

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023 年 10 月 26 日 (26.10.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/202035 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/55 (2006.01) *A61K 47/60* (2017.01)
A61K 38/20 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/129975
- (22) 国际申请日: 2022 年 11 月 4 日 (04.11.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202210415266.7 2022年4月20日 (20.04.2022) CN
- (71) 申请人: 北京大学宁波海洋药物研究院 (NINGBO INSTITUTE OF MARINE MEDICINE, PEKING UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国浙江省宁波市北仑区梅山街道康达路三创基地 11 号, Zhejiang 315800 (CN)。北京大学 (PEKING UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海淀区颐和园路5号, Beijing 100871 (CN)。
- (72) 发明人: 周德敏 (ZHOU, Demin); 中国浙江省宁波市北仑区梅山街道康达路三创基地 11 号, Zhejiang 315800 (CN)。纪德重 (JI, Dezhong); 中国浙江省宁波市北仑区梅山街道康达路三创基地 11 号, Zhejiang 315800 (CN)。孙家琦 (SUN, Jiaqi); 中国北京市海淀区颐和园路 5 号, Beijing 100871 (CN)。张博 (ZHANG, Bo); 中国北京市海淀区颐和园路5号, Beijing 100871 (CN)。
- (74) 代理人: 中国贸促会专利商标事务所有限公司 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW

OFFICE); 中国北京市复兴门内大街 158 号远洋大厦 F10 层, Beijing 100031 (CN)。

- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

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

(54) Title: RECEPTOR-BIASED PEGYLATED IL-2 VARIANT COMBINATION AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 受体偏向的PEG化IL-2变体组合及其应用

(57) Abstract: A combination of PEGylated IL-2 variants with different receptor biases is provided. The combination inhibits the amplification of immunosuppressive lymphocytes and reduces the terminal differentiation and depletion of effector lymphocytes by means of a synergistic effect, possessing a synergistic anti-tumor effect, so that the combination can be used for enhancing immune response and treating proliferative diseases such as tumors. In addition, the combination can also be used for in vitro culture of immune cells in adoptive cell immunotherapy, reducing the aging and depletion of immune cells, thereby leading the fate of the immune cells in the adoptive cell immunotherapy to long-term immunity. Also provided are a combined therapy for enhancing immune response and treating proliferative diseases such as tumors, and an in vitro method for preparing or culturing immune cells for adoptive cell therapy.

(57) 摘要: 提供具备不同受体偏向性的PEG化IL-2变体的组合。该组合通过协同作用抑制免疫抑制淋巴细胞扩增并减少效应淋巴细胞的终末分化和耗竭, 具备协同增效的抗肿瘤作用, 从而可用于增强免疫应答、治疗增生性疾病如肿瘤。此外, 该组合还能够用于过继细胞免疫治疗中的免疫细胞的体外培养, 减少免疫细胞的衰老和耗竭, 使得过继细胞免疫治疗中的免疫细胞的命运导向长期免疫。还提供了用于增强免疫应答、治疗增生性疾病如肿瘤的组合疗法, 以及制备或培养用于过继性细胞治疗的免疫细胞的体外方法。

WO 2023/202035 A1

受体偏向的 PEG 化 IL-2 变体组合及其应用

技术领域

本发明涉及免疫治疗领域，具体地，本发明涉及定点修饰的 PEG 化 IL-2 变体，以提供具备不同受体偏向性的 PEG 化 IL-2 变体的组合。本发明还提供了用于增强免疫应答、治疗增生性疾病如肿瘤的组合疗法，以及制备或培养用于过继性细胞治疗的免疫细胞的体外方法。

背景技术

白细胞介素-2 (IL2) 是一类重要的细胞因子，是 B 细胞、T 细胞及 NK 细胞发育和功能所必须的细胞因子。IL2 的受体分为 IL2-R α 单体，IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体和 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体，其中 IL2 与 α 单体亲和力较弱为 10^{-8}M ，与 $\beta\gamma$ 二聚体亲和力中等为 10^{-9}M ，与 $\alpha\beta\gamma$ 三聚体亲和力最高为 10^{-11}M 。由于亲和力低，二聚体 IL-2R 或内源性 IL-2 都需要以高水平诱导才能产生“二聚体 IL-2R:IL-2”反应性，这与三聚体 IL-2R 相反，其允许宿主细胞直接对低浓度的 IL-2 产生反应。因此，目前认为三聚体 IL-2R 的 α 链不参与信号传导，而是启动与 IL-2 的结合($KD \approx 10^{-8} \text{ M}$)，以及随后与 $\beta\gamma$ 复合物的亲和力增加 1000 倍的结合。

IL2 的受体在不同免疫细胞上的分布也存在差异：IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体长期表达于调节性 T 细胞 (Treg) 表面，因此对 IL2 亲和力最高；IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体表达在静息的效应 T 细胞 (Teff)、杀伤性 T 细胞 (CTL) 及 NK 细胞表面，对 IL2 亲和力一般，只有在效应 T 细胞及 NK 细胞激活以后，才会表达 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体，对 IL2 亲和力增强。已有证据表明，在 CD8+T 细胞启动期间， α 链的表达是相当动态的——一部分 T 细胞上调 α 链表达并感知强烈的 IL-2 信号，导致 T 细胞增殖更快但最终分化，这反过来又限制了它们的有效性。相比之下，对 IL-2 不太敏感的低 α 的 T 细胞优先上调 CD127 和 CD62L，从而产生功能性长寿命记忆细胞。在不改变 α 链上调的基本过程的情况下，在体内拥有更多的记忆 T 细胞群变得有价值，但对临床应用具有挑战性。因此在肿瘤治疗中，对 Teff/Treg, CTL/Treg 的失衡比例调节目前逐渐成为免疫治疗的一个新的研发方向。

目前上市的 IL2 靶点相关药物均无受体选择性。在用于肿瘤的治疗中，当需要激活 Teff 及 CTL 时需要较高剂量 IL2，由此也带来严重的系统毒性，是目前副作用的主要来

源。此外，IL2 与 IL2-R α 在肺内皮细胞的相互作用还会诱导血管渗漏综合征，激活 Treg 细胞导致的免疫抑制也会使得药物应答受限。

因此，解决现有 IL2 抗肿瘤药物对受体没有选择性的问题对于基于 IL2 的肿瘤免疫疗法的临床应用至关重要。

5

发明内容

如上所述的，虽然 IL-2 已被广泛用于增强机体免疫细胞，然而促进免疫抑制淋巴细胞扩增以及驱动效应淋巴细胞的终末分化和耗竭的附带特性阻碍了 IL-2 作为抗肿瘤剂的有效性。

10 发明人在此报告了一种策略，该策略通过两类受体偏向的 PEG 化 IL-2 变体来探索 IL-2 受体的动态表达模式，使得启动淋巴细胞的命运具有持久抗肿瘤免疫特性。具体地，第一类受体偏向的 PEG 化 IL-2 变体为 non- α PEGylate，它可以激活和扩增 CD8+T 细胞、CD4+细胞甚至 NK 细胞，而不是 Treg 细胞，这归因于其对二聚体而不是三聚体 IL-2R 的偏向亲和力，此外它还诱导减少的 CD8+细胞的终末分化和耗竭。第二类受体偏
15 向的 PEG 化 IL-2 变体为 non- β PEGylate，其既不激活 CD8+T 也不激活 Treg 细胞，但它与第一类 non- α PEGylate 协同作用以进一步扩增 CD4+和 CD8+T 细胞并减少 Treg 以及分化和耗尽的 CD8+T 细胞群，这归因于其保持对三聚体 IL-2R 的 α 链的中等亲和力，表现出优异的局部和系统性抗肿瘤反应。

发明人随后在靶向 CD19 的 CAR-T 治疗模型中证实了上述第一类受体偏向的 PEG
20 化 IL-2 变体 (non- α PEGylate) 和第二类受体偏向的 PEG 化 IL-2 变体 (non- β PEGylate) 通过协同作用将淋巴细胞的命运导向长期免疫。上述实验证据支持一种推定的机制，通过协同受体偏向的 PEG 化 IL-2 变体使得 IL-2:IL-2R 相互作用产生顺序改变，这不仅规避了 IL-2 的多效性作用，而且优化了 T 细胞的差异记忆程序，为 T 淋巴细胞和过继性 T 细胞转移疗法中的下一代 IL-2 指明了方向。

25 基于上述第一类受体偏向的 PEG 化 IL-2 变体 (non- α PEGylate) 和第二类受体偏向的 PEG 化 IL-2 变体 (non- β PEGylate)，本发明提供了具备不同受体偏向性的 PEG 化 IL-2 变体的组合。该组合通过协同作用抑制免疫抑制淋巴细胞扩增并减少效应淋巴细胞的终末分化和耗竭，提高中央记忆细胞的比例和数量，具备协同增效的抗肿瘤作用，从而可用于增强免疫应答、治疗增生性疾病如肿瘤。此外，该组合还能够用于过继细胞免
30 疫治疗中的免疫细胞的体外培养，减少免疫细胞的衰老和耗竭，增强 T Naïve 细胞的增

殖，降低 Treg 细胞的增殖，维持 Tscm 和 T effector 细胞的增殖，降低 T effector 细胞的耗竭程度，并避免内源性 IL-2 对于 T 细胞的过度激活，使得过继细胞免疫治疗中的免疫细胞的命运导向长期免疫。因此，本发明还提供了用于增强免疫应答、治疗增生性疾病如肿瘤的组合疗法，以及制备或培养用于过继性细胞治疗的免疫细胞的体外方法。

5

组合物

第一方面，本发明提供了组合物，其包含：

(1) 第一定点修饰的 IL-2，其与野生型 IL-2 相比在第一氨基酸位置的残基包含 PEG 基团修饰，其中，所述第一定点修饰的 IL-2 对 IL-2 受体 α (IL-2R α) 亚基不结合或以大于 1E-8 M (例如数量级为 1E-7~1E-6 M) 的 KD 值结合；以及

10

(2) 第二定点修饰的 IL-2，其与野生型 IL-2 相比在第二氨基酸位置的残基包含 PEG 基团修饰，其中，所述第二定点修饰的 IL-2 对 IL-2 受体 β (IL-2R β) 亚基不结合。

15

本领域技术人员理解，包含第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的组合物并不意味着两者必须同时给予和/或配制用于一起递送，尽管这些递送方法在此处描述的范围。在一些实施方案中，第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 可以在单一制剂中一起施用。在一些实施方案中，第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 可以在不同制剂中分开施用。组合中的第一定点修饰的 IL-2 可以与第二定点修饰的 IL-2 以任何顺序施用，例如同时、之前或之后施用。

20

在某些实施方案中，所述组合物包含多个组合物或剂型。在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 在分开的组合物或剂型中。

在某些实施方案中，所述组合物包含一个组合物或剂型。在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 在相同的组合物或剂型中。

25

在某些实施方案中，所述野生型 IL-2 具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。在某些实施方案中，本文中所述的 IL-2 相关的氨基酸位置是 SEQ ID NO: 1 中的位置。

在某些实施方案中，本文中所述的“不结合”是指通过表面等离子共振技术(SPR)未检测到结合。在某些实施方案中，本文中所述的 KD 值通过表面等离子共振技术(SPR)测定。

第一定点修饰的 IL-2 的受体偏向性

30

本文所述的第一定点修饰的 IL-2 具有对非 α 受体 (non- α) 的偏向性。

在某些实施方案中，所述对非 α 受体 (non- α) 的偏向性包括：(i) 以小于 $1\text{E-}8\text{ M}$ (例如数量级为 $1\text{E-}9\sim 1\text{E-}8\text{ M}$) 的 KD 值结合 $\text{IL2-R}\beta\gamma$ 二聚体，和/或，(ii) 对 $\text{IL2-R}\alpha\beta\gamma$ 三聚体不结合或以大于 $1\text{E-}8$ (例如数量级为 $1\text{E-}7\sim 1\text{E-}6$) 的 KD 值结合。

I. 对 $\text{IL-2R}\alpha$ 的结合特性

5 在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 对 IL-2 受体 α ($\text{IL-2R}\alpha$) 亚基不结合。在某些实施方案中，此类第一定点修饰的 IL-2 的第一氨基酸位置选自 F42、Y45、E62、K64、P65、E68。

在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 对 IL-2 受体 α ($\text{IL-2R}\alpha$) 亚基仅具备低亲和力，例如以大于 $1\text{E-}8\text{ M}$ (例如大于 $9\text{E-}7\text{ M}$ 、 $8\text{E-}7\text{ M}$ 、 $7\text{E-}7\text{ M}$ 、 $6\text{E-}7\text{ M}$ 、 $5\text{E-}7$
10 M 、 $4\text{E-}7\text{ M}$ 、 $3\text{E-}7\text{ M}$ 、 $2\text{E-}7\text{ M}$ 、 $1\text{E-}7\text{ M}$ 、 $9\text{E-}6\text{ M}$ 、 $8\text{E-}6\text{ M}$ 、 $7\text{E-}6\text{ M}$ 、 $6\text{E-}6\text{ M}$ 、 $5\text{E-}6\text{ M}$ 、 $4\text{E-}6\text{ M}$ 、 $3\text{E-}6\text{ M}$ 、 $2\text{E-}6\text{ M}$ 、 $1\text{E-}6\text{ M}$ 或更大) 的 KD 值结合 IL-2 受体 α ($\text{IL-2R}\alpha$) 亚基。在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 以数量级为 $1\text{E-}7\sim 1\text{E-}6\text{ M}$ 的 KD 值结合 IL-2 受体 α ($\text{IL-2R}\alpha$) 亚基。在某些实施方案中，此类第一定点修饰的 IL-2 的第一氨基酸位置选自 K35、T37、R38、T41、K48、K49。

15 II. 对 $\text{IL2-R}\beta\gamma$ 二聚体的结合特性

在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 以小于 $1\text{E-}8\text{ M}$ (例如小于 $2\text{E-}8\text{ M}$ 、 $3\text{E-}8\text{ M}$ 、 $4\text{E-}8\text{ M}$ 、 $5\text{E-}8\text{ M}$ 、 $6\text{E-}8\text{ M}$ 、 $7\text{E-}8\text{ M}$ 、 $8\text{E-}8\text{ M}$ 、 $9\text{E-}8\text{ M}$ 、 $1\text{E-}9\text{ M}$ 或更小) 的 KD 值结合 $\text{IL2-R}\beta\gamma$ 二聚体。在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 以数量级为 $1\text{E-}9\sim 1\text{E-}8\text{ M}$ 的 KD 值结合 $\text{IL2-R}\beta\gamma$ 二聚体。在某些实施方案中，此类第一定点修饰的
20 IL-2 的第一氨基酸位置选自 F42、Y45、E62、K64、P65、E68、K35、T37、R38、T41、K48、K49。

III. 对 $\text{IL2-R}\alpha\beta\gamma$ 三聚体的结合特性

在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 对 $\text{IL2-R}\alpha\beta\gamma$ 三聚体不结合。在某些实施方案中，此类第一定点修饰的 IL-2 的第一氨基酸位置选自 F42、Y45、E62、K64、
25 P65、E68。

在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 对 $\text{IL2-R}\alpha\beta\gamma$ 三聚体仅具备低亲和力，例如以大于 $1\text{E-}8\text{ M}$ (例如大于 $9\text{E-}7\text{ M}$ 、 $8\text{E-}7\text{ M}$ 、 $7\text{E-}7\text{ M}$ 、 $6\text{E-}7\text{ M}$ 、 $5\text{E-}7\text{ M}$ 、 $4\text{E-}7$
 M 、 $3\text{E-}7\text{ M}$ 、 $2\text{E-}7\text{ M}$ 、 $1\text{E-}7\text{ M}$ 、 $9\text{E-}6\text{ M}$ 、 $8\text{E-}6\text{ M}$ 、 $7\text{E-}6\text{ M}$ 、 $6\text{E-}6\text{ M}$ 、 $5\text{E-}6\text{ M}$ 、 $4\text{E-}6$
 M 、 $3\text{E-}6\text{ M}$ 、 $2\text{E-}6\text{ M}$ 、 $1\text{E-}6\text{ M}$ 或更大) 的 KD 值结合 $\text{IL2-R}\alpha\beta\gamma$ 三聚体。在某些实施方
30 案中，所述第一定点修饰的 IL-2 以数量级为 $1\text{E-}7\sim 1\text{E-}6\text{ M}$ 的 KD 值结合 $\text{IL2-R}\alpha\beta\gamma$ 三聚

体。在某些实施方案中，此类第一定点修饰的 IL-2 的第一氨基酸位置选自 K35、T37、R38、T41、K48、K49。

在某些实施方案中，当所述第一定点修饰的 IL-2 对 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体具备低亲和力时，所述第一定点修饰的 IL-2 对 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体的第一亲和力高于对 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的第二亲和力（即，结合 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体的第一 KD 值低于结合 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的第二 KD 值）。在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 对 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体的第一亲和力是对 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的第二亲和力的至少 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍或 10 倍。在某些实施方案中，此类第一定点修饰的 IL-2 的第一氨基酸位置选自 K35、T37、T41、K48。

在某些实施方案中，当所述第一定点修饰的 IL-2 对 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体具备低亲和力时，所述第一定点修饰的 IL-2 对 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体的第一亲和力也可以不高于（例如低于）对 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的第二亲和力（即，结合 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体的第一 KD 值不低于（例如高于）结合 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的第二 KD 值），但是所述第一定点修饰的 IL-2 对 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体和 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的亲和力的差距（例如两者 KD 值的比值）小于天然 IL-2 对 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体和 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的亲和力的差距（例如两者 KD 值的比值）。在此类实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 结合 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体的第一 KD 值不高于结合 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的第二 KD 值的 10 倍，例如不高于 9 倍，不高于 8 倍，不高于 7 倍，不高于 6 倍，不高于 5 倍，不高于 4 倍，不高于 3 倍或不高于 2 倍。在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 结合 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体的第一 KD 值为结合 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的第二 KD 值的 8 倍~3 倍，例如 7 倍~3 倍。在某些实施方案中，天然 IL-2 以数量级为 1E-9 M 的第一 KD 值结合 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体。在某些实施方案中，天然 IL-2 以数量级为 1E-11 M 的第二 KD 值结合 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体。在某些实施方案中，天然 IL-2 结合 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体的第一 KD 值为结合 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的第二 KD 值的约 40 倍。在某些实施方案中，此类第一定点修饰的 IL-2 的第一氨基酸位置选自 R38、K49。

