使用已知與食蟹猴sCD25交叉反應之用於人類sCD25之單株抗體試劑來檢測結合sCD25。在DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂投與之後之sCD25增加係劑量依賴性且存在於第1天至第7天之間，在第8天恢復正常含量。

使用DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之食蟹猴中之Treg誘導

在活體內使用野生型DP47GS IgG-IL-2及DP47GS IgG-(IL-2)₂治療之食蟹猴中之先前所闡述測試呈現，Treg之絕對數量具有2至4倍之劑量依賴性增加(分別為圖26及33)，此反映了其在人類全血分析中之活體外活性，亦即6至9倍活體外差異(表2及3)。在人類全血中損失活體外效力下(表3)，選擇30 µg/kg及100 µg/kg之活體內劑量用於DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂。類似於先前測試，藉由靜脈內或皮下途徑注射DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂ (其中個別劑量係基於體重)且經調配以用於以含有0.5%無菌正常食蟹猴血清之pH 7.2無菌PBS之媒劑進行注射(n=2/劑量及注射途徑)。在治療之前(第-4及-5天)、在即將治療之前(第0天)及在治療後不同時間(第1-14天)收集血樣且測試血液學變化(CBC及分類)以及先前所闡述之細胞表面及細胞內標記物。

總CD4⁺ Treg、CD4⁺記憶性Treg、CD4⁺幼稚Treg及CD8⁺ FOXP3⁺ Treg之增加以絕對細胞數/ml血液(圖38A及38B)或總CD4⁺或CD8⁺ T細胞之%(圖38C及38D) 展示為時間依賴性反應。

在100 µg/kg之後總CD4⁺ Treg之數量自90,000/ml增加至810,000/ml (9倍)且佔總CD4⁺ T細胞之百分比自4.2%增加至26% (6.2倍)，且在第14天時仍有所升高。在30 µg/kg下，總CD4⁺ Treg自62,000/ml增加至447,000/ml (7.2倍)且佔總CD4⁺細胞之百分比自4.5%增加至16.7% (3.7倍)。

在100 µg/kg下，記憶性Treg之數量自42,000/ml增加至536,000/ml

(12.8倍)且佔總CD4⁺ T細胞之百分比自2%增加至17.4% (8.7倍)。在30 µg/kg下，記憶性Treg自51,000/ml增加至280,000/ml (5.5倍)且佔總CD4⁺ T細胞之百分比自2.3%增加至10.5% (4.6倍)。

在100 µg/kg下，幼稚Treg之數量自35,000/ml增加至272,000/ml (7.8倍)且佔總CD4⁺ T細胞之百分比自2%增加至8.6% (4.3倍)。在30 µg/kg下，幼稚Treg自46,000/ml增加至166,000/ml (3.6倍)且佔總CD4⁺ T細胞之百分比自2.2%增加至6.2% (2.8倍)。

在投與100 µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之後，CD8⁺FOXP3⁺ Treg自16,000/ml下之稀少細胞類型增加至183,000/ml (11.4倍)且佔總CD8⁺ T細胞之百分比自0.7%增加至7.8% (11.1倍)。在30 µg/kg劑量之DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂下，總CD8⁺ Treg自17,000/ml增加至101,000/ml (5.9倍)且佔總CD8⁺ T細胞之百分比自0.5%增加至4.3% (8.6倍)。在100 µg/kg或30 µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之後，CD4⁺記憶性Teff細胞並無治療相關性增加(圖39A)；實際上，在第4天之降低百分比可能係由於CD4⁺ Treg在該時間下大大增加。在30 µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之後，CD4⁺CD25^{hi}記憶性Teff細胞不變，但在第4天時升高1.6倍且在第7-10天時恢復基線(圖39B)。

使用DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂誘導食蟹猴中之pSTAT5a、CD25及Ki-67

如先前所闡述，IL-2治療之活體內細胞特異性係關鍵參數且已證實，可藉由量測在投藥之後於不同時間獲取之血液中之離體pSTAT5a、細胞表面CD25及細胞內Ki-67來監測活體內細胞子組活化。

圖40A及40B中之結果展示，在使用DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂治療後CD4⁺及CD8⁺ Treg具有優先pSTAT5a誘導及延長之pSTAT5a信號傳導反應；自第1天至第4天藉由100 µg/kg及30 µg/kg維持最大反應，

且在第7天恢復基線。CD4⁺CD25^{hi}記憶性Teff具有反應(在第1天具有約半最大反應)且在第4天時恢復正常。所測試之所有其他細胞類型皆展示在治療之後具有較小或並無pSTAT5a誘導。

細胞表面CD25之增加係源於IL-2活化且係活體內活化之敏感性生物標記物。在使用100 µg/kg及30 µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂進行治療之後不久，在CD4⁺記憶性及幼稚Treg以及CD8⁺ FOXP3⁺ Treg中優先增加CD25 (圖41A、41B)。CD4⁺記憶性及幼稚Treg之CD25反應在第4天出現峰值且在第7天恢復基線，而CD8⁺ FOXP3⁺ Treg中之CD25升高在第10-14天中一直持續。

在使用野生型IL-2融合蛋之測試中展示，Ki-67係用於在活體內開始增殖之細胞之敏感性細胞內標記物且係用於食蟹猴中IL-2誘導之活化的敏感性生物標記物。對100 µg/kg DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂之反應展示，80-90%之CD4⁺及CD8⁺ Treg變為Ki-67⁺ (圖42A)，而在30 µg/kg之後60-90%變為Ki-67⁺ (圖42B)。如所展示，所測試之其他細胞子組之反應性小於Treg。

為獲得使用新穎經改造IL-2分子增加Treg數量之倒數第二個活體內效應，將所有食蟹猴劑量轉化成皮莫耳/kg，從而使得不論分子量如何亦進行直接對比；以CD4⁺ Treg之最大增加及總CD4⁺ T細胞之%之形式來並行比較劑量依賴性反應(圖43)。儘管與野生型融合蛋白相比損失活體外效力，但DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂誘導格外大之食蟹猴Treg增加，此或許部分地係由於其在靜脈內及皮下投與後增加了全身性暴露。

源於活體內IL-2投與之嗜酸性球增多症

在每天以 1×10^6 至 4.5×10^6 IU/人之劑量給予時，人類中之Proleukin刺激嗜酸性球增多症。在食蟹猴中，在使用高劑量Proleukin或單一226皮莫耳/kg劑量DP47GS IgG-IL-2重複治療之後於100%之動

物中看到類似嗜酸性球增加(圖44)。圖44中之結果代表每一所測試動物(在測試之前獲取動物之純系基線：n=44及n=30)及各種IL-2治療組(n=5-9)，不論嗜酸性球數係正常或升高。與Proleukin及DP47GS IgG-IL-2之效應顯著不同的是，DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂在170皮莫耳/kg及570皮莫耳/kg (分別為30 µg/kg及100 µg/kg)之活體內劑量下實際上缺乏對嗜酸性球之效應。鑒於由該等不同治療誘導之Treg擴增程度，DP47GS IgG-(IL-2N88D)₂誘導全身性嗜酸性球增多症之此缺乏較為顯著(比較於圖43中)。