第二定点修饰的 IL-2 的受体偏向性

本文所述的第二定点修饰的 IL-2 具有对非 β 受体（non- β ）的偏向性。

在某些实施方案中，所述对非 β 受体（non- β ）的偏向性包括：（i）以小于 1E-8（例如数量级为 1E-9~1E-8）的 KD 值结合 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体，和/或，（ii）对 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体不结合。

在某些实施方案中，所述第二定点修饰的 IL-2 对 IL-2 受体 β (IL-2R β) 亚基不结合。

在某些实施方案中，所述第二定点修饰的 IL-2 以小于 1E-8 M (例如小于 2E-8 M、3E-8 M、4E-8 M、5E-8 M、6E-8 M、7E-8 M、8E-8 M、9E-8 M、1E-9 M 或更小) 的 KD 值结合 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体。在某些实施方案中，所述第二定点修饰的 IL-2 以数量级为 1E-9~1E-8 M 的 KD 值结合 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体。

在某些实施方案中，所述第二定点修饰的 IL-2 对 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体不结合。

在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 的第一氨基酸位置选自 F42、Y45、E62、K64、P65、E68、K35、T37、R38、T41、K48、K49。在某些实施方案中，所述第一氨基酸位置选自 F42、Y45、E62、K64、P65、E68。在某些实施方案中，所述第一氨基酸位置为 F42、Y45、E62、P65 或 E68。

在某些实施方案中，所述第二定点修饰的 IL-2 的第二氨基酸位置选自 H16、D20、A73、H79。在某些实施方案中，所述第二定点修饰的 IL-2 的第二氨基酸位置选自 D20。在某些实施方案中，所述第一氨基酸位置为 F42、Y45、E62、P65 或 E68，所述第二氨基酸位置为 D20。

在某些实施方案中，所述第一氨基酸位置为 Y45，所述第二氨基酸位置为 D20-20K、H16-20K、A73-20K、H79-20K。在某些实施方案中，所述第一氨基酸位置为 Y45，所述第二氨基酸位置为 D20。

在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 包含的 PEG 修饰基团的平均分子量为 5~60kDa，例如为 5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa 或 60kDa。在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 包含的 PEG 修饰基团的平均分子量为 5~40kDa，例如为 5~30kDa、5~25kDa、5~20kDa、10~40kDa、10~30kDa、15~30kDa、10~25kDa 或 15~25kDa，例如为 5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa 或 40kDa。在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 包含的 PEG 修饰基团的平均分子量为 5kDa、10kDa 或 20kDa。在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 包含的 PEG 修饰基团的平均分子量为 20kDa。

在某些实施方案中，所述第二定点修饰的 IL-2 包含的 PEG 修饰基团的平均分子量为 5~60kDa，例如为 5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、

40kDa、45kDa、50kDa 或 60kDa。在某些实施方案中，所述第二定点修饰的 IL-2 包含的 PEG 修饰基团的平均分子量为 5~40kDa，例如为 5~30kDa、5~25kDa、5~20kDa、10~40kDa、10~30kDa、15~30kDa、10~25kDa 或 15~25kDa，例如为 5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa 或 40kDa。在某些实施方案中，所述第二定点修饰的 IL-2 包含的 PEG 修饰基团的平均分子量为 5kDa、10kDa 或 20kDa。在某些实施方案中，所述第二定点修饰的 IL-2 包含的 PEG 修饰基团的平均分子量为 20kDa。

在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 包含的 PEG 修饰基团和所述第二定点修饰的 IL-2 包含的 PEG 修饰基团具备基本相同的平均分子量。

在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 与野生型 IL-2（例如 SEQ ID NO: 1）相比在第一氨基酸位置（如氨基酸位置 F42、Y45、E62、P65 或 E68）的残基被突变为非天然氨基酸，所述非天然氨基酸上连接有所述 PEG 基团。

在某些实施方案中，所述第二定点修饰的 IL-2 与野生型 IL-2（例如 SEQ ID NO: 1）相比在第二氨基酸位置（如氨基酸位置 D20、H16、A73 或 H79）的残基被突变为非天然氨基酸，所述非天然氨基酸上连接有所述 PEG 基团。

在某些实施方案中，所述非天然氨基酸含有化学官能基团，例如，羰基、炔基、和叠氮基团等，这些基团一般能够有效且选择性地形成稳定的共价键；所述 PEG 基团包含能与该化学官能基团发生化学反应以形成共价键的标记基团，从而所述 PEG 基团连接至非天然氨基酸。

在某些实施方案中，所述非天然氨基酸含有叠氮基团，所述 PEG 基团包含能与叠氮基团发生 click 化学反应的标记基团，从而所述 PEG 基团连接至非天然氨基酸。

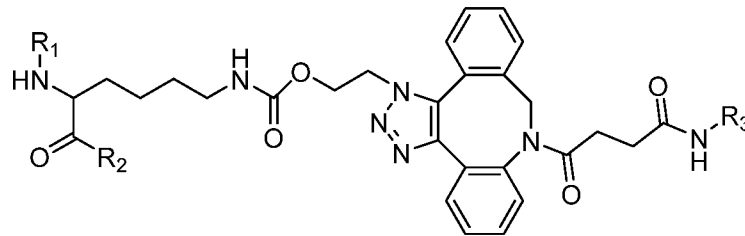
在某些实施方案中，所述非天然氨基酸为含有叠氮基团的赖氨酸衍生物。在某些实施方案中，所述非天然氨基酸为 N ϵ -2-叠氮乙氧羰基-L-赖氨酸(NAEK)。

在某些实施方案中，所述非天然氨基酸为含有叠氮基团的酪氨酸衍生物。在某些实施方案中，所述非天然氨基酸为 2-amino-3-(4-(azidomethyl)phenyl)propanoic acid。

在某些实施方案中，所述能与叠氮基团发生 click 化学反应的标记基团为包含二苯并环辛炔基团的化学部分，例如 dibenzocyclooctyne (DBCO)、4-dibenzocyclooctynol (DIBO) 或 BCN (bicyclo [6.1.0]nonyne)。

在某些实施方案中，所述能与叠氮基团发生 click 化学反应的标记基团为 DBCO，所述第一定点修饰的 IL-2 与野生型 IL-2 相比在第一氨基酸位置（如氨基酸位置 F42、Y45、E62、P65 或 E68）的残基以及所述第二定点修饰的 IL-2 与野生型 IL-2 相比在第

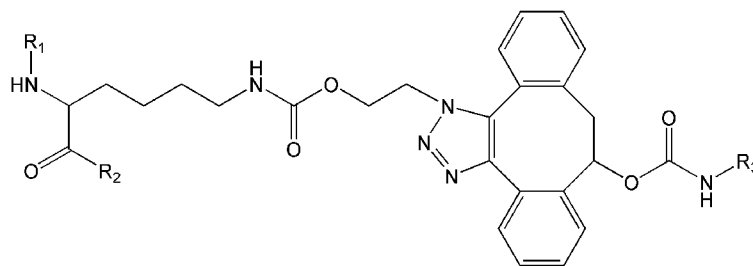
二氨基酸位置（如氨基酸位置 D20、H16、A73 或 H79）的残基被式 Ia 的结构替代：



式 Ia

其中，由 R1 到 R2 的方向为氨基酸序列的 N 末端到 C 末端方向，其中第 N 位的氨基酸为所述第一氨基酸位置的残基（如第 F42、Y45、E62、P65 或 E68 位氨基酸）或第二氨基酸位置的残基（如第 D20、H16、A73 或 H79 位氨基酸），R1 为 IL-2 氨基酸序列的第 1 至第 N-1 位氨基酸残基，R2 为 IL-2 氨基酸序列的第 N+1 位至 C 末端的氨基酸残基，R3 为 PEG 基团。

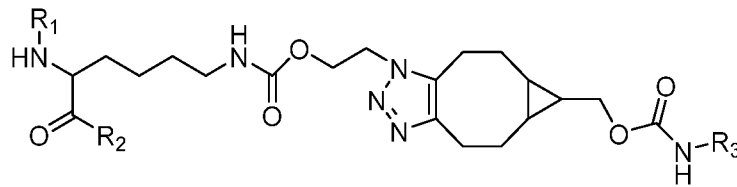
在某些实施方案中，所述能与叠氮基团发生 click 化学反应的标记基团为 DIBO，所述第一定点修饰的 IL-2 与野生型 IL-2 相比在第一氨基酸位置（如氨基酸位置 F42、Y45、E62、P65 或 E68）的残基以及所述第二定点修饰的 IL-2 与野生型 IL-2 相比在第二氨基酸位置（如氨基酸位置 D20、H16、A73 或 H79）的残基被式 Ib 的结构替代：



式 Ib

其中，由 R1 到 R2 的方向为氨基酸序列的 N 末端到 C 末端方向，其中第 N 位的氨基酸为所述第一氨基酸位置的残基（如第 F42、Y45、E62、P65 或 E68 位氨基酸）或第二氨基酸位置的残基（如第 D20、H16、A73 或 H79 位氨基酸），R1 为 IL-2 氨基酸序列的第 1 至第 N-1 位氨基酸残基，R2 为 IL-2 氨基酸序列的第 N+1 位至 C 末端的氨基酸残基，R3 为 PEG 基团。

在某些实施方案中，所述能与叠氮基团发生 click 化学反应的标记基团为 BCN，所述第一定点修饰的 IL-2 与野生型 IL-2 相比在第一氨基酸位置（如氨基酸位置 F42、Y45、E62、P65 或 E68）的残基以及所述第二定点修饰的 IL-2 与野生型 IL-2 相比在第二氨基酸位置（如氨基酸位置 D20、H16、A73 或 H79）的残基被式 Ic 的结构替代：



式 Ic

其中，由 R1 到 R2 的方向为氨基酸序列的 N 末端到 C 末端方向，其中第 N 位的氨基酸为所述第一氨基酸位置的残基（如第 F42、Y45、E62、P65 或 E68 位氨基酸）或第二氨基酸位置的残基（如第 D20、H16、A73 或 H79 位氨基酸），R1 为 IL-2 氨基酸序列的第 1 至第 N-1 位氨基酸残基，R2 为 IL-2 氨基酸序列的第 N+1 位至 C 末端的氨基酸残基，R3 为 PEG 基团。

在某些实施方案中，本申请中所涉及的 PEG 化 IL-2 变体的命名方式为：[与 SEQ ID NO: 1 相比突变为非天然氨基酸的位置]-[所连接的 PEG 基团的平均分子量]。

在某些示例性实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 选自 F42-20K、Y45-20K、E62-20K、P65-20K 或 E68-20K。在某些示例性实施方案中，所述第二定点修饰的 IL-2 为 D20-20K、H16-20K、A73-20K 或 H79-20K。以 Y45-20K 为例，其是指以下 PEG 化 IL-2 变体：该变体的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 1 相比差异在于 Y45 被置换为非天然氨基酸 NAEK，并且该位置进一步连接平均分子量为 20kDa 的 PEG 基团。

组合物的制备

本发明第一方面所提供的组合物中包含的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 可以通过本领域已知的任何方法制备。

在某些实施方案中，可以通过非天然氨基酸正交翻译技术定点插入非天然氨基酸，随后将 PEG 基团与该非天然氨基酸连接。

非天然氨基酸正交翻译技术是本领域技术人员熟知的。非天然氨基酸正交翻译技术利用终止密码子在蛋白翻译过程中将非天然氨基酸插入到蛋白质的氨基酸序列中，实际上扩展了氨基酸密码子的数量，因此非天然氨基酸正交翻译技术也被称为遗传密码子扩展技术。典型地，非天然氨基酸正交翻译系统涉及 tRNA、氨酰基 tRNA 合成酶以及具有一个或多个终止密码子的目的核酸序列。将上述系统引入宿主细胞，并在含有适当营养

素以及待插入的一种或多种非天然氨基酸的培养基中培养。然后将宿主细胞维持在允许目的蛋白质表达的条件下。响应于非天然密码子，将一个或多个非天然氨基酸掺入多肽链中。

在某些实施方案中，可以通过非天然氨基酸正交翻译技术定点插入非天然氨基酸，所述非天然氨基酸可以含有化学官能基团，例如，羰基、炔基、叠氮基团等，这些基团一般能够有效且选择性地形成稳定的共价键，随后通过化学反应形成共价键来定点修饰 PEG 基团。

- 5 在某些实施方案中，可以通过非天然氨基酸正交翻译技术定点插入非天然氨基酸，随后通过点击化学反应来定点修饰 PEG 基团。在某些实施方案中，所述非天然氨基酸和 PEG 基团分别包含能够发生点击化学反应的化学基团。

第二方面，本发明提供了制备第一方面所述的组合物的方法，其包括制备所述第一定点修饰的 IL-2 和制备所述第二定点修饰的 IL-2，其中，

- 10 制备所述第一定点修饰的 IL-2 包括：

-提供：（a1）第一定点突变的 IL-2，其与野生型 IL-2 相比在第一氨基酸位置（如氨基酸位置 F42、Y45、E62、P65 或 E68）的残基被突变为非天然氨基酸；（b1）由标记基团修饰的 PEG 基团，所述标记基团能与所述非天然氨基酸形成共价键；

-将（a1）与（b1）共孵育，通过化学反应将非天然氨基酸与 PEG 基团偶联；

- 15 制备所述第二定点修饰的 IL-2 包括：

-提供：（a2）第二定点突变的 IL-2，其与野生型 IL-2 相比在第二氨基酸位置（如氨基酸位置 D20、H16、A73 或 H79）的残基被突变为非天然氨基酸；（b2）由标记基团修饰的 PEG 基团，所述标记基团能与所述非天然氨基酸形成共价键；

-将（a2）与（b2）共孵育，通过化学反应将非天然氨基酸与 PEG 基团偶联。

- 20 在某些实施方案中，所述第一定点突变的 IL-2 包含的非天然氨基酸含有化学官能基团，例如，羰基、炔基、叠氮基团等，这些基团一般能够有效且选择性地形成稳定的共价键；所述 PEG 基团包含的标记基团能与该化学官能团发生化学反应形成共价键。

在某些实施方案中，所述第二定点突变的 IL-2 包含的非天然氨基酸含有化学官能基团，例如，羰基、炔基、叠氮基团等，这些基团一般能够有效且选择性地形成稳定的共价键；所述 PEG 基团包含的标记基团能与该化学官能团发生化学反应形成共价键。

- 25 在某些实施方案中，所述第一定点突变的 IL-2 和第二定点突变的 IL-2 中的非天然氨基酸包含相同的化学官能基团。

在某些实施方案中，所述第一定点突变的 IL-2 和第二定点突变的 IL-2 中的非天然氨基酸包含叠氮基团。

- 30 在某些实施方案中，所述第一定点突变的 IL-2 和第二定点突变的 IL-2 中的非天然氨基酸

基酸相同。

在某些实施方案中，所述非天然氨基酸为含有叠氮基团的赖氨酸衍生物。在某些实施方案中，所述非天然氨基酸为 N ϵ -2-叠氮乙氧羰基-L-赖氨酸(NAEK)。

在某些实施方案中，所述非天然氨基酸为含有叠氮基团的酪氨酸衍生物。在某些实施方案中，所述非天然氨基酸为 2-amino-3-(4-(azidomethyl)phenyl)propanoic acid。

在某些实施方案中，制备所述第一定点修饰的 IL-2 包括：

-提供：(a1) 第一定点突变的 IL-2，其与野生型 IL-2 相比在第一氨基酸位置（如氨基酸位置 F42、Y45、E62、P65 或 E68）的残基被突变为含有叠氮基团的非天然氨基酸；(b1) 由标记基团修饰的 PEG 基团，所述标记基团能与叠氮基团发生 click 化学反
10 应；

-将 (a1) 与 (b1) 共孵育，通过 click 反应将非天然氨基酸与 PEG 基团偶联。

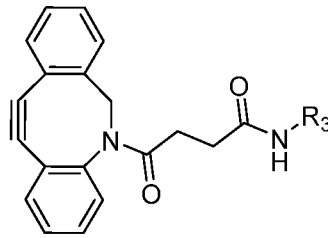
在某些实施方案中，制备所述第二定点修饰的 IL-2 包括：

-提供：(a2) 第二定点突变的 IL-2，其与野生型 IL-2 相比在第二氨基酸位置（如氨基酸位置 D20、H16、A73 或 H79）的残基被突变为含有叠氮基团的非天然氨基酸；
15 (b2) 由标记基团修饰的 PEG 基团，所述标记基团能与叠氮基团发生 click 化学反应；
-将 (a2) 与 (b2) 共孵育，通过 click 反应将非天然氨基酸与 PEG 基团偶联。

在某些实施方案中，所述 click 化学反应为无铜的 click 化学反应。无铜 click 化学反应是通过引入环辛炔来维持细胞活性而实现的 click 反应，其中八元环的张力允许在没有催化剂的条件下与叠氮发生反应。这些试剂中的一种由所谓的 DBCO 化合物组成。叠氮
20 修饰的大分子现在可以在没有金属催化剂的条件下进行标记，这样不仅可用于活细胞的研究，而且阻止了对蛋白的损伤。

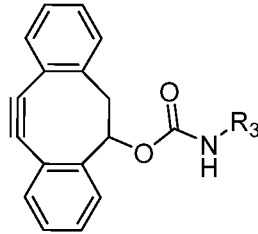
在某些实施方案中，所述能与叠氮基团发生 click 化学反应的标记基团为包含炔基的化学部分。在某些实施方案中，所述能与叠氮基团发生 click 化学反应的标记基团为包含二苯并环辛炔基团的化学部分。在某些实施方案中，所述能与叠氮基团发生 click 化学反
25 应的标记基团为 dibenzocyclooctyne (DBCO)、4-dibenzocyclooctynol (DIBO) 或 BCN (bicyclo [6.1.0]nonyne)。在某些实施方案中，所述能与叠氮基团发生 click 化学反应的标记基团为 DBCO。

在某些实施方案中，DBCO 标记的 PEG 基团具有式 IIa 所示的结构，其中 R3 为 PEG 基团。



式 IIa

在某些实施方案中，DIBO 标记的 PEG 基团具有式 IIb 所示的结构，其中 R3 为 PEG 基团。



式 IIb

在某些实施方案中，通过非天然氨基酸正交翻译技术提供所述第一定点突变的 IL-2 和所述第二定点突变的 IL-2。

在某些实施方案中，所述非天然氨基酸正交翻译技术包括以下步骤：

-获得编码定点突变的 IL-2 的核酸序列，其中，待突变氨基酸位置对应的密码子被突变为 TAG；

-将所述编码定点突变的 IL-2 的核酸序列与载体可操作地连接，得到定点突变序列表达载体；

-将所述定点突变序列表达载体与编码琥珀密码子抑制型 tRNA 和对非天然氨基酸特异性的氨酰 tRNA 合成酶的载体共转染宿主细胞，在含有非天然氨基酸的培养基中培养并诱导表达，得到定点突变为非天然氨基酸的 IL-2。

在某些实施方案中，所述非天然氨基酸为 Nε-2-叠氮乙氧羰基-L-赖氨酸(NAEK)。

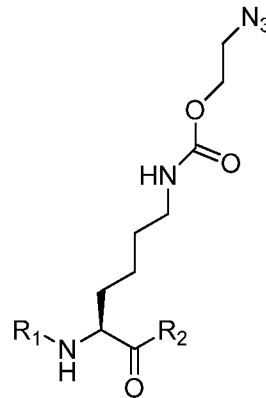
在某些实施方案中，所述对非天然氨基酸特异性的氨酰 tRNA 合成酶为 NAEK 特异性氨酰 tRNA 合成酶。

在某些实施方案中，所述编码琥珀密码子抑制型 tRNA 和对非天然氨基酸特异性的氨酰 tRNA 合成酶的载体为 pSURAR-YAV（也称为 pSUPAR-YAV-tRNA/PylRS），其从含有质粒 pSUPAR-YAV-tRNA/PylRS 的大肠埃希氏菌中获取，该菌株保藏在中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心（北京市朝阳区北辰西路 1 号院，中国科学院微生物研究所），保藏日期为 2013 年 4 月 8 日，保藏号为 CGMCC No: 7432，分类命名为大肠

埃希氏菌。

在某些实施方案中，所述第一定点突变的 IL-2 与野生型 IL-2 相比在第一氨基酸位置（如氨基酸位置 F42、Y45、E62、P65 或 E68）的残基以及所述第二定点突变的 IL-2 与野生型 IL-2 相比在第二氨基酸位置（如氨基酸位置 D20、H16、A73 或 H79）的残基被

5 式 III 的结构替代：



式 III

由 R1 到 R2 的方向为氨基酸序列的 N 末端到 C 末端方向，其中第 N 位的氨基酸为所述第一氨基酸位置的残基（如第 F42、Y45、E62、P65 或 E68 位氨基酸）或第二氨基酸位置的残基（如第 D20、H16、A73 或 H79 位氨基酸），R1 为 IL-2 氨基酸序列的第 1 至第 N-1 位氨基酸残基，R2 为 IL-2 氨基酸序列的第 N+1 位至 C 末端的氨基酸残基。

试剂盒

本发明提供的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的组合可以在免疫细胞的体外培养中减少免疫细胞的衰老和耗竭，增强 T Naïve 细胞的增殖，降低 Treg 细胞的增殖，维持 Tscm 和 T effector 细胞的增殖，降低 T effector 细胞的耗竭程度，并避免内源性 IL-2 对于 T 细胞的过度激活，使得过继细胞免疫治疗中的免疫细胞的命运导向长期免疫。基于此，本发明还提供了如下所述的试剂盒，制备或培养用于过继性细胞治疗的免疫细胞的体外方法，以及由此方法获得的用于过继性细胞治疗的免疫细胞。

第三方面，本发明提供了试剂盒，其包含第一方面所述的组合物。在某些实施方案中，所述试剂盒进一步包含包装说明书，所述包装说明书包含使用所述组合物来在体外制备和/或培养用于过继性细胞治疗的免疫细胞的说明。本发明还涉及第一方面所述的组合物或第三方面所述的试剂盒用于体外制备或培养用于过继性细胞治疗的免疫细胞的用途。

在本文中，过继性细胞治疗 (adoptive cell therapy) 可以包括肿瘤浸润 T 细胞(TIL) 疗法、嵌合抗原受体 T 细胞疗法(CAR-T)、T 细胞受体疗法(TCR)、NK 细胞疗法等。在本文中，所述用于过继性细胞治疗的经改造的免疫细胞可以本领域已知用于过继性细胞疗法的任意细胞。在某些实施方案中，所述用于过继性细胞治疗的经改造的免疫细胞包

5 括淋巴细胞，例如 T 细胞、NK 细胞或其组合。

在某些实施方案中，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是经改造的免疫细胞，其表达嵌合抗原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子。在某些实施方案中，所述经改造的免疫细胞包括表达 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的淋巴细胞，例如 T 细胞、NK 细胞或其组合。

10 在某些实施方案中，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)。

第四方面，本发明提供了试剂盒，其包含第一方面所述的组合物以及编码嵌合抗原受体的核酸分子。在某些实施方案中，所述试剂盒进一步包含包装说明书，所述包装说明书包含使用所述组合物中以及核酸分子来在体外制备用于过继性细胞治疗的经改造的

15 免疫细胞的说明，所述经改造的免疫细胞表达嵌合抗原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子。

在某些实施方案中，所述编码嵌合抗原受体的核酸分子存在于表达载体中。

在某些实施方案中，所述表达载体为病毒（例如，慢病毒、逆转录病毒或腺病毒）载体。在某些实施方案中，所述表达载体为非病毒载体。

20 本发明还涉及第一方面所述的组合物以及任选的编码嵌合抗原受体的核酸分子或者第四方面所述的试剂盒用于体外制备用于过继性细胞治疗的经改造的免疫细胞的用途，所述经改造的免疫细胞表达嵌合抗原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子。

本发明还提供了包含第一方面所述的组合物以及用于过继性细胞治疗的免疫细胞的试剂盒。在某些实施方案中，所述试剂盒进一步包含包装说明书，所述包装说明书包含

25 使用所述组合物来在体外培养所述免疫细胞以用于过继性细胞治疗的说明。本发明还涉及第一方面所述的组合物以及任选的用于过继性细胞治疗的免疫细胞用于体外培养用于过继性细胞治疗的免疫细胞。

在某些实施方案中，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是经改造的免疫细胞，其表达嵌合抗原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子。在某些实施方案中，所

30 述经改造的免疫细胞包括表达 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的淋巴细胞，例如 T 细胞、NK 细胞或其

组合。

在某些实施方案中，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)。

在某些实施方案中，本文中所述的嵌合抗原受体具备本领域技术人员公知的含义，其典型地包括细胞外抗原结合结构域、任选的间隔结构域、跨膜结构域、以及一个或多个胞内信号传导结构域。在某些实施方案中，所述胞内信号传导结构域选自初级信号传导结构域和/或共刺激信号传导结构域。在某些实施方案中，所述细胞外抗原结合结构域包含特异性结合肿瘤相关抗原（例如 CD19）的抗体或抗原结合片段（例如 scFv）。

用于过继性细胞治疗的免疫细胞的培养与制备

第五方面，本发明提供了培养用于过继性细胞治疗的免疫细胞的方法，所述方法包括在包含第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的细胞培养基中培养所述细胞，其中，所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 如第一方面中定义。

细胞培养基可以是能够支持细胞生长的任何培养基，通常包含无机盐、维生素、葡萄糖、缓冲体系和必需氨基酸，并且通常具有约 280-330 mOsmol 的渗透压。在某些实施方案中，所述细胞培养基是能够支持免疫细胞（如淋巴细胞，如 T 细胞和/或 NK 细胞）生长的培养基。在某些实施方案中，所述细胞培养基为完全培养基。在某些实施方案中，所述细胞培养基包含基础培养基（如 RPMI 1640）、血清（如 FBS）、丙酮酸钠、非必需氨基酸。在某些实施方案中，所述细胞培养基不包含血清。

在某些实施方案中，所述方法还包括收获细胞用于储存(例如在冷冻保存培养基中重新配制)或施用(例如用于过继性细胞治疗)。

在某些实施方案中，所提供的存在第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的培养条件可减少免疫细胞的衰老和耗竭，保留其干性状态，增强 T Naïve 细胞的增殖，降低 Treg 细胞的增殖，维持 Tscm 和 T effector 细胞的增殖状态，降低 T effector 细胞的耗竭程度，避免 T 细胞激活产生的内源性 IL-2 对于 T 细胞的过度激活。

在某些实施方案中，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是经改造的免疫细胞，其表达嵌合抗原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子。在某些实施方案中，所述经改造的免疫细胞包括表达 IL2-Rαβγ 三聚体的淋巴细胞，例如 T 细胞、NK 细胞或其组合。

在某些实施方案中，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞

(TIL)。

第六方面，本发明提供了制备用于过继性细胞治疗的免疫细胞的方法，其包括使用如第一方面中定义的第一定点修饰的 **IL-2** 和第二定点修饰的 **IL-2**。

5 在第六方面的某些实施方案中，本发明提供了制备用于过继性细胞治疗的免疫细胞的方法，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是经改造的免疫细胞，其表达嵌合抗原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子，其中，所述方法包括：

(1) 提供来自患者或者健康供体的免疫细胞；

(2) 在存在第一定点修饰的 **IL-2** 和第二定点修饰的 **IL-2** 的条件下，将编码嵌合抗原受体的核酸分子引入步骤(1)所述的免疫细胞，从而提供所述经改造的免疫细胞；其中，
10 所述第一定点修饰的 **IL-2** 和第二定点修饰的 **IL-2** 如第一方面中定义。

在某些实施方案中，步骤(2)在包含所述第一定点修饰的 **IL-2** 和第二定点修饰的 **IL-2** 的细胞培养基中进行。细胞培养基可以是能够支持细胞生长的任何培养基，通常包含无机盐、维生素、葡萄糖、缓冲体系和必需氨基酸，并且通常具有约 **280-330 mOsmol** 的渗透压。
15 在某些实施方案中，所述细胞培养基是能够支持免疫细胞（如淋巴细胞，如 **T** 细胞和/或 **NK** 细胞）生长的培养基。在某些实施方案中，所述细胞培养基为完全培养基。在某些实施方案中，所述细胞培养基包含基础培养基（如 **RPMI 1640**）、血清（如 **FBS**）、丙酮酸钠、非必需氨基酸。在某些实施方案中，所述细胞培养基不包含血清。

在某些实施方案中，在步骤(2)中所述编码嵌合抗原受体的核酸分子存在于表达载体
20 中。

在某些实施方案中，在步骤(2)中所述编码嵌合抗原受体的核酸分子由病毒（例如，慢病毒、逆转录病毒或腺病毒）载体通过感染的方式引入细胞。在某些实施方案中，在步骤(2)中所述编码嵌合抗原受体的核酸分子由慢病毒载体通过感染的方式引入细胞。

在某些实施方案中，在步骤(2)中所述编码嵌合抗原受体的核酸分子由非病毒载体引
25 入细胞。

在某些实施方案中，在步骤(1)中，所述免疫细胞经预处理，所述预处理包括免疫细胞的分选、激活和/或增殖。在某些实施方案中，所述预处理包括将免疫细胞与抗 **CD3** 抗体和抗 **CD28** 抗体接触，从而刺激所述免疫细胞并诱导其增殖，由此生成经预处理的免疫细胞。在某些实施方案中，所述预处理包括从外周血单核细胞(**PBMC**)分离 **T** 细胞。

30 在某些实施方案中，在步骤(2)之后所述方法还包括：(3) 在包含所述第一定点修饰的

IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的细胞培养基中继续培养步骤(2)获得的免疫细胞的步骤。

在某些实施方案中，所述方法还包括收获细胞用于储存(例如在冷冻保存培养基中重新配制)或施用(例如用于过继性细胞治疗)。

在某些实施方案中，所述免疫细胞包括表达 IL-2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的淋巴细胞，如 T 细胞、NK 细胞或其任意组合。在某些实施方案中，所述免疫细胞是 T 细胞。

在某些实施方案中，所提供的存在第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的制备条件可减少免疫细胞的过度激活及终末分化。

在第六方面的某些实施方案中，本发明还提供了制备用于过继性细胞治疗的免疫细胞的方法，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)，其中，所述方法包括：从肿瘤组织中分离浸润淋巴细胞并在包含第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的细胞培养基中进行培养，其中，所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 如第一方面中定义，所述细胞培养基如上文中定义。

第七方面，本发明提供了用于过继性细胞治疗的免疫细胞，其由如上任一方面所述的方法制备或培养。

在某些实施方案中，第七方面所述的免疫细胞具备减少的衰老和耗竭，增强的 T Naïve 细胞增殖，降低的 Treg 细胞增殖，维持的 Tscm 和 T effector 细胞增殖，降低的 T effector 细胞耗竭程度，和/或降低的由内源性 IL-2 导致的过度激活。

第八方面，本发明提供了免疫细胞群，其包括第七方面所述的免疫细胞，以及可选的未改造和/或未成功改造的免疫细胞。在某些实施方案中，第七方面所述的免疫细胞占免疫细胞群总细胞数的大约 10%-100%，优选地 40%-80%。

在协同增强免疫应答中的应用

本发明提供的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 具有显著的协同增强免疫应答的作用，因此本发明提供的所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的组合可用于治疗刺激宿主的免疫系统以获益的疾病情形，特别是期望增强细胞免疫应答的状况，可以包括宿主免疫应答不足或缺陷性的疾病情形，例如肿瘤。

第十方面，本发明提供了药物组合物，其包含第一方面所述的组合物以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

在某些实施方案中，所述药物组合物包含多个组合物或剂型。在某些实施方案中，

所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 在分开的组合物或剂型中。在某些实施方案中，所述药物组合物包含：所述第一定点修饰的 IL-2 和药学上可接受的载体和/或赋形剂形成的第一组合物，以及所述第二定点修饰的 IL-2 和药学上可接受的载体和/或赋形剂形成的第二组合物。

5 在某些实施方案中，所述药物组合物包含一个组合物或剂型。在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 在相同的组合物或剂型中。在某些实施方案中，所述药物组合物包含：所述第一定点修饰的 IL-2、第二定点修饰的 IL-2 以及药学上可接受的载体和/或赋形剂形成的单一组合物。

10 本发明所述的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2、它们的组合以及第一方面所述的组合物或第十方面所述的药物组合物可以被配制成与其预期施用途径相兼容的剂型。施用途径的实例包括肠胃外给药，例如，静脉内给药、皮内给药、皮下给药、口服给药(例如，吸入给药)、经皮给药(即，局部给药)、经粘膜给药和直肠给药。用于肠胃外给药、皮内给药或皮下给药应用的溶液或悬浮液可包括以下组分：无菌稀释剂诸如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂；抗菌剂诸如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂诸如乙二胺四乙酸(EDTA)；缓冲剂诸如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐，和用于调整张力的试剂，诸如氯化钠或葡萄糖。pH 可以用酸或碱，诸如盐酸或氢氧化钠调节。肠胃外给药的制剂可以封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

15

适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(其中水可溶)或分散体和用于随时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、聚氧乙烯蓖麻油 ELTM 或磷酸缓冲盐水(PBS)。在所有情况下，组合物必须是无菌的，并且应该是达到存在易注射性程度的流体。它必须在制造和储存条件下是稳定的，并且必须防止微生物诸如细菌和真菌的污染作用下保存。载体可以是包括例如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)，及其合适的混合物的溶剂或分散介

20

25 质。防止微生物的作用可以通过各种抗细菌和抗真菌剂来实现，例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在许多情况下，在组合物中将优选包括等渗剂，例如糖类，多元醇诸如甘露醇、山梨醇，氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂，例如，单硬脂酸铝和明胶来实现。

第十一方面，本发明提供了一种用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病(例如肿瘤)的方法，其包括向有需要的受试者施用第一方面所述的组合物或第十方面所述

30

的药物组合物。在某些实施方案中，所述方法包括向受试者联合施用所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2。

第十二方面，本发明还提供了第一方面所述的组合物或第十方面所述的药物组合物用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病（例如肿瘤）的用途，或者，在制备用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病（例如肿瘤）的药物中的用途。本发明还提供了第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的组合用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病（例如肿瘤）的用途，或者，在制备用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病（例如肿瘤）的药物中的用途。

在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 单独地调配成两种或两种以上的组合物(例如，包含每种组分的试剂盒)。彼此联合施用的单独组分可以同时、分开或相继施用。在某些实施方案中，彼此联合施用的单独组分可以在与施用其它组分的时间不同的时间施用于受试者；例如，作为治疗方案的一部分，每次施用可以以给定的时间段的间隔非同时(例如，单独地或顺序地)给予。在某些实施方案中，彼此联合施用的单独组分还可以在同一施用时段期间顺序地施用，但基本上同时施用。此外，可以通过相同或不同的途径向受试者施用彼此联合施用的单独组分。

在某些实施方案中，所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 一起调配成单个组合物，例如以用于同时递送。

在另一方面，本发明提供了一种药盒，其包含含有所述第一定点修饰的 IL-2 和可选的药学上可接受的载体和/或赋形剂的药物，和包装说明书，所述包装说明书包含将所述药物与含有所述第二定点修饰的 IL-2 和可选的药学上可接受的载体和/或赋形剂的组合物组合施用来在受试者中增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病（例如肿瘤）的说明。