DP47GS IgG-IL-2之活體內治療阻抑小鼠中之免疫反應

在初步研究中觀察到，4000 IU DP47GS IgG-IL-2劑量在活體內活化小鼠FOXP3⁺調節性T細胞；然後使用此劑量評價其阻抑小鼠中之經典T依賴性免疫反應(亦即延遲型超敏反應(圖45)及IgG抗KLH反應(圖46))之能力。

經靜脈內使用綿羊紅血球(srbc)對NOD小鼠及C57BL/6小鼠(n=7)實施免疫且在3天後使用srbc濃注於單一後足中激發以誘導延遲型超敏反應(DTH)。在激發之後一天，使用CO₂對小鼠實施無痛處死且切下爪並稱重。以與非免疫小鼠相比之爪重量變化(Δ爪重量)之形式來展示DTH反應之等級。在srbc免疫之前3天及srbc免疫當天以4000 IU/小鼠經皮下給予DP47GS IgG-IL-2且媒劑係無菌PBS pH 7.2。統計學顯著性源於GraphPad Prism中之Mann Whitney測試。

在綿羊紅血球免疫之前三天及綿羊紅血球免疫當天投用DP47GS IgG-IL-2會阻抑對綿羊血細胞激發之後續延遲型超敏反應51% (在NOD小鼠中，圖45A；p=0.0023)及38% (在C57BL/6小鼠中，圖45B；p=0.002)。作為陽性對照免疫阻抑劑之小鼠CTLA-4-Ig將DTH反應抑制至與DP47GS IgG-IL-2類似之程度。

DP47GS IgG-IL-2亦能夠阻抑C57BL/6 (78%抑制，p=0.0007，圖

46A)及 NOD (67%抑制， $p=0.004$ ，圖46B)小鼠中之KLH特異性IgG反應。對於此實驗而言，經腹腔腔內使用100 μg 如由製造商所推薦不含佐劑之人類疫苗級KLH (Stellar)來對健康幼小C57BL/6小鼠($n=7-10$)及NOD小鼠($n=13-14$)實施免疫。DP47GS IgG-IL-2治療由使用4000 IU/小鼠SC在免疫之日開始之1個(NOD)或2個(C57BL/6)每週皮下治療組成。在免疫之後7天(NOD)及21天(C57BL/6)，收集血液且藉由ELISA量測血清KLH特異性IgG反應。

DP47GS IgG-IL-2阻抑活體內免疫反應之能力證實了以下假設：由低劑量IL-2誘導之調節性T細胞活化產生調介免疫反應減小之功能調節性T細胞。

* * *

儘管已出於理解清楚之目的藉由舉例說明及實例相當詳細地對上述發明進行闡述，但說明及實例不應解釋為限制本發明範圍。本文所引用所有專利及科學文獻之揭示內容之全部內容以引用方式明確併入本文中。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司
<120> 介白素-2 融合蛋白及其用途
<130> 31142
<150> US 61/936564
<151> 2014-02-06
<160> 66
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 133
<212> PRT
<213> 智人
<400> 1

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

<210> 2
<211> 399
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 野生型人類 IL-2

<400> 2
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
acatttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcacita 240
agaccaggg acttaatcag caataatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
acaacattca tgtgtgaata tgcigatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
tggattacct ttgtcaaag catcatctca acactgact 399

<210> 3
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 野生型人類 IL-2 (C125A)

<400> 3
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 4
<211> 399
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 野生型人類 IL-2 (C125A) (1)

<400> 4
gctcctacat cctccagcac caagaaaacc cagctccagc tggaacatct cctgctggat 60
ctgcagatga tcctgaacgg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac ccggatgctg 120
accttcaagt tctacatgcc caagaaggcc accgagctga aacatctgca gtgcctggaa 180
gaggaactga agcctctgga agaggtgctg aacctggccc agtccaagaa ctccacctg 240
aggcctcggg acctgatctc caacatcaac gtgatcgtgc tggaactgaa gggctccgag 300
acaaccttca tgtgcgagta cgccgacgag acagctacca tcgtggaatt tctgaaccgg 360
tggatcacct tcgccagtc catcatctcc accctgacc 399

<210> 5
<211> 399
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 野生型人類 IL-2 (C125A) (2)

<400> 5
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcatit actgctggat 60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120

acatttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240
agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
tggattacct ttgccccaaag catcatctca acactgact 399

<210> 6
<211> 399
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 野生型人類 IL-2 (C125A) (3)

<400> 6
gctcctacta gcagctccac caagaaaacc cagctccagc tggaacatct gctgctggat 60
ctgcagatga tccitgaacgg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac ccggatgctg 120
accttcaagt tctacatgcc caagaaggcc accgaactga aacatctgca gtgcctggaa 180
gaggaactga agcctctgga agagggtgctg aacctggccc agagcaagaa cttccacctg 240
aggcccaggg acctgatcag caacatcaac gtgatcgtgc tggaactgaa gggcagcgag 300
acaaccttca tgtgcgagta cgccgacgag acagccacca tcgtggaatt tctgaaccgg 360
tggatcacct tcgcccagag catcatcagc acctgaca 399

<210> 7
<211> 399
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 野生型 IL-2 (C125A) (4)

<400> 7
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
acatttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240
agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360

tggattacct ttgcccaaag catcatctca acactgact

399

<210> 8
<211> 227
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 9
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47GS VH

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 10
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47GS VH

<400> 10
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggia gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagt 345

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47GS VL

<400> 11

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

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

<210> 12
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47GS VL

<400> 12
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagttg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccgt gacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 13
<211> 592
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47GS HC(Fc 凸起 ,P329G LALA)-IL2

<400> 13

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

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

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

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

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

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

Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu

500505510

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
515520525

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
530535540

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
545550555560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
565570575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
580585590

<210> 14
<211> 1776
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47GS HC(Fc 凸起 ,P329G LALA)-IL2

<400> 14

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaate ttgtgacaaa
actcacacat gccacacgtg ccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc

60120180240300360420480540600660720

ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgctg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagtca actgggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 960
gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
ccccgagaac cacagggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 1080
gtcagcctgt ggtgcctggg caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgtt ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtggcggcgg aggctccgga ggcggagggt ctggaggcgg aggctccgca 1380
cctacttcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440
cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500
tttaagtttt acatgccccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagt tctagaagaa 1560
gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tacttaaga 1620
cccagggact taatcagcaa tatcaacgta atagtcttg aactaaagg atctgaaaca 1680
acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

- <210> 15
- <211> 445
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> DP47GS HC(Fc孔洞 , P329G LALA)
- <400> 15

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

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

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

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

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

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

- <210> 16
- <211> 1335
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>

<223> DP47GS HC(Fc 孔洞, P329G LALA)

<400> 16

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctccggatt caccitttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct	120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtt gtgggtggtag cacatactac	180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc	300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgttag caccaagggc	360
ccctccgtgt tccccctggc cccagcagc aagagcacca gcggcggcac agccgtcttg	420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc	480
ctgacctccg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gttctggcct gtatagcctg	540
agcagcgtgg tcaccgtgcc ttctagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600
aaccacaagc ccagcaacac caaggaggac aagaagggtg agcccaagag ctgcgacaaa	660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttctc	720
ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg	780
gtgggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag	960
gtctccaaca aagccctcgg cgtccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
ccccgagaac cacagggtgt caccctgccc ccatcccggt atgagctgac caagaaccag	1080
gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
tccttcttcc tcgtgagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1320
ctgtctccgg gtaaa	1335

<210> 17

<211> 592

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> DP47GS HC (Fc wt, P329G LALA)-IL2

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

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

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

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
530 535 540

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

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

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

<210> 18
<211> 1776
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47GS HC (Fc wt, P329G LALA)-IL2

<400> 18
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggaatt caccttttagc agttatgcc	tgagctgggt cgcagaggt	120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta	gtggtag cacatactac	180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca	attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat	attactgtgc gaaaggcagc	300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct	cgagtgtag caccaagggc	360
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct	ctgggggcac agcggccctg	420
ggctgccctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg	tgtcgtggaa ctgaggcgcc	480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc gtcctacagt	cctcaggact ctactccctc	540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc	agacctacat ctgcaacgtg	600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg	agcccaaatc ttgtgacaaa	660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag	ggggaccgtc agtcttcctc	720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga	ccccgaggt cacatgcgtg	780
gtggtagcag tgagccacga agaccctgag gtcaagttca	actggtagct ggacggcgtg	840
gaggtgcata atgccaaagc aaagccgcgg gaggagcagt	acaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg	gcaaggagta caagtgcag	960
gtctccaaca aagccctcgg cgcacctc gagaaaacca	tctccaaagc caaagggcag	1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggt	atgagctgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg	acatcgccgt ggagtgggag	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc	ccgtgctgga ctccgacggc	1200
tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca	ggtggcagca ggggaacgtc	1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact	acacgcagaa gagcctctcc	1320
ctgtctccgg gtggcggcgg aggcctccgga ggcggagggt	ctggaggcgg aggcctccgca	1380
cctacttcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg	agcatttact gctggattta	1440
cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca	aactcaccag gatgctcaca	1500
tttaagtttt acatgcccga gaaggccaca gaactgaaac	atcttcagtg tctagaagaa	1560
gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa	gcaaaaactt tcaacttaaga	1620
cccagggact taatcagcaa tatcaacgta atagtctctg	aactaaaggg atctgaaaca	1680
acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg	tagaatttct gaacagatgg	1740

165170175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180185190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

195200205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210215

<210> 20

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DP47GS LC

<400> 20

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg cccccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacagggtca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc 300

caggggacca aagtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atcttggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 21

<211> 466

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類 IL-2R-β-Fc (孔洞)融合蛋白

<400> 21

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Ala Val Asn Gly Thr Ser Gln Phe Thr Cys
20 25 30

Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly
35 40 45

Ala Leu Gln Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg
50 55 60

Arg Trp Asn Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp
65 70 75 80

Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ala Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Thr
85 90 95

Val Asp Ile Val Thr Leu Arg Val Leu Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp
100 105 110

Arg Val Met Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu
115 120 125

Met Ala Pro Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys
130 135 140

Asn Ile Ser Trp Glu Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His
145 150 155 160

Leu Glu Phe Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu
165 170 175

Ala Pro Leu Leu Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu
180 185 190

Thr Leu Thr Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro
195 200 205

Leu Gln Gly Glu Phe Thr Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala

210

215

220

Phe Arg Thr Lys Pro Ala Ala Leu Gly Lys Asp Thr Gly Ala Gln Asp
225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 22
<211> 1401
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 IL-2R-β-Fc (孔洞)融合蛋白

<400> 22
atggacaatga ggggtccccgc tcagctcctg ggccctcctgc tgctctgggtt cccaggtgcc 60
agggtgtgcgg tgaatggcac ttcccagttc acatgcttct acaactcgag agccaacaic 120
tcctgtgtct ggagccaaga tggggctctg caggacactt cctgccaaagt ccatgcctgg 180
ccggacagac ggcgggtggaa ccaaacctgt gagctgtctc ccgtgagtca agcatcctgg 240
gcctgcaacc tgatcctcgg agccccagat tctcagaaac tgaccacagt tgacatcgtc 300
accctgaggg tgctgtgccg tgaggggggtg cgatggaggg tgatggccat ccaggacttc 360
aagccctttg agaaccttcg cctgatggcc cccatctccc tccaagttgt ccacgtggag 420
accacagat gcaacataag ctgggaaatc tccaagcct cccactactt tgaaagacac 480
ctggagttcg aggcccgga gctgtcccca ggccacacct gggaggaggc cccctgtctg 540
actctcaagc agaagcagga atggatctgc ctggagacgc tcaccccaaga caccagtat 600
gagtttcagg tgcgggtcaa gcctctgcaa ggcgagttca cgacctggag cccctggagc 660
cagccccctgg ccttcagaac aaagcctgca gcccttggga aggacaccgg agctcaggac 720
aaaactcaca catgccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 780
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 840
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900
gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020

aaggctctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccattctccaa agccaaaggg 1080
cagccccgag aaccacaggt gtgcacctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1140
caggtcagcc tctcgtgcgc agtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
tccctgtctc cgggtaaatg a 1401

<210> 23
<211> 492
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 IL-2R-γ-Fc (凸起)融合蛋白

<400> 23

Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu
1 5 10 15

Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly
20 25 30

Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp
35 40 45

Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val
50 55 60

Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro
65 70 75 80

Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn
85 90 95

Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr
100 105 110

Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe
115 120 125

Val	Val	Gln	Leu	Gln	Asp	Pro	Arg	Glu	Pro	Arg	Arg	Gln	Ala	Thr	Gln
	130					135					140				
Met	Leu	Lys	Leu	Gln	Asn	Leu	Val	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Glu	Asn	Leu
145					150					155					160
Thr	Leu	His	Lys	Leu	Ser	Glu	Ser	Gln	Leu	Glu	Leu	Asn	Trp	Asn	Asn
				165					170					175	
Arg	Phe	Leu	Asn	His	Cys	Leu	Glu	His	Leu	Val	Gln	Tyr	Arg	Thr	Asp
			180					185					190		
Trp	Asp	His	Ser	Trp	Thr	Glu	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Arg	His	Lys	Phe
		195					200					205			
Ser	Leu	Pro	Ser	Val	Asp	Gly	Gln	Lys	Arg	Tyr	Thr	Phe	Arg	Val	Arg
	210					215					220				
Ser	Arg	Phe	Asn	Pro	Leu	Cys	Gly	Ser	Ala	Gln	His	Trp	Ser	Glu	Trp
225					230					235					240
Ser	His	Pro	Ile	His	Trp	Gly	Ser	Asn	Thr	Ser	Lys	Glu	Asn	Pro	Phe
				245					250					255	
Leu	Phe	Ala	Leu	Glu	Ala	Gly	Ala	Gln	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
			260					265					270		
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
		275					280					285			
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
	290					295					300				
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
305					310					315					320
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
				325					330					335	
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr

340345350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
355360365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
370375380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
385390395400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
405410415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
420425430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
435440445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
450455460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
465470475480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485490

<210> 24
<211> 1479
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 IL-2R-γ-Fc (凸起)融合蛋白