在另一方面，本发明提供了一种药盒，其包含含有所述第二定点修饰的 IL-2 和可选的药学上可接受的载体和/或赋形剂的药物，和包装说明书，所述包装说明书包含将所述药物与含有所述第一定点修饰的 IL-2 和可选的药学上可接受的载体和/或赋形剂的组合物组合施用来在受试者中增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病（例如肿瘤）的说明。

在另一方面，本发明提供了一种药盒，其包含含有所述第一定点修饰的 IL-2 和可选的药学上可接受的载体和/或赋形剂的第一药物，含有所述第二定点修饰的 IL-2 和可选的药学上可接受的载体和/或赋形剂的第二药物。在某些实施方案中，所述药盒进一步包含含有施用所述第一药物和所述第二药物来在受试者中增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病（例如肿瘤）的说明的包装说明书。

在如上所述的方法、用途和药盒的某些实施方案中，所述免疫应答是细胞免疫应答。在某些实施方案中，所述免疫应答是 T 细胞介导的免疫应答，特别是效应 T 细胞 (Teff)介导的免疫应答。在某些实施方案中，所述增强免疫应答还包括降低或抑制 Treg 细胞功能。

5 在如上所述的方法、用途和药盒的某些实施方案中，所述增生性疾病是肿瘤，包括实体瘤或血液肿瘤，也包括转移性癌症、复发性或难治性癌症。在另一些实施方式中，所述增生性疾病是高丙种球蛋白血症(hypergammaglobulinemia)、淋巴增生性病、病变蛋白血症(paraproteinemias)、紫癜(purpura)、结节病、塞扎里综合征(Sezary Syndrome)、Waldenstrom's 巨球蛋白血症、高歇氏病(Gaucher's Disease)、组织细胞增多
10 病(histiocytosis)以及任何其它位于器官系统中的瘤形成(neoplasia)外的细胞增殖疾病。

在如上所述的方法、用途和药盒的某些实施方案中，所述肿瘤是实体瘤。在某些实施方案中，所述实体瘤是转移性癌症，复发性或难治性癌症。

在如上所述的方法、用途和药盒的某些实施方案中，所述肿瘤是血液肿瘤，例如白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在某些实施方案中，所述血液肿瘤是转移性癌症，复发性或难
15 治性癌症。

在如上所述的方法、用途和药盒的某些实施方案中，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾细胞癌、非小细胞肺癌、淋巴瘤、头颈部鳞状细胞癌、尿路上皮癌、卵巢癌、胃癌和乳腺癌。

在如上所述的方法、用途和药盒的某些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如
20 人。

在如上所述的方法、用途和药盒的某些实施方案中，所述组合物中的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 同时、分开或相继施用。

在如上所述的方法、用途和药盒的某些实施方案中，本发明所述的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2、它们的组合以及本发明的组合物或药物组合物可以配制成
25 医学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、锭剂、栓剂、注射剂（包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液）、吸入剂、喷雾剂等。优选剂型取决于预期的给药方式 and 治疗用途。本发明的组合物或药物组合物应当是无菌的并在生产和储存条件下稳定。一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以是无菌注射溶液。例如，可通过下述方法来制备无菌注射溶液：
30 在适当的溶剂中掺入必需剂量的活性成分，以及任选地，同时掺入其他期望的成分(包括

但不限于, pH 调节剂, 表面活性剂, 佐剂, 离子强度增强剂, 等渗剂、防腐剂、稀释剂, 或其任何组合), 随后过滤除菌。此外, 可以将无菌注射溶液制备为无菌冻干粉剂(例如, 通过真空干燥或冷冻干燥)以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中, 例如注射用水(WFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、氯化钠溶液(例如 0.9% (w/v)NaCl)、葡萄糖溶液(例如 5%葡萄糖)、含有表面活性剂的溶液(例如 0.01%聚山梨醇 20)、pH 缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲溶液)、Ringer 氏溶液及其任意组合。

在如上所述的方法、用途和药盒的某些实施方案中, 本发明所述的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2、它们的组合以及本发明的组合物或药物组合物可以通过本领域已知的任何合适的方法来施用, 包括但不限于, 口服、口腔、舌下、眼球、局部、肠胃外、直肠、叶鞘内、内胞浆网槽内、腹股沟、膀胱内、局部(如, 粉剂、药膏或滴剂), 或鼻腔途径。但是, 对于许多治疗用途而言, 优选的给药途径/方式是胃肠外给药(例如静脉注射或推注, 皮下注射, 腹膜内注射, 肌肉注射)。技术人员应理解, 给药途径和/或方式将根据预期目的而发生变化。在某些实施方案中, 本发明所述的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2、它们的组合以及本发明的组合物或药物组合物通过静脉注射或推注给予。

在如上所述的方法、用途和药盒的某些实施方案中, 本发明所述的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2、它们的组合以及本发明的组合物或药物组合物可以以剂量单位形式配制以易于施用。剂量单位形式是指适合作为单一剂量用于待治疗对象的物理上离散的单位; 每个单位含有预定量的经计算与所需的药物载体联合以产生的期望的治疗效果的活性成分。

在如上所述的方法、用途和药盒的某些实施方案中, 本发明所述的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2、它们的组合以及本发明的组合物或药物组合物可以单独施用, 也可以与另外的药学活性剂(例如抗肿瘤剂)或另外的疗法(例如抗肿瘤疗法)联合施用。

在过继性细胞治疗中的应用

本发明提供的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的组合可以使得过继细胞免疫治疗中的免疫细胞的命运导向长期免疫。由此进一步提供所述免疫细胞的治疗应用。

第十三方面, 本发明提供了药物组合物, 其包含第七方面所述的免疫细胞或第八方

面所述的免疫细胞群以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

第七方面所述的免疫细胞、第八方面所述的免疫细胞群或第十三方面所述的药物组合物可以被配制成与其预期施用途径相兼容的剂型。施用途径的实例包括肠胃外给药，例如，静脉内给药、皮内给药、皮下给药、口服给药(例如，吸入给药)、经皮给药(即，
5 局部给药)、经粘膜给药和直肠给药。用于肠胃外给药、皮内给药或皮下给药应用的溶液或悬浮液可包括以下组分：无菌稀释剂诸如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂；抗菌剂诸如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂诸如乙二胺四乙酸(EDTA)；缓冲剂诸如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐，和用于调整张力的试剂，诸如氯化钠或葡萄糖。pH 可以用酸或碱，诸如
10 盐酸或氢氧化钠调节。肠胃外给药的制剂可以封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

适于注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(其中水可溶)或分散体和用于随时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、聚氧乙烯蓖麻油 ELTM 或磷酸缓冲盐水(PBS)。在所有情况下，组合物必须是无菌的，并且应该是达到存在易注射性程度的流体。它必须在制造和储存条件下是稳定的，并且必须防止微生物诸如细菌和真菌的污染作用下保存。载体可以是包括例如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)，及其合适的混合物的溶剂或分散介质。防止微生物的作用可以通过各种抗细菌和抗真菌剂来实现，例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在许多情况下，在组合物中将优选包括等渗
15 剂，例如糖类，多元醇诸如甘露醇、山梨醇，氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂，例如，单硬脂酸铝和明胶来实现。

第十四方面，本发明提供了一种用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病(例如肿瘤)的方法，其包括向有需要的受试者施用第七方面所述的免疫细胞、第八方面所述的免疫细胞群或第十三方面所述的药物组合物。

在某些实施方案中，所述方法包括以下步骤：(1) 使用第五方面所述的方法和/或第六方面所述的方法获得免疫细胞；(2) 将步骤(1)中获得的免疫细胞或包含其的细胞群体施用至所述受试者以进行治疗。

在某些实施方案中，向受试者施用嵌合抗原受体细胞疗法，所述方法包括：使用本发明第五方面所述的方法和/或第六方面所述的方法获得表达嵌合抗原受体的经改造的免疫细胞，随后向所述受试者施用所述经改造的免疫细胞。

在某些实施方案中，向受试者施用 TIL 疗法，所述方法包括：使用本发明第五方面所述的方法和/或第六方面所述的方法获得肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)，向所述受试者施用所述肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

第十五方面，本发明还提供了第七方面所述的免疫细胞、第八方面所述的免疫细胞群或第十三方面所述的药物组合物用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病（例如肿瘤）的用途，或者，在制备用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病（例如肿瘤）的药物中的用途。

在如上所述的方法和用途的某些实施方案中，所述免疫细胞、免疫细胞群或药物组合物可以与第一方面中所述定义的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 联合施用，例如同时、分开或相继施用。

第十六方面，本发明还提供了第一方面所述的组合物与用于过继性细胞治疗的免疫细胞的组合用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病（例如肿瘤）的用途，或者，在制备用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病（例如肿瘤）的药物中的用途。

第十七方面，本发明还提供了用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病的方法，其包括向有需要的受试者施用第一方面所述的组合物与用于过继性细胞治疗的免疫细胞的组合。

在第十六方面或第十七方面的某些实施方案中，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是经改造的免疫细胞，其表达嵌合抗原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子。在某些实施方案中，所述经改造的免疫细胞包括表达 IL2-Rαβγ 三聚体的淋巴细胞，如 T 细胞、NK 细胞或其任意组合。

在第十六方面或第十七方面的某些实施方案中，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

在第十六方面或第十七方面的某些实施方案中，第一方面所述的组合物与用于过继性细胞治疗的免疫细胞存在于相同的组合物或剂型中，从而可同时施用。

在第十六方面或第十七方面的某些实施方案中，第一方面所述的组合物与用于过继性细胞治疗的免疫细胞存在于分开的组合物或剂型中，从而可分开或相继施用。

在如上所述的方法和用途的某些实施方案中，所述免疫应答是细胞免疫应答。在某些实施方案中，所述免疫应答是 T 细胞介导的免疫应答，特别是效应 T 细胞(Teff)介导的

免疫应答。在某些实施方案中，所述增强免疫应答还包括降低或抑制 Treg 细胞功能。

在如上所述的方法和用途的某些实施方案中，所述增生性疾病是肿瘤，包括实体瘤或血液肿瘤，也包括转移性癌症、复发性或难治性癌症。在另一些实施方式中，所述增生性疾病是高丙种球蛋白血症(hypergammaglobulinemia)、淋巴增生性疾病、病变蛋白血症(paraproteinemias)、紫癜(purpura)、结节病、塞扎里综合征(Sezary Syndrome)、Waldenström's 巨球蛋白血症、高歇氏病(Gaucher's Disease)、组织细胞增多病(histiocytosis)以及任何其它位于器官系统中的瘤形成(neoplasia)外的细胞增殖疾病。

在如上所述的方法和用途的某些实施方案中，所述肿瘤是实体瘤。在某些实施方案中，所述实体瘤是转移性癌症，复发性或难治性癌症。

在如上所述的方法和用途的某些实施方案中，所述肿瘤是血液肿瘤，例如白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在某些实施方案中，所述血液肿瘤是转移性癌症，复发性或难治性癌症。

在如上所述的方法和用途的某些实施方案中，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾细胞癌、非小细胞肺癌、淋巴瘤、头颈部鳞状细胞癌、尿路上皮癌、卵巢癌、胃癌和乳腺癌。

在如上所述的方法和用途的某些实施方案中，所述肿瘤是淋巴瘤。

在如上所述的方法和用途的某些实施方案中，当涉及嵌合抗原受体细胞疗法时，所述肿瘤优选地包括血液肿瘤，包括转移性癌症、复发性或难治性癌症；例如所述肿瘤选自淋巴瘤。

在如上所述的方法和用途的某些实施方案中，当涉及肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)疗法时，所述肿瘤优选地包括实体瘤，包括转移性癌症、复发性或难治性癌症；例如所述肿瘤选自黑色素瘤、肾细胞癌、非小细胞肺癌、淋巴瘤、头颈部鳞状细胞癌、尿路上皮癌、卵巢癌、胃癌和乳腺癌。

在如上所述的方法和用途的某些实施方案中，所述受试者为哺乳动物，例如人。

在如上所述的方法和用途的某些实施方案中，第七方面所述的免疫细胞、第八方面所述的免疫细胞群或第十三方面所述的药物组合物可以配制成医学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、锭剂、栓剂、注射剂（包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液）、吸入剂、喷雾剂等。优选剂型取决于预期的给药方式和治疗用途。本发明的组合物或药物组合物应当是无菌的并在生产和储存条件下稳定。一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以

需剂量的活性成分，以及任选地，同时掺入其他期望的成分(包括但不限于，pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，等渗剂、防腐剂、稀释剂，或其任何组合)，随后过滤除菌。此外，可以将无菌注射溶液制备为无菌冻干粉剂(例如，通过真空干燥或冷冻干燥)以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中，例如

5 注射用水(WFI)、抑菌性注射用水(BWFI)、氯化钠溶液(例如 0.9% (w/v)NaCl)、葡萄糖溶液(例如 5%葡萄糖)、含有表面活性剂的溶液(例如 0.01%聚山梨醇 20)、pH 缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲溶液)、Ringer 氏溶液及其任意组合。

在如上所述的方法和用途的某些实施方案中，第七方面所述的免疫细胞、第八方面所述的免疫细胞群或第十三方面所述的药物组合物可以通过本领域已知的任何合适的方法来施用，包括但不限于，口服、口腔、舌下、眼球、局部、肠胃外、直肠、叶鞘内、内胞浆网槽内、腹股沟、膀胱内、局部(如，粉剂、药膏或滴剂)，或鼻腔途径。但是，对于许多治疗用途而言，优选的给药途径/方式是胃肠外给药(例如静脉注射或推注，皮下注射，腹膜内注射，肌内注射)。技术人员应理解，给药途径和/或方式将根据预期目的而发生变化。在某些实施方案中，第七方面所述的免疫细胞、第八方面所述的

10 免疫细胞群或第十三方面所述的药物组合物通过静脉注射或推注给予。

在如上所述的方法和用途的某些实施方案中，第七方面所述的免疫细胞、第八方面所述的免疫细胞群或第十三方面所述的药物组合物可以以剂量单位形式配制以易于施用。剂量单位形式是指适合作为单一剂量用于待治疗对象的物理上离散的单位；每个单位含有预定量的经计算与所需的药物载体联合以产生的期望的治疗效果的活性成分。

20 在如上所述的方法和用途的某些实施方案中，第七方面所述的免疫细胞、第八方面所述的免疫细胞群或第十三方面所述的药物组合物可以单独施用，也可以与另外的药学活性剂(例如抗肿瘤剂)或另外的疗法(例如抗肿瘤疗法)联合施用。

术语定义

25 在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的分子遗传学、核酸化学、细胞培养、生物化学、细胞生物学等操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

当本文使用术语“例如”、“如”、“诸如”、“包括”、“包含”或其变体时，

30 这些术语将不被认为是限制性术语，而将被解释为表示“但不限于”或“不限于”。

除非本文另外指明或根据上下文明显矛盾，否则术语“一个”和“一种”以及“该”和类似指称物在描述本发明的上下文中（尤其在以下权利要求的上下文中）应被解释成覆盖单数和复数。

如本文中所使用的，术语“非天然氨基酸”是指除了天然存在于蛋白质中的 20 种氨基酸以外的氨基酸。非天然氨基酸的非限制性例子包括：N ϵ -2-叠氮乙氧羰基-L-赖氨酸 (NAEK)、对-乙酰基-L-苯丙氨酸、对-碘-L-苯丙氨酸、对-甲氧基苯丙氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、对-炔丙氧基苯丙氨酸、对-炔丙基-苯丙氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAcp-丝氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对-叠氮基-L-苯丙氨酸、对-酰基-L-苯丙氨酸、对-苯甲酰基-L-苯丙氨酸、对-硼苯丙氨酸、O-炔丙基酪氨酸、L-磷酸丝氨酸、膦酰丝氨酸、膦酰酪氨酸、对-溴苯丙氨酸、硒代半胱氨酸、对-氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、酪氨酸氨基酸的非天然类似物；谷氨酰胺氨基酸的非天然类似物；苯丙氨酸氨基酸的非天然类似物；丝氨酸氨基酸的非天然类似物；苏氨酸氨基酸的非天然类似物；烷基、芳基、酰基、叠氮基、氰基、卤素、肼、酰肼、羟基、烯基、炔基、醚、硫醇、磺酰基、硒基、酯、硫代酸、硼酸酯(borate)、硼酸酯(boronate)、磷酸基、膦酰基、膦、杂环、烯酮、亚胺、醛、羟胺、酮基或氨基取代的氨基酸或其组合；具有光可激活的交联剂的氨基酸；自旋标记的氨基酸；荧光氨基酸；金属结合氨基酸；含有金属的氨基酸；放射性氨基酸；光笼化和/或光可异构的氨基酸；含有生物素或生物素类似物的氨基酸；含有酮基的氨基酸；包含聚乙二醇或聚醚的氨基酸；重原子取代的氨基酸；化学可裂解或光可裂解的氨基酸；具有延长侧链的氨基酸；含有毒性基团的氨基酸；糖取代的氨基酸；碳连接的含糖氨基酸；氧化还原活性氨基酸；含有 α -羟基的酸；氨基硫代酸； α,α 二取代的氨基酸； β -氨基酸；除了脯氨酸或组氨酸以外的环状氨基酸；以及除了苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸以外的芳香族氨基酸。

在一些实施方案中，非天然氨基酸包含选择性反应基团，或用于位点选择性标记靶多肽的反应基团。化学反应可以是双正交反应(例如，生物相容性和选择性反应)，Cu(I)催化或“无铜”炔-叠氮三唑形成反应、施陶丁格连接(Staudinger ligation)、反电子需求的迪尔斯-阿尔德(inverse-electron-demand Diels-Alder, IEDDA)反应、“光-点击”化学或金属介导的过程(如烯烃复分解和 Suzuki-Miyaura 或 Sonogashira 交叉偶联)等。

如本文中所使用的，术语“载体(vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载

体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或 P1 来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如 SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。在某些实施方案中，所述宿主细胞包括大肠杆菌。