<400> 24

atgttgaagc catcattacc attcacatcc ctcttattcc tgcagctgcc cctgctggga60

gtggggctga acacgacaat tctgacgccc aatgggaatg aagacaccac agctgatttc120

ttcctgacca ctatgcccac tgactccctc agtgtttcca ctctgcccct cccagaggtt180

cagtgttttg tgttcaatgt cgagtacatg aattgcactt ggaacagcag ctctgagccc240

cagcctacca accctactct gcattattgg tacaagaact cggataatga taaagtccag	300
aagtgcagcc actatctatt ctctgaagaa atcacttctg gctgtcagtt gcaaaaaaag	360
gagatccacc tctaccaaac atttgttggt cagctccagg acccacggga acccaggaga	420
caggccacac agatgctaaa actgcagaat ctgggtgatcc cctgggctcc agagaaccta	480
acacttcaca aactgagtga atcccagcta gaactgaact ggaacaacag attcttgaac	540
cactgtttgg agcacttggg gcagtaccgg actgactggg accacagctg gactgaacaa	600
tcagtggatt atagacataa gtctctcttg cctagtgtgg atgggcagaa acgctacacg	660
tttcgtgttc ggagccgctt taaccacctc tgtggaagtg ctcagcattg gagtgaatgg	720
agccacccaa tccactgggg gagcaatact tcaaaagaga atcctttcct gtttgcattg	780
gaagccggag ctacaggaaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg	840
gggggaccgt cagctcttcc cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg	900
acccctgagg tcacatgcgt ggtgggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	960
aactggtacg tggacggcgt ggagggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag	1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctacaccgtc tgcaccagga ctggctgaat	1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	1140
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg	1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg tgggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	1320
cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	1380
agggtggcagc aggggaacgt ctctctatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga	1479

- <210> 25
- <211> 219
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 人類 IL-2R α 亞單位+ Avi 標籤+ His 標籤
- <400> 25

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1	5	10	15
Val His Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala	20	25	30
Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu	35	40	45
Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu	50	55	60
Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys	65	70	75
Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro	85	90	95
Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln	100	105	110
Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro	115	120	125
Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln	130	135	140
Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly	145	150	155
Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr	165	170	175
Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln	180	185	190
Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp	195	200	205
His Glu Ala Arg Ala His His His His His	210	215	

<210> 26
<211> 660
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類 IL-2R α 亞單位+ Avi 標籤+ His 標籤

<400> 26
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgag 60
ctctgtgacg atgacccgcc agagatccca cacgccacat tcaaagccat ggcctacaag 120
gaagggaacca tgttgaactg tgaatgcaag agaggtttcc gcagaataaa aagcgggtca 180
ctctatatgc tctgtacagg aaactctagc cactcgtcct gggacaacca atgtcaatgc 240
acaagctctg ccactcggaa cacaacgaaa caagtgcacac ctcaacctga agaacagaaa 300
gaaaggaaaa ccacagaaat gcaaagtcca atgcagccag tggaccaagc gagccttcca 360
ggtcactgca gggaacctcc accatgggaa aatgaagcca cagagagaat ttatcatttc 420
gtgggtggggc agatggttta ttatcagtgc gtccagggat acagggtctt acacagaggt 480
cctgctgaga gcgtctgcaa aatgaccacac gggaagacaa ggtggacca gccccagctc 540
atatgcacag gtgtcgacga acagttatat tttcagggcg gctcaggcct gaacgacatc 600
ttcgaggccc agaagatcga gtggcacgag gctcgagctc accaccatca ccatcactga 660

<210> 27
<211> 473
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠類 IL-2R- β -Fc (孔洞)融合蛋白

<400> 27
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Phe Pro Leu Leu Leu Trp Phe Pro Gly Ala Arg Cys Ala Val Lys
20 25 30
Asn Cys Ser His Leu Glu Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Val Ser
35 40 45
Cys Met Trp Ser His Glu Glu Ala Leu Asn Val Thr Thr Cys His Val

50

55

60

His Ala Lys Ser Asn Leu Arg His Trp Asn Lys Thr Cys Glu Leu Thr
65 70 75 80

Leu Val Arg Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ser Phe
85 90 95

Pro Glu Ser Gln Ser Leu Thr Ser Val Asp Leu Leu Asp Ile Asn Val
100 105 110

Val Cys Trp Glu Glu Lys Gly Trp Arg Arg Val Lys Thr Cys Asp Phe
115 120 125

His Pro Phe Asp Asn Leu Arg Leu Val Ala Pro His Ser Leu Gln Val
130 135 140

Leu His Ile Asp Thr Gln Arg Cys Asn Ile Ser Trp Lys Val Ser Gln
145 150 155 160

Val Ser His Tyr Ile Glu Pro Tyr Leu Glu Phe Glu Ala Arg Arg Arg
165 170 175

Leu Leu Gly His Ser Trp Glu Asp Ala Ser Val Leu Ser Leu Lys Gln
180 185 190

Arg Gln Gln Trp Leu Phe Leu Glu Met Leu Ile Pro Ser Thr Ser Tyr
195 200 205

Glu Val Gln Val Arg Val Lys Ala Gln Arg Asn Asn Thr Gly Thr Trp
210 215 220

Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Thr Phe Arg Thr Arg Pro Ala Asp Pro
225 230 235 240

Met Lys Glu Gly Ala Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
245 250 255

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
305 310 315 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
420 425 430

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 28
<211> 1422
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 鼠類 IL-2R-β-Fc (孔洞)融合蛋白

<400> 28

```

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggccctcctgc tgctctgggt ccccccctctg      60
ctgctctgggt tcccagggtgc cagggtgtgca gtgaaaaact gttcccatct tgaatgcttc      120
tacaactcaa gagccaatgt ctcttgcatg tggagccatg aagaggctct gaatgtcaca      180
acctgccacg tccatgccaa gtctgaacctg cgacactgga acaaaacctg tgagctaaact      240
cttgtgaggc aggcatcctg ggccctgcaac ctgacccctg ggtcgttccc agagtcccag      300
tcaactgacct ccgtggacct ccttgacata aatgtgggtg gctgggaaga gaagggttgg      360
cgtagggtaa agacctgcga cttccatccc ttgacaacc ttgcctgggt ggccccctcat      420
tccctccaag ttctgcacat tgatacccag agatgtaaca taagctggaa ggtctcccag      480
gtctctcact acattgaacc atacttgga tttgaggccc gtagacgtct tctggggccac      540
agctgggagg atgcatccgt attaaagctc aagcagagac agcagtggtc cttcttggag      600
atgctgatcc ctagtacctc atatgaggtc cagggtgagg tcaaagctca acgaaacaat      660
accgggacct ggagtccctg gagccagccc ctgaccttcc ggacaaggcc agcagatccc      720
atgaaggagg gagctcagga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc      780
ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc      840
cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaag      900
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag      960
cagtacaaca gcacgtaccg tgttggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg      1020
aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa      1080
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtgcaccct gccccatcc      1140
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctctcgtgcg cagtcaaagg ctctctatccc      1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg      1260
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttccctcgtga gcaagctcac cgtggacaag      1320
agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac      1380
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga      1422