如本文中使用的，术语“嵌合抗原受体(CAR)”是指包含至少一个细胞外抗原结合结构域、任选的间隔结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域的重组多肽构建体，其将针对目的抗原(例如肿瘤抗原)的基于抗体的特异性与免疫效应细胞活化胞内结构域组合以展现针对表达该目的抗原细胞(如肿瘤细胞)的特异性免疫活性。在本发明中，表述“表达 CAR 的免疫细胞”是指表达 CAR 并且具有由该 CAR 的靶向结构域决定的抗原特异性的免疫细胞。

如本文中使用的，术语“胞外抗原结合结构域”是指能够特异性结合目的抗原或受体的多肽。该结构域将能够与细胞表面分子相互作用。例如，可以选择胞外抗原结合结构域来识别作为与特定疾病状态相关的靶细胞细胞表面标志物的抗原。典型地，所述胞外抗原结合结构域是抗体衍生的靶向结构域。

如本文中使用的，术语“胞内信号传导结构域”是指传导效应信号功能信号并引导细胞进行专门的功能的蛋白质部分。因此，胞内信号传导结构域具有激活表达 CAR 的免疫效应细胞的至少一种正常效应子功能的能力。例如，T 细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或辅助活性，包括细胞因子的分泌。

如本文中使用的，术语“初级信号传导结构域”是指能够以刺激方式或以抑制方式调节 TCR 复合物的初级活化的蛋白质部分。以刺激方式作用的初级信号传导结构域通常含有已知为基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)的信号传导基序。含有特别用于本

发明中的初级信号传导结构域的 ITAM 的非限制性实例包括衍生自 TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、DAP10、CD79a、CD79b 和 CD66d 的那些。

如本文中使用的，术语“共刺激信号传导结构域”是指共刺激分子的胞内信号传导结构域。共刺激分子是除抗原受体或 Fc 受体以外的在结合到抗原后提供 T 淋巴细胞的高效活化和功能所需的第二信号的细胞表面分子。所述共刺激分子的非限制性实例包括 CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1) CD270(HVEM)、CD278(ICOS)、DAP10。

如本文中使用的，术语“免疫细胞”是指具有一种或多种效应功能(例如，细胞毒性细胞杀伤活性、细胞因子的分泌、ADCC 和/或 CDC 的诱导)的免疫系统的任何细胞。典型地，免疫细胞是具有造血的起源并在免疫应答中起作用的细胞。在某些实施方案中，免疫细胞是指免疫效应细胞。术语“效应功能”指免疫效应细胞的特化功能，例如增强或促进对靶细胞的免疫攻击(例如对靶细胞的杀伤，或者抑制其生长或增殖)的功能或反应。T 细胞的效应功能，例如，可以是细胞溶解活性或者辅助或者包括细胞因子的分泌在内的活性。免疫效应细胞的实例包括 T 细胞(例如 α/β T 细胞和 γ/δ T 细胞)、B 细胞、天然杀伤(NK)细胞、天然杀伤 T(NKT)细胞、肥大细胞和骨髓来源巨噬细胞。

可用于本文所述的 CAR 的示例性免疫效应细胞包括 T 淋巴细胞。术语“T 细胞”或“T 淋巴细胞”是本领域公知的并且意图包括胸腺细胞、未成熟的 T 淋巴细胞、成熟 T 淋巴细胞、静息 T 淋巴细胞或活化的 T 淋巴细胞。T 细胞可以是 T 辅助(Th)细胞，例如 T 辅助 1(Th1)或 T 辅助 2(Th2)细胞。T 细胞可以是辅助 T 细胞(HTL; CD4T 细胞)CD4T 细胞、细胞毒性 T 细胞(CTL; CD8T 细胞)、CD4CD8T 细胞、CD4CD8T 细胞或任何其它 T 细胞子组。在某些实施方案中，T 细胞可以包括原初 T 细胞和记忆 T 细胞。

本发明所述的免疫细胞可以是自身的/自体的(“自我”)或非自身的(“非自我”，例如同种异体的、同基因的或异基因的)。如本文中使用的，“自身的”是指来自同一受试者的细胞；“同种异体的”是指与比较细胞遗传不同的同一物种的细胞；“同基因的”是指与比较细胞遗传相同的来自不同受试者的细胞；“异基因的”是指与比较细胞来自不同物种的细胞。在优选实施例中，本发明的细胞是同种异体的。

如本文中使用的，术语“抗体”是指，通常由两对多肽链(每对具有一条轻链(LC)和一条重链(HC))组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ (kappa) 和 λ

(λ) 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应子功能，如可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成抗原结合部位。氨基酸在各区域或结构域的分配可遵循 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。

如本文中使用的，术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽，其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力，和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合，其也被称为“抗原结合部分”。通常参见，Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989)), 其以其全文通过引用合并入本文，用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。抗原结合片段的非限制性实例包括 Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、二硫键连接的 Fv、scFv、di-scFv、(scFv)₂ 和这样的多肽，其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

如本文中所使用的，术语“Fab 片段”意指由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的抗体片段；术语“F(ab')₂ 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段；术语“Fab' 片段”意指还原连接 F(ab')₂ 片段中两个重链片段的二硫键后所获片段，由一条完整的轻链和重链的 Fd 片段(由 VH 和 CH1 结构域组成)组成。

如本文中所使用的，术语“Fv”意指由抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域组成的抗体片段。Fv 片段通常被认为是，能形成完整的抗原结合位点的最小抗体片段。一般认为，六个 CDR 赋予抗体的抗原结合特异性。然而，即便是一个可变区(例如 Fd 片段，其仅仅含有三个对抗原特异的 CDR)也能够识别并结合抗原，尽管其亲和力可能低于完整的

结合位点。

如本文中所使用的，术语“scFv”是指，包含 VL 和 VH 结构域的单个多肽链，其中所述 VL 和 VH 通过接头（linker）相连。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH₂-VL-接头-VH-COOH 或 NH₂-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄的接头。在一些情况下，scFv 的 VH 与 VL 之间还可以存在二硫键。在本发明的某些实施方案中，scFv 可形成 di-scFv，其指的是两个或两个以上单个 scFv 串联而形成抗体。在本发明的某些实施方案中，scFv 可形成(scFv)₂，其指的是两个或两个以上单个 scFv 并联而形成抗体。

如本文中所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的(参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995)，并且包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，稀释剂，维持渗透压的试剂，延迟吸收的试剂，防腐剂。例如，pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液。表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 Tween-80。离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂，例如对羟苯甲酸酯，三氯叔丁醇，苯酚，山梨酸等。维持渗透压的试剂包括但不限于糖、NaCl 及其类似物。延迟吸收的试剂包括但不限于单硬脂酸盐和明胶。稀释剂包括但不限于水，水性缓冲液(如缓冲盐水)，醇和多元醇(如甘油)等。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂，例如硫柳汞，2-苯氧乙醇，对羟苯甲酸酯，三氯叔丁醇，苯酚，山梨酸等。稳定剂具有本领域技术人员通常理解的含义，其能够稳定药物中的活性成分的期望活性，包括但不限于谷氨酸钠，明胶，SPGA，糖类（如山梨醇，甘露醇，淀粉，蔗糖，乳糖，葡聚糖，或葡萄糖），氨基酸（如谷氨酸，甘氨酸），蛋白质（如干燥乳清，白蛋白或酪蛋白）或其降解产物（如乳白蛋白水解物）等。

如本文中所使用的，术语“预防”是指，为了阻止或延迟疾病或病症或症状在受试者体内的发生而实施的方法。如本文中所使用的，术语“治疗”是指，为了获得有益或所需临床结果而实施的方法。为了本发明的目的，有益或所需的临床结果包括(但不限于)减轻症状、缩小疾病的范围、稳定(即，不再恶化)疾病的状态，延迟或减缓疾病的发展、改善或减轻疾病的状态、和缓解症状(无论部分或全部)，无论是可检测或是不可检测的。此外，“治疗”还可以指，与期望的存活期相比(如果未接受治疗)，延长存活期。

如本文中使用的，术语“受试者”是指哺乳动物，例如灵长类哺乳动物，例如人。在某些实施方案中，所述受试者（例如人）患有肿瘤。

发明的有益效果

5 本发明对 IL2 进行特异位点选择性的聚乙二醇（PEG）修饰，获得了包含第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的组合，其中第一定点修饰的 IL-2 对 IL2-R α 受体具有阻断作用，对 IL2-R $\beta\gamma$ 受体具有选择性，可以优先激活 Teff、CTL 及 NK 细胞而降低激活 Treg，此外它还诱导减少的 CD8+细胞的终末分化和耗竭，提高中央记忆细胞的比例和数量；第二定点修饰的 IL-2 具有阻断 IL2-R β 但不阻断 IL2-R α 的作用，可以与细胞
10 分泌的内源性 IL2 竞争 IL2-R α ，竞争抑制内源性 IL2 激活 Treg 的作用。两者的联合在保留第一定点修饰的 IL-2 的中央记忆细胞激活优势的情况下，又能弥补第一定点修饰的 IL-2 对于细胞激活之后耗竭程度增加的劣势，更好地发挥抗肿瘤治疗效果。本发明提供的组合具有显著的协同的增强免疫应答和抗肿瘤作用，此外还可以在过继性细胞治疗中将淋巴细胞的命运导向长期免疫，具有重要临床价值。

15 下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将理解，下列附图和实施例仅用于说明本发明，而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述，本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员来说将变得显然。

20 附图说明

图 1: PEG 化 IL-2 变体 Y45-20K 和 D20-20K 的考马斯蓝染色结果。

图 2: PEG 化 IL-2 变体对 IL-2 受体不同亚基的表面等离子共振(SPR)亲和力测定结果。

25 图 3: PEG 化 IL-2 变体 Y45-20K 和 D20-20K 处理后细胞磷酸化 STAT5 (pSTAT5)水平测定结果。

图 4: PEG 化 IL-2 变体 Y45-20K 和 D20-20K 的 PK/PD 特性分析结果。

图 5: D20-20K 对 Y45-20K 介导的体外 T 细胞增殖、活化的影响。

图 6: D20-20K 对 Y45-20K 介导的健康小鼠体内 T 增殖、活化的影响。

30 图 7: D20-20K 与 Y45-20K 联合在小鼠肿瘤模型中的抗肿瘤作用。

图 8: D20-20K 与 Y45-20K 联合对荷瘤小鼠淋巴结中 T 细胞亚群的影响。

图 9: D20-20K 与 Y45-20K 联合对血管渗漏综合征(VLS)的影响。

图 10: D20-20K 与 Y45-20K 联合对 CAR-T 细胞体外培养增殖的影响。

图 11: D20-20K 与 Y45-20K 联合对 CAR-T 细胞体外培养衰老、耗竭的影响。

5 图 12: D20-20K 与 Y45-20K 联合对 CAR-T 细胞体外培养中不同分化阶段的 T 细胞的衰老、耗竭的影响。

图 13: none- α 变体 (Y45-20K) 与多种 none- β 变体联用对 CD8 和 CD4 T 细胞的影响。图 13a: 免疫检查点 PD-1 和 TIM-3 的表达情况; 图 13b: 效应细胞因子 Perforin, Granzyme B 以及 IFN- γ 的表达情况; 图 13c: 凋亡相关生物标志物的表达 CD57、IL-10 表达情况。

图 14: none- β 变体 (D20-20K) 与多种 none- α 变体联用对 CD8 和 CD4 T 细胞的影响。图 14a: 免疫检查点 PD-1 和 TIM-3 的表达情况; 图 14b: 效应细胞因子 Perforin, Granzyme B 以及 IFN- γ 的表达情况; 图 14c: 凋亡相关生物标志物的表达 CD57、IL-10 表达情况。

序列信息

本发明涉及的部分序列的信息提供于下面的表 1 中。

表 1: 序列的描述

SEQ ID NO:	描述	序列信息
1	野生型 IL-2 蛋白序列	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINIVLELELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII STLT
2	野生型 IL-2 核酸序列	GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAAGTGG AGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAA TAATTACAAGAATCCCAAACTCACCAGGATGCTCACATTTAAG TTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGT GTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTT AGCTCAAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATC AGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAAGTAAAGGGATCTGAAA CAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGT AGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATC TCAACACTAAGTTGA
3	Y45 突变蛋白序列	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK F X MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINIVLELELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII STLT
4	Y45 突变核酸序列	GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAAGTGG

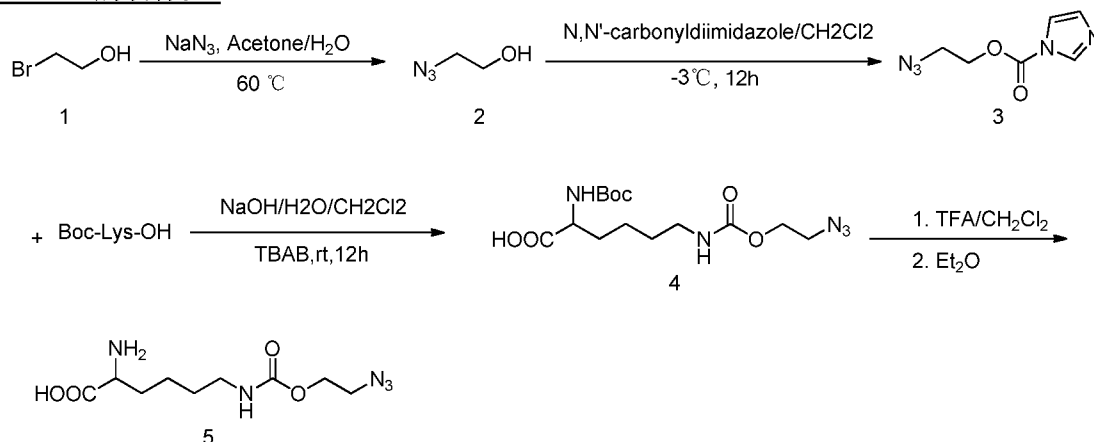
		AGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAA TAATTACAAGAATCCCAAACCTACCAGGATGCTCACATTTAAG TTTTAGATGCCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGT GTCTAGAAGAAGAAGCTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTT AGCTCAAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATC AGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAAGTAAAGGGATCTGAAA CAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGT AGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATC TCAACACTAACTTGA
5	D20 突变蛋白序列	APTSSSTKKTQLQLEHLLLXLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII STLT
6	D20 突变核酸序列	GCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGG AGCATTTACTGCTGTAGTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAA TAATTACAAGAATCCCAAACCTACCAGGATGCTCACATTTAAG TTTTAGATGCCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGT GTCTAGAAGAAGAAGCTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTT AGCTCAAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATC AGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAAGTAAAGGGATCTGAAA CAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGT AGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATC TCAACACTAACTTGA
7	CD19-CAR VH 核酸序 列	GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTC TGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACAT TAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAC GTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAG TCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTC TCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTAC TTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGG GGACCAAGCTGGAGATCACA
8	CD19-CAR VH 蛋白序 列	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT
9	CD19-CAR VL 核酸序 列	GAGGTGAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCT CACAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATT ACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTGCGCCAGCCTCCACGAAAG GGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACAT ACTATAATTCACTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGA CAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAA ACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACT ACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTC AGTCACCGTCTCCTCA
10	CD19-CAR VL 蛋白序 列	EVKLQESGPGVLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS
11	CD19-CAR scFv 核酸 序列	GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTC TGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACAT TAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAC GTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAG

		TCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTC TCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTAC TTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGG GGACCAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGG TGGGTCTGGGTGGCGCGGATCTGAGGTGAAACTGCAGGAGTCA GGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACAT GCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTG GATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTA ATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTACAGCTCTCAAAT CCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTT CTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCATTTAC TACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGG ACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
12	CD19-CAR scFv 蛋白 序列	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGSGGGGSGGGGSEVKLQES GPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VWGSSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS
13	CD8a 铰链区核酸序列	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCA TCGCGTCGCGAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCC AGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCC TGTGAT
14	CD8a 铰链区蛋白序列	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CD
15	CD28 跨膜/胞内区核酸 序列	TTCTGGGTGCTGGTTCGTTGTGGGCGGCGTCTGGCCTGCTACA GCCTGCTGGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAGGAG CAAGCGGAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACC CCCCGGAGGCTGGCCCCACCCGGAAGCACTACCAGCCCTACG CCCCTCCCAGGGATTTGCGCGCCTACCGGAGC
16	CD28 跨膜/胞内区蛋白 序列	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
17	4-1BB 胞质结构域核酸 序列	AAACGGGGCAGAAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT TTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAG CTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACTG
18	4-1BB 胞质结构域蛋白 序列	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL
19	CD3z 胞质结构域核酸 序列	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACAAGC AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAG AGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCT GAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCC TGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAG TGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCAC GATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCT ACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
20	CD3z 胞质结构域蛋白 序列	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

NAEK的合成:



将 2-溴乙醇(8g,64mmol)和叠氮钠(6.24g, 96mmol)室温下加入丙酮(60ml)和水(30ml)中。反应混合液 60°C 回流 10h，冷却至室温，真空蒸发除去丙酮。残留物用二乙基乙醚提取。有机层用盐水洗两次，然后用 Na_2SO_4 干燥，过滤，蒸发，得到 2-叠氮乙醇(化合物 2)，产率 99%(5.5g, 63.2mmol)，不用进一步纯化。

化合物 2 (5.5g, 63.2mmol)溶于二氯甲烷(120ml)得到的溶液在 -3°C 条件下缓慢加入溶于二氯甲烷(55ml)的 $\text{N,N}'\text{-羰基二咪唑}$ (15.36g,94.8mmol)悬浮液中。搅拌条件下反应 12 小时。然后加入 200mL 水，有机层用盐水先后洗两次，然后用 Na_2SO_4 干燥，过滤并在真空条件下浓缩。残留物进一步用二氧化硅凝胶层析纯化， PE/EtOAc (1:1)洗脱，得到呈无色油状物的化合物 3(10.7g, 59mmol)，产率 93%。