```

<210> 29
<211> 500
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠類 IL-2R-γ-Fc (凸起)融合蛋白

<400> 29

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro Gly Ala Arg Cys Trp Ser Ser
20 25 30

Lys Val Leu Met Ser Ser Ala Asn Glu Asp Ile Lys Ala Asp Leu Ile
35 40 45

Leu Thr Ser Thr Ala Pro Glu His Leu Ser Ala Pro Thr Leu Pro Leu
50 55 60

Pro Glu Val Gln Cys Phe Val Phe Asn Ile Glu Tyr Met Asn Cys Thr
65 70 75 80

Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro Gln Ala Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr
85 90 95

Arg Tyr Lys Val Ser Asp Asn Asn Thr Phe Gln Glu Cys Ser His Tyr
100 105 110

Leu Phe Ser Lys Glu Ile Thr Ser Gly Cys Gln Ile Gln Lys Glu Asp
115 120 125

Ile Gln Leu Tyr Gln Thr Phe Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Gln Lys
130 135 140

Pro Gln Arg Arg Ala Val Gln Lys Leu Asn Leu Gln Asn Leu Val Ile
145 150 155 160

Pro Arg Ala Pro Glu Asn Leu Thr Leu Ser Asn Leu Ser Glu Ser Gln
165 170 175

Leu Glu Leu Arg Trp Lys Ser Arg His Ile Lys Glu Arg Cys Leu Gln

190

Tyr Leu Val Gln Tyr Arg Ser Asn Arg Asp Arg Ser Trp Thr Glu Leu
195 200 205

Ile Val Asn His Glu Pro Arg Phe Ser Leu Pro Ser Val Asp Glu Leu
210 215 220

Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg Tyr Asn Pro Ile Cys Gly
225 230 235 240

Ser Ser Gln Gln Trp Ser Lys Trp Ser Gln Pro Val His Trp Gly Ser
245 250 255

His Thr Val Glu Glu Asn Pro Ser Leu Phe Ala Leu Glu Ala Gly Ala
260 265 270

Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
275 280 285

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
290 295 300

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
305 310 315 320

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
325 330 335

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
340 345 350

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
355 360 365

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
370 375 380

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
385 390 395 400

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
405 410 415

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
420 425 430

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
435 440 445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
450 455 460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
465 470 475 480

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
485 490 495

Ser Pro Gly Lys
500

<210> 30
<211> 1503
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠類 IL-2R-γ-Fc (凸起)融合蛋白

<400> 30
atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctgggt cccctcctg 60
ctgctctggt tcccaggtgc cagggtgttg agttccaagg tctcatgtc cagtgcgaat 120
gaagacatca aagctgattt gatcctgact tctacagccc ctgaacacct cagtgtcct 180
actctgcccc ttccagaggt tcagtgttt gtgttcaaca tagagtacat gaattgcact 240
tggaatagca gttctgagcc tcaggcaacc aacctcacgc tgcaactatag gtacaaggta 300
tctgataata atacattcca ggagtgcagt cactatttgt tctccaaaga gattacttct 360
ggctgtcaga tacaaaaaga agatatccag ctctaccaga catttgttgt ccagctccag 420
gacccccaga aaccccagag gcgagctgta cagaagctaa acctacagaa tcttgtgatc 480
ccacgggctc cagaaaatct aacactcagc aatctgagtg aatcccagct agagctgaga 540

tggaagca gacatattaa agaacgctgt ttacaatact tggcagta ccggagcaac 600
agagatcgaa gctggacgga actaatagtg aatcatgaac ctagattctc cctgcctagt 660
gtggatgagc tgaaacggta cacatttcgg gttcggagcc gctataaccc aatctgtgga 720
agtctcaac agtggagtaa atggagccag cctgtccact gggggagtca tactgtagag 780
gagaatcctt ccttgtttgc actggaagct ggagctcagg aaaaaactca cacatgccca 840
ccgtgcccag caccitgaact cctgggggga ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc 900
aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 960
cacgaagacc ctgagggtcaa gtccaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1020
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1080
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc 1140
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200
gtgtacaccc tgccccatg ccgggatgag ctgaccaaga accagggtcag cctgtggtgc 1260
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320
gagaacaact acaagaccac gccctccgtg ctggactccg acggctcctt ctctctctac 1380
agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1440
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1500
tga 1503

<210> 31
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠類 IL-2R α 亞單位+ Avi 標籤+ His 標籤

<400> 31

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Leu Cys Leu Tyr Asp Pro Pro Glu Val Pro Asn Ala
20 25 30

Thr Phe Lys Ala Leu Ser Tyr Lys Asn Gly Thr Ile Leu Asn Cys Glu
35 40 45

Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Leu Lys Glu Leu Val Tyr Met Arg Cys
50 55 60

Leu Gly Asn Ser Trp Ser Ser Asn Cys Gln Cys Thr Ser Asn Ser His
65 70 75 80

Asp Lys Ser Arg Lys Gln Val Thr Ala Gln Leu Glu His Gln Lys Glu
85 90 95

Gln Gln Thr Thr Thr Asp Met Gln Lys Pro Thr Gln Ser Met His Gln
100 105 110

Glu Asn Leu Thr Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Lys His Glu
115 120 125

Asp Ser Lys Arg Ile Tyr His Phe Val Glu Gly Gln Ser Val His Tyr
130 135 140

Glu Cys Ile Pro Gly Tyr Lys Ala Leu Gln Arg Gly Pro Ala Ile Ser
145 150 155 160

Ile Cys Lys Met Lys Cys Gly Lys Thr Gly Trp Thr Gln Pro Gln Leu
165 170 175

Thr Cys Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Gly Leu Asn
180 185 190

Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ala Arg Ala His
195 200 205

His His His His His
210

- <210> 32
- <211> 642
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 鼠類 IL-2R α 亞單位+ Avi 標籤+ His 標籤
- <400> 32

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgaa 60
ctgtgtctgt atgaccacc cggaggtcccc aatgccacat tcaaagccct ctctacaag 120
aacggcacca tcctaaactg tgaatgcaag agagggttcc gaagactaaa ggaattggtc 180
tatatgcgtt gcttaggaaa ctccctggagc agcaactgcc agtgcaccag caactcccat 240
gacaaatcga gaaagcaagt tacagctcaa cttgaacacc agaaagagca acaaaccaca 300
acagacatgc agaagccaac acagtctatg caccaagaga accttacagg tcaactgcagg 360
gagccacctc cttggaaaca tgaagattcc aagagaatct atcatttcgt ggaaggacag 420
agtgttact acgagtgtat tccgggatac aaggctctac agagaggtcc tgctattagc 480
atctgcaaga tgaagtgtgg gaaaacgggg tggactcagc cccagctcac atgtgtcgac 540
gaacagttat attttcaggg cggctcaggc ctgaacgaca tcttcgaggc ccagaagatc 600
gagtggcacg aggctcgagc tcaccaccat caccatcact ga 642

<210> 33
<211> 480
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 食蟹猴 IL-2R-β-Fc (凸起)融合蛋白+ Avi 標籤

<400> 33

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Arg Phe Thr Cys Phe Tyr Asn
20 25 30

Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly Ala Leu Gln
35 40 45

Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg Arg Trp Asn
50 55 60

Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn
65 70 75 80

Leu Ile Leu Gly Thr Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Ala Val Asp Ile
85 90 95

Val Thr Leu Arg Val Met Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp Arg Met Met
100 105 110

Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu Met Ala Pro
115 120 125

Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys Asn Ile Ser
130 135 140

Trp Lys Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His Leu Glu Phe
145 150 155 160

Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu Ala Pro Leu
165 170 175

Met Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu Thr Leu Thr
180 185 190

Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro Leu Gln Gly
195 200 205

Glu Phe Thr Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala Phe Arg Thr
210 215 220

Lys Pro Ala Ala Leu Gly Lys Asp Thr Gly Ala Gln Asp Lys Thr His
225 230 235 240

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

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

305310315320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325330335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340345350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355360365

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
370375380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385390395400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405410415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420425430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435440445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser
450455460

Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
465470475480

<210> 34
<211> 1443
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 食蟹猴 IL-2R-β-Fc (凸起)融合蛋白+ Avi 標籤

<400> 34
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgcg 60
gtcaacggca cttcccggtt cacatgcttc tacaactcga gagccaacat ctctgtgtc 120

tggagccaag atggggctct gcaggacact tcctgccaag tccacgcctg gccggacaga	180
cggcgggtgga accaaacctg tgagctgctc cctgtgagtc aagcatcctg ggcctgcaac	240
ctgatcctcg gaaccccaga ttctcagaaa ctgaccgcag tggatatcgt caccctgagg	300
gtgatgtgcc gtgaaggggt gcgatggagg atgatggcca tccaggactt caaacccctt	360
gagaaccttc gcctgatggc ccccatctcc ctccaagtcg tccacgtgga gaccacaga	420
tgcaacataa gcttgaaaat ctcccaagcc tcccactact ttgaaagaca cctggagttt	480
gaggcccgga cgctgtcccc aggccacacc tgggaggagg ccccccctgat gaccctcaag	540
cagaagcagg aatggatctg cctggagacg ctaccccag acaccagta tgagtctcag	600
gtgcgggtca agcctctgca aggcgagttc acgacctgga gcccctggag ccagcccctg	660
gccttcagga caaagcctgc agcccttggg aaggacaccg gagctcagga caaaactcac	720
acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc	780
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccccctg aggtcacatg cgtggtggtg	840
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg	900
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc	960
gtcctcaccc tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc	1020
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga	1080
gaaccacagg tgtacacct gccccatgc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc	1140
ctgtggtgcc tgggtcaaagg ctctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat	1200
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc	1260
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca	1320
tgtccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct	1380
ccgggtaaat ccggaggcct gaacgacatc ttcgaggccc agaagattga atggcacgag	1440
tga	1443

<210> 35
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 食蟹猴 IL-2R- γ -Fc (孔洞)融合蛋白

<400> 35

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly Asn Glu Asp
20 25 30

Ala Thr Thr Asp Phe Phe Leu Thr Ser Met Pro Thr Asp Ser Leu Ser
35 40 45

Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val Phe Asn Val
50 55 60

Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro Gln Pro Thr
65 70 75 80

Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn Asp Lys Val
85 90 95

Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr Ser Gly Cys
100 105 110

Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe Val Val Gln
115 120 125

Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln Met Leu Lys
130 135 140

Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu Thr Leu Arg
145 150 155 160

Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn Arg Phe Leu
165 170 175

Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp Trp Asp His
180 185 190

Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe Ser Leu Pro
195 200 205

Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg Phe
210 215 220

Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp Ser His Pro
225 230 235 240

Ile His Trp Gly Ser Asn Ser Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala
245 250 255

Leu Glu Ala Gly Ala Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
260 265 270

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
275 280 285

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
290 295 300

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
305 310 315 320

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
325 330 335

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
340 345 350

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
355 360 365

Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
370 375 380

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
385 390 395 400

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
405 410 415

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
420 425 430

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
435 440 445

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
450 455 460

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
465 470 475 480

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485

<210> 36
<211> 1470
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 食蟹猴 IL-2R-γ-Fc (孔洞)融合蛋白

<400> 36
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccctg 60
aacacgacaa ttctgacgcc caatgggaat gaagacgcca caactgattt ctctctgacc 120
tctatgcccc ctgactccct cagtgtttcc actctgcccc tcccagaggt tcagtgtttt 180
gtgttcaatg tcgagtacat gaattgcact tggaacagca gctctgagcc ccagcctacc 240
aacctcactc tgcattattg gtacaagaat tcggataatg ataaagtcca gaagtgcagc 300
cactatctat tctctgaaga aatcacttct ggctgtcagt tgcaaaaaaa ggagatccac 360
ctctacaaaa cgtttgttgt tcagctccag gaccacggg aaccaggag acaggccaca 420
cagatgctaa aactgcagaa tctgggtgat ccttgggctc cggagaacct aacacttcgc 480
aaactgagtg aatcccagct agaactgaac tggaacaaca gattcttgaa ccaactgttg 540
gagcacttgg tgcagtaccg gactgactgg gaccacagct ggactgaaca atcagtggat 600
tatagacata agttctcctt gcctagtgtg gatgggcaga aacgctacac gtttcgtgtc 660
cggagccgct ttaaccact ctgttgaagt gctcagcatt ggagtgaatg gagccacca 720
atccactggg ggagcaatag ttcaaaagag aatcctttcc tgtttgcatt ggaagccgga 780
gctcaggaca aaactcacac atgccaccg tgccagcac ctgaactcct ggggggaccg 840
tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctcccg gacccctgag 900

gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacccig aggtcaagtt caactggtac 960
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1020
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1080
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1140
gccaaagggc agccccgaga accacagggtg tgcacccigc ccccatcccg ggatgagctg 1200
accaagaacc aggtcagcct ctctgtcgca gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1260
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1320
gactccgacg gctccttctt cctcgtgagc aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag 1380
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1440
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1470

<210> 37
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 食蟹猴 IL-2R α 亞單位+ Avi 標籤+ His 標籤

<400> 37

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Lys Ile Thr His Ala Thr Phe Lys
20 25 30

Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg
35 40 45

Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Pro Tyr Met Leu Cys Thr Gly
50 55 60

Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser
65 70 75 80

Ala Ala Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln
85 90 95

Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Gln Met Gln Leu Ala Asp
100 105 110

Gln Val Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn
115 120 125

Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Thr Val Tyr
130 135 140

Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu
145 150 155 160

Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln
165 170 175

Leu Ile Cys Thr Gly Glu Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly
180 185 190

Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
195 200 205

Ala Arg Ala His His His His His His
210 215

<210> 38
<211> 654
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 食蟹猴 IL-2R α 亞單位+ Avi 標籤+ His 標籤