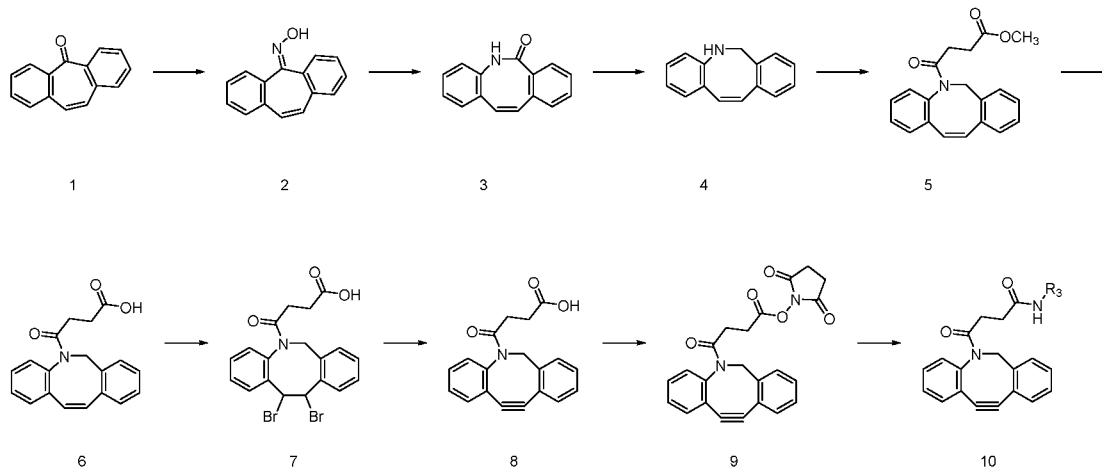
化合物 3(10.7g, 59mmol)溶于二氯甲烷(100ml)得到的溶液在室温下加入溶于 1M NaOH (50ml) 水溶液的 Boc-Lys-OH (12.2g, 49.2mmol)溶液中。接着加入 TBAB (0.16g, 0.01eq)。反应混合液在搅拌条件下反应 12 小时，冷却至 0°C ，然后用冰浴的 1M HCl 水溶液调 pH 值至 2-3。水相用 DCM 提取，有机层用盐水先后洗两次。然后有机层用 Na_2SO_4 干燥，过滤并在真空条件下浓缩。残留物进一步用二氧化硅凝胶层析纯化， $\text{PE}/\text{EtOAc}/\text{HAc}$ (100:100:1) 洗脱，得到呈无色油状物的化合物 4(15.1g, 41.94mmol)，产

率 85%。

化合物 4(15.1g, 41.94mmol)溶于二氯甲烷(80ml)中, 然后缓慢加入三氟乙酸(20ml)。反应液在室温下搅拌反应 0.5 小时, 然后在真空条件下蒸发除去溶剂。残留物重溶于甲醇(5ml)中, 并在乙醚中沉淀。收集沉淀物在真空条件下干燥, 得到呈白色固体的

5 化合物 5(6.63g, 25.58mmol), 即 NAEK, 产率 61%。

DBCO-PEG 的合成:



将化合物 1, 10g (48mmol) 盐酸羟胺 16.8g (240mmol) 溶于无水乙醇中, 加入

10 26ml 吡啶, 加热回流 36h, 冷切后, 加入 25ml 乙酸乙酯, 加入 125ml 1NHCl 搅拌 0.5h, 分离有机层, 用饱和 NaCl 溶液洗涤有机层, 有几层干燥后浓缩得白色固体化合物 2, 收率: 100%。

将 6.25g 五氧化二磷溶于 50ml 甲烷磺酸中, 搅拌溶解备用。将上述产物加到 10g

15 化合物 2 中, 100 度搅拌 1.5h。反应液冷却后, 倒入 300ml 水中, 析出固体, 抽滤烘干, 干燥后固体用乙醚打浆, 抽滤, 烘干得白色固体化合物 3, 收率: 100%。

160ml 乙醚冷却到 0 度, 分批加入 5.5g 氢化铝锂, 之后分批加入 4g 化合物 3, 35

度回流 72h。反应液冷却至 0 度, 加入 14.8ml 饱和硫酸钠溶液猝灭, 过滤, 浓缩得黄色固体化合物 4, 收率 98%。

766mg 琥珀酸单甲酯溶于 15ml 二氯甲烷, 冷却至 0 度后, 滴入 610ul 草酰氯, 室

20 温搅拌 1h。浓缩备用。将 1g 化合物 4 溶于 15ml 二氯甲烷中, 加入 1.16ml 吡啶, 冷却至 0 度后滴入琥珀酰氯单甲酯, 室温搅拌 0.5h, 有机相经 1NHCl 洗, 1NNaOH 洗, NaCl 洗涤后, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩得黄色固体化合物 5。收率: 99%。

将化合物 5 溶于甲醇/水 (体积比=2: 1) 中, 室温下加入 6 当量氢氧化锂, 室温搅

拌 8h, 旋干甲醇, 加入水溶解, 水相经二氯甲烷洗涤, 水相用 1NHCl 调 PH=2-3, 水相

再经二氯甲烷萃取萃取，有机相用饱和 NaCl 溶液洗涤，旋干得黄色油状物化合物 6，收率：98%。

将 1.4g 化合物 6 溶于 50ml 二氯甲烷中，冷却至 0 度，将 2.2g 液素溶于二氯甲烷后滴入，室温搅拌 3h，加入 50ml 饱和硫代硫酸钠溶液，分离有机层用饱和 NaCl 溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，旋干得淡黄固体化合物 7，收率：95%。

将 2.1g 化合物 7 溶于 40ml 无水四氢呋喃中，冷却至-40 度，将制成 1M 叔丁醇钾的四氢呋喃溶液滴入，搅拌 1h，加入 1MHCl 溶液淬灭，至 pH=2-3，用二氯甲烷萃取，有机层浓缩后经柱层析分离，得粉白色固体化合物 8，收率：80%。

将 1.1g 化合物 8 溶于 20ml 二氯甲烷，加入 495mg N-羟基琥珀酰亚胺，825mg EDCI，室温搅拌 1h，反应液经水洗涤，饱和 NaCl 溶液洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩后得淡黄色固体化合物 9，收率：100%。

将 2g NH₂-PEG_{20k}-OMe 溶于 25ml 二氯甲烷中，加入 40mg 化合物 9，室温搅拌 1h，旋干有机相，残留物经乙醚洗涤后经柱层析分离得化合物 10，收率 85%。

实施例 1：定点突变 IL-2 蛋白表达质粒的构建及表达

(1)突变位点的选择

在 IL-2 蛋白 (SEQ ID NO: 1) 上选择了如下所示的突变位点，其中所述的位置是在 SEQ ID NO: 1 中的位置。

表 2：突变位点

蛋白名称	氨基酸位置	氨基酸	突变前密码子	突变后密码子
Y45	45	Y	TAC	TAG
D20	20	D	GAT	TAG

(2)包含非天然氨基酸的定点突变蛋白的表达

合成上述包含密码子置换的核酸序列连接编码 His 标签的核酸序列并克隆到 pET-21a(+) (addgene: #69740-3) 大肠杆菌质粒表达载体中，该载体与 pSURAR-YAV 质粒共转染到 TransB (DE3)菌株 (购自全式金，目录号：CD811-02) 中。其中，pSURAR-YAV 质粒编码琥珀密码子抑制型 tRNA 和 NAEK 特异性氨酰 tRNA 合成酶，通过与包含 TAG 密码子的核酸序列共转染，可以在特定位点引入非天然氨基酸 NAEK；pSURAR-YAV 质粒是指从保藏地址为中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心 (北京市朝阳区北辰西路 1 号院，中国科学院微生物研究所)、保藏日期为 2013 年 4 月 8 日、保藏号为 CGMCC No: 7432 的分类命名为大肠埃希氏菌的含有质粒 pSUPAR-YAV-tRNA/PylRS

的大肠埃希氏菌中获取的质粒 pSUPAR-YAV-tRNA/PyIRS。将转化后的菌株接种到含有 100 ug/ml 氨苄青霉素、34 ug/ml 氯霉素的 2ml LB 培养基中，然后在 37°C、220rpm 培养。将过夜培养物在 2×YT 培养基中稀释至光密度，并在 37°C 下培养培养物，直至 A600nm 达到约 1.5。添加最终浓度为 1 mM 的 UAA (NAEK, 实验室自行合成)，然后
5 通过添加最终浓度分别为 0.5 mM 和 0.1% 的异丙基 β-d-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)和 L 阿拉伯糖诱导蛋白质表达，半小时后，温度降至 20°C。表达约 18 小时后，通过离心收获细胞并重悬于 His-Bind 缓冲液 (20 mM 磷酸盐, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM 咪唑) 中。通过使细胞在 1200 bar 和冷却的条件下通过 Microfluidizer 两次来提取蛋白。然后在 20,000g 下离心 20 分钟，收集上清液并在 -80°C 下冷冻保存直至进一步处理。由此
10 获得在第 Y45 位或第 D20 位被替换为非天然氨基酸的定点突变 IL-2 蛋白。

实施例 2: 定点突变 IL-2 蛋白的 PEG 修饰

实施例 1 中获得的上清液通过 Ni-NTA 琼脂糖(R90101, Invitrogen)进行初步纯化，然后进行点击反应。为了生产定点 PEG 化的 IL-2 类似物，使用 Ni-NTA His-Bind Resin
15 (Invitrogen)富集上清液中带 His 标签的 IL-2，并合成 DBCO-PEG 然后将其添加到洗脱缓冲液 (20 mM 磷酸盐, pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM 咪唑) 中，最终浓度为 1 mM。反应在 4°C 下进行，同时轻轻摇动 2 小时。然后通过阳离子交换色谱法 (Resource S, GE Healthcare) 和 FPLC 尺寸排阻色谱法 (Superdex 200 increase 10/300 GL, GE Healthcare) 纯化 PEG 化的 IL-2，以去除未反应的 PEG 和 IL-2。使用 3 kDa centrifugal
20 filter unit(Millipore)收集主洗脱峰、浓缩并缓冲液交换到 PBS 缓冲液中。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 在变性条件下用考马斯蓝染色检查 PEG 化反应产物纯度。分别获得两种 PEG 化 IL-2 衍生物，分别命名为 Y45-20K 和 D20-20K。电泳结果如图 1 所示，PEG 化的 IL-2 变体纯度超过 95%。

此外，通过实施例 1-2 所述的方法还制备获得了下述 PEG 化 IL-2 衍生物：H16-
25 20K、A73-20K、H79-20K、F42-20K、E62-20K、K64-20K、P65-20K、E68-20K、K35-20K、T37-20K、R38-20K、T41-20K、K48-20K、K49-20K。本申请中所涉及的 PEG 化 IL-2 变体的命名方式为：[与 SEQ ID NO: 1 相比突变为非天然氨基酸的位置]-[所连接的 PEG 基团的平均分子量]。以 Y45-20K 为例，其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 1 相比差异在于 Y45 被置换为非天然氨基酸 NAEK，并且该位置进一步连接平均分子量为 20kDa 的
30 PEG 基团。

实施例 3：与 IL-2 受体的结合活性测定

本实施例通过表面等离子共振(SPR)评估 PEG 化 IL-2 衍生物对 IL-2R 三聚体和二聚体复合物的亲和力。人 IL-2R α 、IL-2R β 和 IL-2R γ 受体被固定在 CM5 或蛋白 A 芯片上，用于在 Biacore 8K 系统 (GE Healthcare) 上进行分析。人 IL-2R α (C-末端 6xHis)、IL-2R β (C-末端 Fc) 和 IL-2R γ (C-末端 6xHis) 的胞外结构域购自义翘神州。所有动力学实验均在 25°C 下使用 10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05% Surfactant P、pH 7.4 (运行缓冲液) 进行。使用 Biacore 8K 评估软件分析数据，并使用 1:1 稳定亲和力模型拟合数据以确定 KD 值和其他动力学参数。使用 BCA 法 (Pierce) 测量蛋白浓度。其中，以天然 IL-2 蛋白 (买自 PeproTech 货号: 96-200-02-1000) 作为对照。所有样品的浓度均为没有连接 PEG 的 IL-2 的质量。

结果如图 2 所示，其中 NA 为没有结合力。结果显示，D20-20K、H16-20K、A73-20K、H79-20K 对 β 亚基无亲和力，对二聚体 IL-2R 的结合亲和力显著降低，但维持对三聚体 IL-2R 的 α 链的结合，具有对非 β 受体 (non- β) 的偏向性，可称为 non- β PEGylate。Y45-20K、F42-20K、E62-20K、K64-20K、P65-20K、E68-20K 与 α 无结合，对三聚体 IL-2R 的结合亲和力完全消除，维持对二聚体 IL-2R 的结合，具有对非 α 受体 (non- α) 的偏向性，可称为 non- α PEGylate；K35-20K、T37-20K、R38-20K、T41-20K、K48-20K、K49-20K 对 α 的结合力数量级在 $1e-7 \sim 1e-6$ ，为弱结合，但对二聚体 IL-2R 的结合亲和力明显高于三聚体 IL-2R，或者虽然对二聚体 IL-2R 的结合亲和力弱于三聚体 IL-2R，但两者之间的差距 (例如比值) 显著小于天然 IL-2 对二聚体 IL-2R 和三聚体 IL-2R 的结合亲和力的差距，具有明显改善的对二聚体 IL-2R 的偏向性，因此也属于具有对非 α 受体 (non- α) 的偏向性，可称为 non- α PEGylate。

实施例 4：Y45-20K 及 D20-20K 对 CD8⁺T 细胞和 Treg 细胞激活倾向性测定

本实施例通过测定磷酸化 STAT5(pSTAT5)的水平 (IL-2R 信号传导的关键下游介质) 来确定 PEG 化 IL-2 变体 Y45-20K 或 D20-20K 是否优先激活 CD8⁺T 细胞而不是 Treg 细胞。将大约 2×10^5 YT-1 细胞 (表达 CD122 和 CD132 受体)、CD25⁺YT-1 (YT-1 细胞经慢病毒转导稳定表达 CD25 受体的稳转细胞系)、人 PBMC 细胞分别接种在 96 孔板中，并重悬在 RPMI 完全培养基中，所述培养基包含连续稀释的天然人 IL-2 或 PEG 化 IL-2。细胞在 37°C 下刺激 15 分钟，然后立即通过加入甲醛至 2.0% 并在室温下

孵育 15 分钟来固定。通过在 4°C 下在冰冷的 87% 甲醇中悬浮 30 分钟来实现细胞的透化。固定和透化的细胞用 FACS 缓冲液洗涤两次，并用以下抗体染色用于流式细胞术分析：抗人 CD3-APC/Cy7、CD4-PE/Cy7、CD8-FITC、CD25-APC、CD127-PE、CD56/CD16-Brilliant Violet 605、pSTAT5-Pacific Blue（均购自 biolegend）。对于 hPBMC 特定亚群中的 pSTAT5 测定，根据制造商的说明，使用磁分离试剂盒 (MiltenyiBiotec) 分离纯化的细胞群，分别获得记忆 CD4+T 细胞 (MPCD4)、记忆 CD8+T 细胞 (MPCD8)、NK 细胞和 Treg 细胞。

所有 FACS 抗体均以 1:50 的稀释度使用。然后将细胞在染色缓冲液中洗涤两次，并在 CytoFLEX 流式细胞仪(Beckman-Coulter)上测定平均荧光强度(MFI)。数据绘制为减去背景的 MFI，归一化为每种细胞类型的最大信号(IL-2, 1 µg ml⁻¹)。背景定义为未经刺激的细胞中的 pSTAT5 MFI。Treg 细胞定义为 CD3+CD8-CD4+CD25^{high}CD127^{low}；NK 细胞定义为 CD3-CD16+CD56+；CD8+T 细胞定义为 CD3+CD4-CD8+；MPCD4 细胞定义为 CD3+CD4+CD8-CD45RO+；MPCD8 细胞定义为 CD3+CD4-CD8+CD56-CD57-CD45RA-。在减去未经刺激细胞的 MFI 并归一化为最大信号强度后，使用 GraphPad Prism 数据分析软件将剂量反应曲线拟合为 logistic 模型，并计算半数最大有效浓度 (EC50 值) 和相应的 95% 置信区间。实验按照一式三份进行，并重复三次，所得结果相似。

使用 NK 衍生的 YT-1 细胞及 CD25+YT-1 细胞模型进行检测的结果如图 3a 所示，其中 Y45-20K 在 CD25(IL-2R α)-和 CD25(IL-2R α)+YT-1 细胞上表现出显著的区别，与野生型 IL-2 明显不同；D20-20K 在非常高的剂量下仍仅显示基线水平的 Treg 刺激活性 (pSTAT5 激活的 5-20%)，这与其与 β 亚基不能结合有关。

此外，使用从健康供体 PBMC 中分离的各种免疫细胞亚群中重新评估了 PEG 化 IL-2 变体对 T_{eff} 细胞的选择性激活，结果如图 3b。我们发现 IL-2 在所有测试剂量下都刺激 Treg 和记忆 CD4+T、记忆 CD8+T 和 NK 细胞，而 Y45-20K 优先在记忆 CD4+、记忆 CD8+和 NK 细胞中诱导 STAT5 磷酸化，但不是 Treg 细胞。D20-20K 在记忆 CD4+、记忆 CD8+、NK 和 Treg 细胞中均不诱导 STAT5 磷酸化。

上述结果与结合亲和力评估的结果一致，表明通过阻断受体结合位点的特定区域可以解除 IL-2 的多效性，并且 Y45-20K 由于完全缺乏对 IL-2R α 结合具有优先刺激 T_{eff}s 而不是 Treg 细胞的理想能力，而 D20-20K 对于 CD8+T 和 Treg 细胞的活化均显著降低。