<400> 38
atgggatgga gctglatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtga gctctgtgac 60
gatgaccgcg caaaaatcac acatgccaca ttcaaagcca tggcctacaa ggaaggaacc 120
atgttgaact gtgaatgcaa gagaggtttc cgcagaataa aaagcgggtc accctatatg 180
ctctgtacag gaaactctag ccactcgtcc tgggacaacc aatgtcaatg cacaagctct 240
gctgctcgga acacaacaaa acaagtgaca cctcaacctg aagaacagaa agaaagaaaa 300
accacagaaa tgcaaagtca aatgcagctg gcggaaccaag tgagccttcc aggtcactgc 360
agggaacctc caccgtggga aaatgaagcc acagaaagaa tttatcattt cgtggtgggg 420

cagacggttt actaccagtg cgtccagggg tacagggctc tacacagagg tcctgctgag 480
agcgtctgca aaatgaccca cgggaagaca agatggaccc agccccagct catatgcaca 540
ggtgaagtcg acgaacagtt atatitttcag ggcggtcag gcctgaacga catcttcgag 600
gcccagaaga tcgagtggca cgaggctcga gctcaccacc atcaccatca ctga 654

<210> 39
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導序列

<400> 39

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 40
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導序列

<400> 40
atggactgga cctggagaat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 41
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導序列

<400> 41
atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 42
<211> 22
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 前導序列

<400> 42

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

<210> 43

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 前導序列

<400> 43

atggacatga gggccccgc tcagctccig ggcctcctgc tgctctggtt cccaggtgcc 60

aggtgt 66

<210> 44

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 前導序列

<400> 44

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 45

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 前導序列

<400> 45
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattcc 57

<210> 46
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導序列

<400> 46
atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccactggagt gcattcc 57

<210> 47
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 前導序列

<400> 47
atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtcgccacag ccaccggcgt gcactct 57

<210> 48
<211> 592
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47GS HC(Fc 凸起 ,P329G LALA)-IL2 N88D

<400> 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65					70						75				80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
			100					105					110		
Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro
		115					120					125			
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val
	130					135					140				
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
145					150					155					160
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly
			165						170					175	
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly
			180					185					190		
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys
		195					200					205			
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys
	210					215					220				
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225					230					235					240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
			245						250					255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys
			260					265					270		
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
		275					280					285			

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
530 535 540

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

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

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

<210> 49
<211> 1776
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47GS HC(Fc凸起 ,P329G LALA)-IL2 N88D

<400> 49
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540
agcagcgtgg tgacctgcc cttcagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
aatcacaagc ccagcaacac caagggtggac aagaaagttg agcccaaadc ttgtgacaaa 660
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720
ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 960
gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 1080
gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc cctgtctgga ctccgacggc 1200
tcctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct cctgtatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtggcgggcg aggctccgga ggcgagggtt ctggaggcgg aggcctccga 1380
cctgcctcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440
cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500
tttaagtitt acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa 1560
gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcacttaaga 1620
cccagggact taatcagcga tatcaacgta atagttctgg aactaaaggg atctgaaaca 1680
acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

<210> 50
<211> 592
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47GS HC(Fc wt,P329G LALA)-IL2 N88D

<400> 50

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

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

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

35

40

45

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

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

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

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

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

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

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

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
530 535 540

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

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

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

<210> 51
<211> 1776
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47GS HC(Fc wt,P329G LALA)-IL2 N88D

<400> 51
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 420
ggctgccttg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgcgtggaa ctcaggcgcc 480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtccctacagt cctcaggact ctactccctc 540

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtig agcccaaata ttgtgacaaa 660
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720
ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 960
gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
ccccgagaac cacagggtga caccctgccc ccatcccgga atgagctgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tcctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtggcggcgg aggctccgga ggcggagggt ctggaggcgg aggctccgca 1380
cctgcctcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta 1440
cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500
tttaagtttt acatgcccac gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa 1560
gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tacttaaga 1620
cccagggact taatcagcga tatcaacgta atagtcttg aactaaagg atctgaaaca 1680
acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
attaccttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

- <210> 52
- <211> 592
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> DP47GS HC(Fc wt, P329G LALA)-IL2 E95A
- <400> 52

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg	Leu Ser Cys Ala Ala	Ser Gly Phe Thr Phe	Ser Ser Tyr
	20	25	30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
	65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr			
	100	105	110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro			
	115	120	125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val			
	130	135	140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala			
	145	150	155
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly			
	165	170	175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly			
	180	185	190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys			
	195	200	205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys			
	210	215	220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
530 535 540

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Pro Leu Lys Gly Ser Glu Thr
545 550 555 560

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

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

<210> 53
<211> 1776
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DP47GS HC(Fc wt, P329G LALA)-IL2 E95A

<400> 53
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccitttagc agttatgcc a tgagctgggt cgcagggt 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtaggtac cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gtaccaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc	360
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg	420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctacaggcgc	480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc	540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaata ttgtgacaaa	660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcttc	720
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctccccga cccctgaggt cacatgcgtg	780
gtgggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	840
gagggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag	960
gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
tcctttcttc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1320
ctgtctccgg gtggcggcgg aggctccgga ggcgagggtt ctggaggcgg aggctccgca	1380
cctgcctcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta	1440
cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca	1500
tttaagtttt acatgcccga gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa	1560
gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcacttaaga	1620
cccagggact taatcagcaa taicaacgta atagttctgc cactaaaggg atctgaaaca	1680
acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg	1740
attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact	1776

<210> 54
 <211> 42
 <212> DNA

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	FOXP3 正向引物	
<400>	54	
	tgtaaaacga cggccagttt tagaagttgt atgggggatg tt	42
<210>	55	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	FOXP3反向引物	
<400>	55	
	caggaaacag ctatgaccaa aatatctacc ctcttctctt cctc	44
<210>	56	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CTLA-4 正向引物	
<400>	56	
	tgtaaaacga cggccagtgg gtttggttat gaaggagtat ga	42
<210>	57	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CTLA-4 反向引物	
<400>	57	
	caggaaacag ctatgacctt cacttaattt ccactaaaaa taccc	45
<210>	58	
<211>	133	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IL-2 N88D T3A C125A	
<400>	58	

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

<210> 59
<211> 399
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-2 N88D T3A C125A

<400> 59
gcacctgcct caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
acatttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctctcactta 240
agaccaggg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300

acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
tggattacct ttgcccaaag catcatctca acactgact 399

<210> 60
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-2 N88D

<400> 60

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 61
<211> 399
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-2 N88D

<400> 61
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggaigctc 120
acattttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240
agaccagagg acttaatcag cgataatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
tggattacct tttgtcaaag catcatctca acactgact 399

<210> 62
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-2 N88D C125A

<400> 62
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100105110

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

115120125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 63
<211> 399
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-2 N88D C125A

<400> 63
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
acatttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240
agaccaggg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
tggattacct ttgcccaaag catcatctca acactgact 399

<210> 64
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-2 N88D T3A

<400> 64

Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
151015

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
202530

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
354045

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 65
<211> 399
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-2 N88D T3A

<400> 65
gcacctgcct caagtcttac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
acatttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240
agaccagagg acttaatcag cgatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
tggattacct tttgtcaaag catcatctca acactgact 399

<210> 66
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> (G4S)3 連接體
<400> 66

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

.
. .
. .

.
. .
. .

I671318

發明摘要

※ 申請案號：104103962

※ 申請日：104年2月5日

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/55 (2006.01)

※IPC 分類：**A61K 38/20** (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

【發明名稱】

介白素-2融合蛋白及其用途

INTERLEUKIN-2 FUSION PROTEINS AND USES THEREOF

【中文】

本發明概言之係關於免疫球蛋白及介白素-2 (IL-2)之融合蛋白。更特定而言，本發明係關於免疫球蛋白及突變體IL-2之融合蛋白，其展現用作(例如)治療自體免疫疾病及免疫介導之發炎性疾病之治療劑之改良性質。此外，本發明係關於編碼該等融合蛋白之多核苷酸及包括該等多核苷酸之載體及宿主細胞。本發明另外係關於產生本發明之該等融合蛋白之方法及使用其治療疾病之方法。

【英文】

The present invention generally relates to fusion proteins of immunoglobulins and interleukin-2 (IL-2). More particularly, the invention concerns fusion proteins of immunoglobulins and mutant IL-2 that exhibit improved properties for use as therapeutic agents, e.g. in the treatment of autoimmune diseases and immune-mediated inflammatory diseases. In addition, the present invention relates to polynucleotides encoding such fusion proteins, and vectors and host cells comprising such polynucleotides. The invention further relates to methods for producing the fusion proteins of the invention, and to methods of using them in the treatment of disease.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（13）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種融合蛋白，其包括(i)不能特異性結合至抗原之IgG₁子類免疫球蛋白分子及(ii)兩個包括SEQ ID NO: 58之胺基酸序列的突變體介白素-2 (IL-2)分子，其中該免疫球蛋白分子在免疫球蛋白重鏈中包括胺基酸取代L234A、L235A及P329G (EU編號)，該等胺基酸取代可使該免疫球蛋白分子至Fc受體之結合親和力減小。
2. 如請求項1之融合蛋白，其中該免疫球蛋白分子係人類免疫球蛋白分子。
3. 如請求項1之融合蛋白，其中該免疫球蛋白分子包括基於人類Vh3-23種系序列之重鏈可變區序列。
4. 如請求項1之融合蛋白，其中該免疫球蛋白分子包括SEQ ID NO: 9之重鏈可變區序列。
5. 如請求項1之融合蛋白，其中該免疫球蛋白分子包括基於人類Vk3-20種系序列之輕鏈可變區序列。
6. 如請求項1之融合蛋白，其中該免疫球蛋白分子包括SEQ ID NO: 11之輕鏈可變區序列。
7. 如請求項1之融合蛋白，其中該Fc受體係Fcγ受體。
8. 如請求項1之融合蛋白，其中該Fc受體係活化Fc受體。
9. 如請求項1之融合蛋白，其中該Fc受體係選自FcγRIIIa (CD16a)、FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32)及FcαRI (CD89)之群。
10. 如請求項1之融合蛋白，其中該Fc受體係人類FcγRIIIa。
11. 如請求項1之融合蛋白，其中該等突變體IL-2分子各自在其N末端胺基酸處視情況經由肽連接體融合至該免疫球蛋白分子之該等免疫球蛋白重鏈中之一者之C末端胺基酸。
12. 如請求項1之融合蛋白，其中該等突變體IL-2分子各自經由肽連

接體融合至該免疫球蛋白分子。

13. 如請求項12之融合蛋白，其中該肽連接體包括至少10個胺基酸。
14. 如請求項12之融合蛋白，其中該肽連接體包括至少15個胺基酸。
15. 如請求項12之融合蛋白，其中該肽連接體包括胺基酸序列(G₄S)₃ (SEQ ID NO: 66)。
16. 如請求項1之融合蛋白，其中該融合蛋白包括SEQ ID NO: 19及SEQ ID NO: 50之多肽序列。
17. 如請求項1之融合蛋白，其中該融合蛋白選擇性活化調節性T細胞。
18. 一種多核苷酸，其編碼如請求項1至17中任一項之融合蛋白。
19. 一種載體，其包括如請求項18之多核苷酸。
20. 如請求項19之載體，其中該載體係表現載體。
21. 一種宿主細胞，其包括如請求項18之多核苷酸或如請求項19或20之載體。
22. 一種產生融合蛋白之方法，該融合蛋白包括不能特異性結合至抗原之IgG₁子類免疫球蛋白分子及兩個包括SEQ ID NO: 58之胺基酸序列的突變體IL-2分子，其中該免疫球蛋白分子在免疫球蛋白重鏈中包括胺基酸取代L234A、L235A及P329G (EU編號)，該方法包括以下步驟：(i)在適於表現該融合蛋白之條件下培養如請求項21之宿主細胞，及(ii)回收該融合蛋白。
23. 一種融合蛋白，其藉由如請求項22之方法產生。
24. 如請求項1至17及23中任一項之融合蛋白，其用作醫藥。
25. 如請求項1至17及23中任一項之融合蛋白，其用於治療自體免疫疾病。

26. 如請求項25之融合蛋白，其中該自體免疫疾病係選自1型糖尿病、全身性紅斑狼瘡、發炎性腸病、克羅恩氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎及多發性硬化之群。
27. 如請求項1至17及23中任一項之融合蛋白，其用於治療移植排斥或移植物抗宿主疾病。
28. 如請求項1至17及23中任一項之融合蛋白，其用於在活體外或在活體內選擇性活化調節性T細胞。
29. 如請求項28之融合蛋白，其中該活化包括誘導調節性T細胞之增殖及/或誘導調節性T細胞中之IL-2受體信號傳導。
30. 一種醫藥組合物，其包括如請求項1至17及23中任一項之融合蛋白及醫藥上可接受之載劑。
31. 如請求項30之醫藥組合物，其用作醫藥。
32. 如請求項30之醫藥組合物，其用於治療自體免疫疾病。
33. 如請求項32之醫藥組合物，其中該自體免疫疾病係選自1型糖尿病、全身性紅斑狼瘡、發炎性腸病、克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎及多發性硬化之群。
34. 如請求項30之醫藥組合物，其用於治療移植排斥或移植物抗宿主疾病。
35. 一種如請求項1至17及23中任一項之融合蛋白之用途，其係用以製造用於在有需要之個體中治療自體免疫疾病或免疫介導之發炎性疾病之醫藥。
36. 如請求項35之用途，其中該自體免疫疾病或免疫介導之發炎性疾病係選自1型糖尿病、全身性紅斑狼瘡、發炎性腸病、克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎及多發性硬化之群。
37. 如請求項35之用途，其中該自體免疫疾病或免疫介導之發炎性疾病係移植排斥或移植物抗宿主疾病。

38. 如請求項35至37中任一項之用途，其中該個體係人類。
39. 一種在活體外選擇性活化調節性T細胞之方法，其包括使該等調節性T細胞與如請求項1至17及23中任一項之融合蛋白接觸。
40. 如請求項39之方法，其中該活化包括誘導調節性T細胞之增殖及/或誘導調節性T細胞中之IL-2受體信號傳導。
41. 一種如請求項1至17及23中任一項之融合蛋白之用途，其係用以製造用於選擇性活化調節性T細胞之醫藥。
42. 如請求項41之用途，其中該活化包括誘導調節性T細胞之增殖及/或誘導調節性T細胞中之IL-2受體信號傳導。