实施例 5: PEG 化 IL-2 变体 Y45-20K/D20-20K 的 PK/PD 特性分析

本实施例考察 PEG 化 IL-2 变体的药代动力学特性。选择平均体重约为 20g 的雌性 C57BL/6 小鼠（购自北京维通利华实验动物技术有限公司），将小鼠随机分为不同组（n=3）并通过皮下注射注射 PBS、野生型人 IL-2 或 PEG 化 IL-2 变体（0.25 mg/kg，基于 hIL-2）。在选定的时间点（30min、2h、4 h、8 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h），从小鼠眼窝静脉中取血（每次 100 μ L），然后在 4°C 以 4000 g 离心 15 分钟。分离血浆并储存在 -80°C。使用人 IL-2 ELISA 试剂盒（Sinobiological）测定 IL-2 的浓度。药代动力学参数通过 Kinetica 5.1 软件进行分析，以平均值 $\pm$ 标准差表示。

结果如图 4 所示，与野生型 IL-2 相比，PEG 化 IL-2 变体具有增加的清除半衰期 (T_{1/2})、增强的血液浓度维持（药物浓度下面积与时间曲线，AUC），并且平均停留时间 (MRT) 增加，峰值时间比 IL-2 长 14 倍，表明清除率大幅降低。上述结果表明，Y45-20K 具有优越的药代动力学特性。此外，D20-20K 也具有优越的药代动力学特性。

实施例 6: PEG 化 IL-2 变体 Y45-20K/D20-20K 的抗肿瘤协同增效作用

以上实施例的数据已经证实 Y45-20K 具有优先激活 CD8⁺T 细胞的活性，然而其高剂量下仍然激活 Treg 细胞。如上实施例中已证实的，D20-20K 保持对 IL-2R α 的选择性亲和力同时显著降低了对 CD25⁺YT-1 的激活，该独特特性可能与其与 IL-2R β 的不可检测结合有关，因此，如果将 D20-20K 与 Y45-20K 组合进行治疗，D20-20K 可能在空间上占据 IL-2R α 并竞争性地阻断其与 Y45-20K 的轻度相互作用导致 CD8⁺T 细胞的过度激活及终末分化和对 Treg 的激活。据此，本实施例考察了 D20-20K 与 Y45-20K 的协同抗肿瘤作用。

6.1 D20-20K 对 Y45-20K 介导的体外 T 细胞增殖、活化的影响

实验步骤

本实施例考察 D20-20K 对于 Y45-20K 的激活偏倚是否存在剂量依赖的影响。将 2×10^5 人 PBMC 细胞用 100ul RPMI1640+10%FBS 重悬在 96 孔板中，实验孔中加入 50ul 0.4ug/ml Y45-20K（终浓度 0.1ug/ml），再加入 50ul 不同浓度梯度的 D20-20K，使其终浓度分别为 1ug/ml，0.1ug/ml，0.01ug/ml，0.001ug/ml，设置的重复实验孔分别来自三个不同的健康个体。细胞在 37° C 下培养 72h，然后 FACS 缓冲液洗涤两次，并用以下抗体染色用于流式细胞术分析：抗人 CD3-APC/Cy7、CD4-PE/Cy7、CD8-FITC、CD25-

APC、Foxp3-Pacific Blue, CD69-PE。Treg 细胞定义为 CD3+CD8-CD4+CD25+Foxp3+;CD8+T 细胞定义为 CD3+CD4-CD8+,用流式细胞仪统计 Treg 和 CD8 T 细胞数量以及各自激活标志 (Treg-Foxp3, CD8+ T-CD69) 的平均荧光强度 (MFI)。

5 将 2×10^5 YT-1 细胞、CD25+YT-1 分别接种在 96 孔板中, 用 100ul RPMI1640+10%FBS 重悬在 96 孔板中, 实验孔中加入 50ul 0.4ug/ml Y45-20K (终浓度 0.1ug/ml), 再加入 50ul 不同浓度梯度的 D20-20K, 使其终浓度分别为 1ug/ml, 0.1ug/ml, 0.01ug/ml, 0.001ug/ml。细胞在 37° C 下刺激 15 分钟, 然后立即通过加入甲醛至 2.0%并在室温下孵育 15 分钟来固定。通过在 4° C 下在冰冷的 87%甲醇中悬浮 30
10 分钟来实现细胞的透化。固定和透化的细胞用 FACS 缓冲液洗涤两次, 并用 pSTAT5-Pacific Blue 抗体染色用于流式细胞术分析。抗体以 1:50 的稀释度使用。然后将细胞在染色缓冲液中洗涤两次, 并在 CytoFLEX 流式细胞仪(Beckman-Coulter)上测定平均荧光强度(MFI)。数据绘制为减去背景的 MFI, 归一化为每种细胞类型的最大信号(Y45-20K, 0.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$)。背景定义为未经刺激的细胞中的 pSTAT5 MFI。在减去未经刺激细胞的 MFI
15 并归一化为最大信号强度后, 使用 GraphPad Prism 数据分析软件将剂量反应曲线拟合为 logistic 模型, 并计算半数最大有效浓度 (EC50 值) 和相应的 95%置信区间。实验按照一式三份进行, 并重复三次, 所得结果相似。

结果如图 5 所示, D20-20K 对 Y45-20K 介导的 Treg 细胞而非 CD8+T 细胞的活化和增殖具有剂量依赖性抑制作用 (图 5a, b 为对 Treg 增殖与活化的影响, 图 5c, d 为对
20 CD8+T 增殖与活化的影响)。CD25+YT-1 细胞中的 STAT5 磷酸化被 D20-20K 以剂量依赖性方式抑制, EC50 为 0.39ug/ml (图 5e), 而在天然 YT 细胞中未观察到这种抑制 (图 5f)。

6.2 D20-20K 对 Y45-20K 介导的健康小鼠体内 T 增殖、活化的影响

实验步骤

25 C57BL/6 小鼠 (6 至 8 周龄, 雌性) 后颈部皮下给药 45-20K (0.25 mg/kg x 3, 每隔一天)、20-20K (0.25 mg/kg x 3, 每隔一天)、45-20K 和 20-20K (各 0.25 mg/kg x 3, 每隔一天)、或 IL-2 (0.25 mg/kg 每天 x 5), 等体积 PBS 注射为空白对照组。在给药结束后三天进行脾脏和淋巴结的流式检测。

结果如图 6 所示, 与其他组小鼠相比, Y45-20K/D20-20K 联合治疗的小鼠脾脏中
30 CD8+T 细胞和 MPCD8+T 比例进一步升高, 相比于 Y45-20K 单独使用, Y45-20K/D20-

20K 联合治疗显著性降低 Treg 的增殖。

6.3 D20-20K 与 Y45-20K 在小鼠肿瘤模型中的抗肿瘤作用

C57BL/6 小鼠（6 至 8 周龄）右侧（right flank）皮下植入 B16F10 黑色素瘤细胞（中国科学院细胞库（中国上海），每只动物 5×10^5 ）。当肿瘤达到 1500 mm^3 大小时处死小鼠。肿瘤体积计算如下： $V=a^2*b/2$ ，其中 a 是宽度，b 是肿瘤长度（均以毫米为单位）。植入后 7 天，当肿瘤测量为 100 mm^3 时，给动物施用 45-20K（ $0.25 \text{ mg/kg} \times 3$ ，每隔一天）、20-20K（ $0.25 \text{ mg/kg} \times 3$ ，每隔一天）、45-20K 和 20-20K（各 $0.25 \text{ mg/kg} \times 3$ ，每隔一天）、或 IL-2（ 0.25 mg/kg 每天 $\times 5$ ）。第 14 天，切碎肿瘤并在含有 2mg/ml II 型和 IV 型胶原酶(GIBCO BRL)和 0.5mg/ml DNase(Sigma Aldrich)的缓冲液中在 37°C 下消化 13 分钟，形成单细胞悬液，随后通过流式细胞术确定肿瘤微环境中免疫细胞亚型。在给药后 14 天对冷冻肿瘤切片进行 T 细胞密度的免疫组织化学分析。

结果如图 7 所示，Y45-20K 与 D20-20K 治疗组合表现出非常突出的抗肿瘤作用，肿瘤负荷明显减少，小鼠存活率显著延长（图 7a）。随着肿瘤负荷的降低，与其他小鼠相比，Y45-20K/D20-20K 联合治疗的小鼠在脾脏、肿瘤引流淋巴结(TDLN)和特别是肿瘤组织中的 CD8+T 细胞比例增加，但 Treg 细胞比例无明显变化（图 7b）。该结果与免疫组织化学染色一致，表明与天然 IL-2 和 PBS 处理相比，Y45-20K 和 D20-20K 的共同处理诱导肿瘤组织中最大量的 T 细胞浸润（图 7c）。

记忆性 CD8 细胞在肿瘤免疫中发挥着重要的作用，对荷瘤小鼠淋巴结中 T 细胞亚群分析表明，Y45-20K 单独处理组或 Y45-20K 联合 D20-20K 治疗组中，淋巴结中 Tcm，MPCD8 细胞数量显著提高 10 倍左右，而 Y45-20K 联合 D20-20K 治疗组在 Y45-20K 单独处理组的基础上，Tcm 和 MPCD8 的数量又有进一步的提高。与之对应的，两实验组中的 T Naïve 和 Tem 有轻微降低（图 8a），表示 Y45-20K 在体内能够显著性大量扩增中央记忆 T 淋巴细胞，单独 D20-20K 不会扩增中央记忆细胞，但能够联合 Y45-20K 进一步提高 CD8 亚群中中央记忆细胞的比例和数量，有利于发挥抗肿瘤免疫功效。此外，Tcm 细胞亚群中 CD25 标志物表达量进一步降低，CD122 标志物表达量进一步升高，表示 Y45-20K 单独处理组或 Y45-20K 联合 D20-20K 治疗组中小鼠淋巴结的 Tcm 能够避免内源性 IL-2 对于 T 细胞的过度激活，降低对 IL-2 的敏感性，提高对外来抗原再次应答的响应能力。Y45-20K 单独处理组虽然能够大量激活扩增 Tcm 的增殖，但是 MPCD8，T Naïve 和 Tem 细胞亚群中 LAG-3 和 PD-1 标志物相比于 IL-2 治疗组有显著提高，联用 D20-20K 能够降低上述细胞亚群中免疫检查点的表达，表示 D20-20K 联用 Y45-20K 能够

保留 Y45-20K 的中央记忆细胞激活优势，又能弥补 Y45-20K 对于细胞激活之后耗竭程度增加的劣势，更好地发挥抗肿瘤治疗效果。

6.4 D20-20K 与 Y45-20K 联合对血管渗漏综合征(VLS)的影响

传统 IL-2 治疗存在血管渗漏综合征(VLS)的高风险，通常认为这是由 IL-2 与 CD25+ 肺内皮细胞结合引起的，据此本实施例还评估了联合治疗对肺水肿的影响。采用与上述类似的治疗方案，其中 PEG 化 IL-2 变体的施用改为高给药频率（每天，共五次）。处死小鼠后，对肺组织进行称重，获得肺组织细胞悬液进行流式检测，制备肺组织切片进行免疫组织化学分析。

结果如图 9 所示，表达高水平 CD31 而非其他免疫细胞谱系标志物(Lin)的肺细胞被定义为内皮细胞(Ly5.2- B220- CD3- NK1.1- CD11b- CD11c- CD31+)。结果发现 Y45-20K 单给药组导致明显的肺水肿，表现为肺湿重增加（图 9a），肺内皮细胞比例降低（图 9b），肺内淋巴细胞浸润增加（图 9c）；然而，在与 D20-20K 共同给药后这种副作用明显减轻，可能是由于 D20-20K 空间上占据肺内皮细胞的 IL-2R α 。

上述数据表明 Y45-20K 与 D20-20K 在抗肿瘤治疗中显示出显著的协同作用，其选择性诱导 CD8+T 细胞，对 Treg 细胞的影响最小，并且能够通过保护肺内皮细胞免受 Y45-20K 或内源性 IL-2 的激活来减轻 VLS，具有显著有利的技术效果。

实施例 7：PEG 化 IL-2 变体 Y45-20K/D20-20K 用于 CAR-T 细胞体外培养的优势

IL-2 为 CAR-T 细胞体外扩增培养的关键营养因子，由于其本身不可避免的激活供体细胞中的 Treg 细胞以及不可避免的过度激活 CD8+T 细胞以及导致其终末分化影响 CAR-T 细胞活性而大幅削弱 CAR-T 细胞疗法的疗效果，据此本实验 Y45-20K 联合 D20-20K 替代传统 IL-2 对 CAR-T 细胞疗法的影响。

7.1 D20-20K 与 Y45-20K 联合对 CAR-T 细胞体外培养增殖的影响

CAR 慢病毒载体的构建：

抗 CD19 CAR 包含 FMC63 anti-CD19 scFv (SEQ ID NO: 12)、CD8a 铰链区 (SEQ ID NO: 14) 和跨膜区 (SEQ ID NO: 16) 以及 4-1BB 胞质结构域 (SEQ ID NO: 18) 和 CD3z 胞质结构域 (SEQ ID NO: 20)，其表达盒委托爱康得生物科技(苏州)有限公司合成并克隆到慢病毒载体中。使用 Lipofectamine 3000(Life Technologies)用抗 CD19 CAR、pspax2 (addgene, #12260) 和 pMD2.g (addgene, #12259) 质粒转染 HEK293T 细胞。转染后 6 小时更换培养基，转染后 48 小时收集病毒上清液。以 25,000 rpm 超速离

心 2 小时将病毒颗粒浓缩 30 倍，并在-80℃冷冻直至准备使用。

CAR-T 的制备：

使用 Dynabead 人 T 细胞试剂盒(Life Technologies)从外周血单个核细胞中纯化人 T 细胞，并在感染前用 CD3/ cd28 磁珠(Life Technologies)激活 24 小时。将浓缩慢病毒 (FMC63-AntiCD19-CAR Lentivirus) 应用于活化的人 T 细胞(24 孔培养板中 10^6 /孔，
5 MOI=1)，加入 10 mg/mL polybrene 和 100ng/mL IL-2 或 100ng/mL 45-20K, 100ng/mL D20-20K, 100ng/mL D20-20K+100ng/mL Y45-20K 在 1000 g 条件下 32℃离心 2 h。次日，用含有相对应组别的 IL-2 及其类似物的新鲜培养基替换上清液，将转导后的 T 细胞置于完全生长培养基中保持 0.5×10^6 cells/mL，每 3 天更换一次含有 IL-2 的培养基。实时监测
10 细胞数量和凋亡状态。

结果如图 10 所示，无论用 Y45-20K, D20-20K 还是 Y45-20K 联合 D20-20K 替代 IL2 均不影响 CAR 的转导效率（图 10a），用 IL-2 变体对 CAR-T 细胞培养 10 天后发现，D20-20K 替代 IL-2 进行培养 CAR-T 细胞几乎不增殖，而 Y45-20K 替代 IL-2 进行培养细胞增殖速度显著高于用 IL-2 培养，Y45-20K 联合 D20-20K 替代 IL-2 进行培养
15 CAR-T 细胞增殖速度与单用 Y45-20K 相似（图 10b）。细胞凋亡检测发现用 IL-2 培养会引起 CAR-T 细胞的凋亡，这与 IL-2 对 T 细胞的过度激活及诱导终末分化有关，而 Y45-20K 联合 D20-20K 几乎不诱导 CAR-T 细胞的凋亡（图 10c）。

7.2 D20-20K 与 Y45-20K 联合对 CAR-T 细胞体外培养衰老、耗竭的影响

实验步骤

20 将上述制备的 CAR-T 在各自对应的 IL-2 培养 10-14 天，进行细胞表型的相关检测。表面抗体用荧光标记抗体(CD4-PE/Cy7、CD8-FITC、CD25-BV785、CD57-PB、CD45RA-BV510、CD62L-Percp/cy5.5、CCR7-PE、PD-1-BV650、LAG-3- BV421)进行荧光染色，在 4℃孵育 30 分钟。对于核内染色，CAR - T 细胞使用 Foxp3/转录因子染色缓冲液(eBioscience)固定和渗透，然后用 perm 缓冲液中的 Foxp3 抗体染色。样品用
25 PBS 洗涤两次，悬浮于流式细胞仪染色缓冲液(eBioscience)中。对于细胞内细胞因子染色，使用 500x Cell Activation Cocktail (with Brefeldin A, 达科为, 423303), 6h 37℃培养后进行洗涤。最后一次洗涤后，固定细胞，根据制造商的说明，使用 eBioscience 细胞内固定和渗透缓冲套件(Thermo Fisher Scientific)进行渗透和染色。然后用特异性抗体 4℃孵育 30 分钟：IL-2-BV421、IL-10-APC、Granzyme B-percp /cy5.5。

30 结果如图 11 所示，体外培养的 CAR-T 细胞经 PMA 刺激后，Y45-20K 联合 D20-

20K 培养的 CAR-T 细胞分泌颗粒酶 B 和 IL10 的明显低于 IL-2 组, 说明 CAR-T 细胞的终末分化及衰老程度降低 (图 11a, b), 且 IL-2 的分泌量明显增多, 同样说明 CAR-T 细胞处于一个分化程度较低的干性状态 (图 11c)。其次, 流式检测显示 Y45-20K 联合 D20-20K 培养的 CAR-T 细胞表面耗竭与衰老相关受体如 PD-1、LAG-3 和 CD57 明显降低 (图 11d-f), 再次证明 Y45-20K 联合 D20-20K 可以逆转 IL-2 用于 CAR-T 细胞体外培养引起的衰老、耗竭状态。

7.3 D20-20K 与 Y45-20K 联合对 CAR-T 细胞体外培养中不同分化阶段的 T 细胞的衰老、耗竭的影响

实验步骤

使用 Dynabead 人 T 细胞试剂盒(Life Technologies)从外周血单个核细胞中纯化人 T 细胞, 并用上述方法进行 CAR-T 的制备。为进一步研究不同细胞因子对于 CAR-T 细胞分化的影响, 我们通过流式细胞仪 (分选型, SymphonyS6, BD) 分选出处在不同分化状态的 CAR-T 细胞进行单独培养。T Naïve 细胞定义为 CD3+CD8+CD45RA+CD45RO-CCR7+CD62L-CD95-; Tscm 定义为 CD3+CD8+CD45RA+CD45RO-CCR7+CD62L-CD95+; Tcm 定义为 CD3+CD8+CD45RA-CD45RO+CCR7+CD62L+; Tem 定义为 CD3+CD8+CD45RA-CD45RO+CCR7-CD62L-; T effector 定义为 CD3+CD8+CD45RA+CD45RO-CCR7-CD62L-; Treg 定义为 CD3+CD4+CD25^{high}CD127^{low}.并用不同细胞因子培养扩增 10-14 天, 实时监测细胞数量和生长状态。

我们对 CAR-T 细胞中处于不同分化阶段的初始 T 细胞 (T Naïve)、T 记忆干细胞 (Tscm)、效应 T 细胞 (T effector) 和调节性 T 细胞 (Treg) 的衰老、耗竭程度进行了检测。CD62L 为细胞干性的特征标志物, D20-20K 与 Y45-20K 联合可以近一步提升 T Naïve 和 Tscm 细胞中 CD62L 的表达量 (图 12a), 说明 D20-20K 与 Y45-20K 联合可以近一步保留 T 细胞的干性状态。对不同分化阶段的 T 细胞增殖情况检测结果显示, D20-20K 与 Y45-20K 联合可以近一步增强 T Naïve 细胞的增殖, 降低 Treg 细胞的增殖, 而对 Tscm 和 T effector 细胞的增殖状态无显著影响 (图 12b)。PD-1 和 TIM-3 为 T 细胞耗竭的标志物, 对处于终末分化状态的 T effector 细胞检测显示, D20-20K 与 Y45-20K 联合可以近一步降低 PD-1 和 TIM-3 的表达量, 降低 T effector 细胞的耗竭程度 (图 12c)。最后, 对 IL-2 诱导不同分化状态的 T 细胞上 CD25 的表达量检测显示, D20-20K 与 Y45-20K 联合可以明显降低 Tscm、T effector 和 Treg 细胞表面 CD25 的表达量, 尤其

是相对于 Y45-20K 单独使用进一步降低 Treg 细胞上 CD25 的表达量（图 12d），CD25 的表达量下降可以避免 T 细胞激活产生的内源性 IL-2 对于 T 细胞的过度激活，显示出 D20-20K 与 Y45-20K 联合的优越性。

5 **实施例 8: None- α 变体与 None- β 变体联用对维持 T 细胞干性，降低 T 细胞耗竭的影响**

本实施例对实施例 1-2 中制备的 Non- α 变体（F42-20K、Y45-20K、E62-20K、P65-20K、E68-20K）与 Non- β 变体（D20-20K、H16-20K、A73-20K、H79-20K）组合进行体外活性验证。

10 **实验步骤：**

取健康人外周血，用外周血人淋巴细胞分离液分离出 PBMC，用磁珠分选试剂盒分离出 CD3 阳性 T 淋巴细胞，加入 bead: cell=1: 1 的 CD3/CD28 刺激磁珠，接种密度控制在 $1 \times 10^6/\text{ml}$ ，24 孔板，每孔 1ml，并且用含有不同种类但浓度相同的细胞因子进行培养（100ng/ml），每 72 小时换一次液，连续培养两周后进行流式检测。检测抗体包括：

15 APC/Cy7 anti-human CD3, PE/Cy7 anti-human CD4, FITC anti-human CD8, BV785 anti-human PD-1, BV605 anti-human TIM-3, Pacific Blue anti-human CD57, APC anti-human IL-10, PE anti-human Perforin, Percp/cy5.5 anti-human Granzyme B, BV510 anti-human IFN- γ .

实验结果：

20 用 none- α 变体（Y45-20K）处理，相比于 IL-2，CD8 和 CD4 T 细胞表面的免疫检查点 PD-1 和 TIM-3 的表达有所降低（图 13a），效应细胞因子 Perforin, Granzyme B 以及 IFN- γ 表达水平显著降低（图 13b），凋亡相关生物标志物的表达 CD57、IL-10 表达水平下降（图 13c），表明 none- α 能够一定程度降低 T 细胞在体外培养过程中的耗竭程度，维持细胞的 stem-cell-like 干细胞样特性。当 none- α 变体（Y45-20K）与 none- β 变体（D20-20K、H16-20K、A73-20K、H79-20K）联用后，PD-1 和 TIM-3 的表达呈现出近一步降低，效应细胞因子 Perforin, Granzyme B 以及 IFN- γ 表达水平近一步下降，凋亡相关生物标志物 CD57、IL-10 表达水平近一步下降（图 13a-c）。

在上述筛选结果基础上，优选 none- β 变体（D20-20K），验证与不同 none- α 变体（F42-20K、Y45-20K、E62-20K、P65-20K、E68-20K）联用对 T 细胞激活作用的影响，实验结果表明，D20-20K 与不同 none- α 变体联用后，对改善 CD8 和 CD4 T 细胞生

存状态的影响程度不同，但均可在一定程度上进一步降低免疫检查点 PD-1 和 TIM-3 的表达、效应细胞因子 Perforin, Granzyme B、IFN- γ 表达以及减少凋亡相关生物标志物的表达 CD57、IL-10 表达水平（图 14a-c）。因此，None- β 联用 None- α 方案，会协同 none- α 作用的基础上，进一步改善 T 细胞的生存状态，如降低 T 细胞生长耗竭程度，减少因过度激活诱导的细胞凋亡，以及延缓向终端效应细胞分化。

上述结果表明，将具有对非 α 受体偏向性的 non- α 变体与具有对非 β 受体偏向性的 non- β 变体联用会产生明显的协同作用，带来显著有利的治疗效果。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，但本领域技术人员将理解：根据已经公布的所有教导，可以对细节进行各种修改和变动，并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部分为由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 组合物，其包含：

(1) 第一定点修饰的 IL-2，其与野生型 IL-2 相比在第一氨基酸位置的残基包含 PEG 基团修饰，其中，所述第一定点修饰的 IL-2 对 IL-2 受体 α (IL-2R α) 亚基不结合或以大于 1E-8 M (例如数量级为 1E-7~1E-6 M) 的 KD 值结合；以及

(2) 第二定点修饰的 IL-2，其与野生型 IL-2 相比在第二氨基酸位置的残基包含 PEG 基团修饰，其中，所述第二定点修饰的 IL-2 对 IL-2 受体 β (IL-2R β) 亚基不结合。

2. 权利要求 1 所述的组合物，其中，所述第一定点修饰的 IL-2 (i) 以小于 1E-8 M (例如数量级为 1E-9~1E-8 M) 的 KD 值结合 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体，和/或，(ii) 对 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体不结合或以大于 1E-8 (例如数量级为 1E-7~1E-6) 的 KD 值结合。

3. 权利要求 1 或 2 所述的组合物，其中，所述第二定点修饰的 IL-2 (i) 以小于 1E-8 (例如数量级为 1E-9~1E-8) 的 KD 值结合 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体，和/或，(ii) 对 IL2-R $\beta\gamma$ 二聚体不结合。

4. 权利要求 1-3 任一项所述的组合物，其中，所述第一氨基酸位置选自 F42、Y45、E62、K64、P65、E68、K35、T37、R38、T41、K48、K49。

5. 权利要求 1-3 任一项所述的组合物，其中，所述第一氨基酸位置选自 F42、Y45、E62、K64、P65、E68。

6. 权利要求 1-5 任一项所述的组合物，其中，所述第二氨基酸位置选自 H16、D20、A73、H79；

优选地，所述第二氨基酸位置选自 D20。

7. 权利要求 1-6 任一项所述的组合物，其中，所述第一氨基酸位置为 F42、Y45、E62、K64、P65 或 E68，所述第二氨基酸位置为 D20；或者，所述第一氨基酸位置为

Y45, 所述第二氨基酸位置为 **H16**、**D20**、**A73**、**H79**;

优选地, 所述第一氨基酸位置为 **Y45**, 所述第二氨基酸位置为 **D20**。

8. 权利要求 1-7 任一项所述的组合物, 其中, 所述第一定点修饰的 **IL-2** 包含的 **PEG** 修饰基团的平均分子量为 **5~60kDa**, 例如为 **5kDa**、**10kDa**、**15kDa**、**20kDa**、**25kDa**、**30kDa**、**35kDa**、**40kDa**、**45kDa**、**50kDa** 或 **60kDa**;

优选地, 所述第一定点修饰的 **IL-2** 包含的 **PEG** 修饰基团的平均分子量为 **5~40kDa**, 例如为 **5~30kDa**、**5~25kDa**、**5~20kDa**、**10~40kDa**、**10~30kDa**、**15~30kDa**、**10~25kDa** 或 **15~25kDa**, 例如为 **5kDa**、**10kDa**、**15kDa**、**20kDa**、**25kDa**、**30kDa** 或 **40kDa**。

9. 权利要求 1-8 任一项所述的组合物, 其中, 所述第二定点修饰的 **IL-2** 包含的 **PEG** 修饰基团的平均分子量为 **5~60kDa**, 例如为 **5kDa**、**10kDa**、**15kDa**、**20kDa**、**25kDa**、**30kDa**、**35kDa**、**40kDa**、**45kDa**、**50kDa** 或 **60kDa**;

优选地, 所述第二定点修饰的 **IL-2** 包含的 **PEG** 修饰基团的平均分子量为 **5~40kDa**, 例如为 **5~30kDa**、**5~25kDa**、**5~20kDa**、**10~40kDa**、**10~30kDa**、**15~30kDa**、**10~25kDa** 或 **15~25kDa**, 例如为 **5kDa**、**10kDa**、**15kDa**、**20kDa**、**25kDa**、**30kDa** 或 **40kDa**。

10. 权利要求 1-9 任一项所述的组合物, 其中, 所述第一氨基酸位置的残基被突变为非天然氨基酸, 所述非天然氨基酸上连接有所述 **PEG** 基团。

11. 权利要求 1-10 任一项所述的组合物, 其中, 所述第二氨基酸位置的残基被突变为非天然氨基酸, 所述非天然氨基酸上连接有所述 **PEG** 基团。

12. 权利要求 10 或 11 所述的组合物, 其中, 所述非天然氨基酸含有化学官能基团 (例如, 羰基、炔基或叠氮基团); 所述 **PEG** 基团包含能与该化学官能基团发生化学反应的标记基团, 从而所述 **PEG** 基团连接至非天然氨基酸。

13. 权利要求 10 或 11 所述的组合物, 其中, 所述非天然氨基酸含有叠氮基团, 所述

PEG 基团包含能与叠氮基团发生 click 化学反应的标记基团，从而所述 PEG 基团连接至非天然氨基酸。

14. 权利要求 13 所述的组合物，其中，所述能与叠氮基团发生 click 化学反应的标记基团为包含二苯并环辛炔基团的化学部分，例如 DBCO、DIBO 或 BCN。

15. 权利要求 10-14 任一项所述的组合物，其中，所述非天然氨基酸为含有叠氮基团的赖氨酸衍生物或酪氨酸衍生物，例如 N ϵ -2-叠氮乙氧羰基-L-赖氨酸(NAEK)或 2-amino-3-(4-(azidomethyl)phenyl)propanoic acid。

16. 制备权利要求 1-15 任一项所述的组合物的方法，其包括制备所述第一定点修饰的 IL-2 和制备所述第二定点修饰的 IL-2，其中，

制备所述第一定点修饰的 IL-2 包括：

-提供：（a1）第一定点突变的 IL-2，其与野生型 IL-2 相比在第一氨基酸位置的残基被突变为非天然氨基酸；（b1）由标记基团修饰的 PEG 基团，所述标记基团能与所述非天然氨基酸形成共价键；

-将（a1）与（b1）共孵育，通过化学反应将非天然氨基酸与 PEG 基团偶联；

制备所述第二定点修饰的 IL-2 包括：

-提供：（a2）第二定点突变的 IL-2，其与野生型 IL-2 相比在第二氨基酸位置的残基被突变为非天然氨基酸；（b2）由标记基团修饰的 PEG 基团，所述标记基团能与所述非天然氨基酸形成共价键；

-将（a2）与（b2）共孵育，通过化学反应将非天然氨基酸与 PEG 基团偶联。

17. 权利要求 16 所述的方法，其中，（a1）中所述的非天然氨基酸含有化学官能基团（例如，羰基、炔基、叠氮基团），（b1）中所述 PEG 基团包含的标记基团能与该化学官能团发生化学反应形成共价键；和/或，（a2）中所述的非天然氨基酸含有化学官能基团（例如，羰基、炔基、叠氮基团）；（b2）中所述 PEG 基团包含的标记基团能与该化学官能团发生化学反应形成共价键。

18. 权利要求 16 所述的方法，其中，（a1）和（a2）中所述的非天然氨基酸包含叠

氮基团。

19. 权利要求 16 所述的方法，其中，(a1) 和 (a2) 中所述的非天然氨基酸为包含叠氮基团的赖氨酸衍生物或酪氨酸衍生物，例如 N ϵ -2-叠氮乙氧羰基-L-赖氨酸(NAEK) 或 2-amino-3-(4-(azidomethyl)phenyl)propanoic acid。

20. 权利要求 16-19 任一项所述的方法，其中，

所述制备所述第一定点修饰的 IL-2 包括：

-提供：(a1) 第一定点突变的 IL-2，其与野生型 IL-2 相比在第一氨基酸位置的残基被突变为含有叠氮基团的非天然氨基酸；(b1) 由标记基团修饰的 PEG 基团，所述标记基团能与叠氮基团发生 click 化学反应；

-将 (a1) 与 (b1) 共孵育，通过 click 反应将非天然氨基酸与 PEG 基团偶联；

所述制备所述第二定点修饰的 IL-2 包括：

-提供：(a2) 第二定点突变的 IL-2，其与野生型 IL-2 相比在第二氨基酸位置的残基被突变为含有叠氮基团的非天然氨基酸；(b2) 由标记基团修饰的 PEG 基团，所述标记基团能与叠氮基团发生 click 化学反应；

-将 (a2) 与 (b2) 共孵育，通过 click 反应将非天然氨基酸与 PEG 基团偶联。

21. 权利要求 20 所述的方法，其中，所述 click 化学反应为无铜的 click 化学反应。

22. 权利要求 20 或 21 所述的方法，其中，所述能与叠氮基团发生 click 化学反应的标记基团为包含炔基的化学部分，例如包含二苯并环辛炔基团的化学部分，例如 DBCO、DIBO 或 BCN。

23. 权利要求 20 或 21 所述的方法，其中，所述能与叠氮基团发生 click 化学反应的标记基团为 DBCO。

24. 权利要求 16-23 任一项所述的方法，其中，通过非天然氨基酸正交翻译技术提供所述第一定点突变的 IL-2 和所述第二定点突变的 IL-2。

25. 权利要求 24 所述的方法，所述非天然氨基酸正交翻译技术包括以下步骤：

-获得编码定点突变的 IL-2 的核酸序列，其中，待突变氨基酸位置对应的密码子被突变为 TAG；

-将所述编码定点突变的 IL-2 的核酸序列与载体可操作地连接，得到定点突变序列表达载体；

-将所述定点突变序列表达载体与编码琥珀密码子抑制型 tRNA 和对非天然氨基酸特异性的氨酰 tRNA 合成酶的载体共转染宿主细胞，在含有非天然氨基酸的培养基中培养并诱导表达，得到定点突变为非天然氨基酸的 IL-2。

26. 权利要求 25 所述的方法，其中，所述非天然氨基酸为 N ϵ -2-叠氮乙氧羰基-L-赖氨酸(NAEK)；优选地，所述对非天然氨基酸特异性的氨酰 tRNA 合成酶为 NAEK 特异性氨酰 tRNA 合成酶。

27. 试剂盒，其包含：权利要求 1-15 任一项所述的组合物；

优选地，所述试剂盒进一步包含包装说明书，所述包装说明书包含使用所述组合物来在体外制备和/或培养用于过继性细胞治疗的免疫细胞的说明。

28. 权利要求 27 所述的试剂盒，其中，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是经改造的免疫细胞，其表达嵌合抗原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子。

29. 权利要求 27 所述的试剂盒，其中，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

30. 试剂盒，其包含：权利要求 1-15 任一项所述的组合物以及编码嵌合抗原受体的核酸分子；

优选地，所述试剂盒进一步包含包装说明书，所述包装说明书包含使用所述组合物中以及核酸分子来在体外制备用于过继性细胞治疗的经改造的免疫细胞的说明，所述经改造的免疫细胞表达嵌合抗原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子。

31. 权利要求 30 所述的试剂盒，其中，所述编码嵌合抗原受体的核酸分子存在于表

达载体中。

32. 权利要求 31 所述的试剂盒，其中所述表达载体为病毒（例如，慢病毒、逆转录病毒或腺病毒）载体。

33. 试剂盒，其包含：权利要求 1-15 任一项所述的组合物以及用于过继性细胞治疗的免疫细胞；

优选地，所述试剂盒进一步包含包装说明书，所述包装说明书包含使用所述组合物来在体外培养所述免疫细胞以用于过继性细胞治疗的说明。

34. 权利要求 33 所述的试剂盒，其中，用于过继性细胞治疗的免疫细胞是经改造的免疫细胞，其表达嵌合抗原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子。

35. 权利要求 34 所述的试剂盒，其中，所述经改造的免疫细胞包括表达 IL2-Rαβγ 三聚体的淋巴细胞，如 T 细胞、NK 细胞或其任意组合。

36. 权利要求 33 所述的试剂盒，其中，用于过继性细胞治疗的免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

37. 权利要求 28、30-32、34、35 任一项所述的试剂盒，其中，所述嵌合抗原受体包括细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域、以及一个或多个胞内信号传导结构域。

38. 权利要求 37 所述的试剂盒，其中，所述细胞外抗原结合结构域包含特异性结合肿瘤相关抗原的抗体或抗原结合片段（例如 scFv）。

39. 权利要求 37 所述的试剂盒，其中，所述细胞外抗原结合结构域包含特异性结合 CD19 的抗体或抗原结合片段（例如 scFv）。

40. 培养用于过继性细胞治疗的免疫细胞的方法，所述方法包括在包含第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的细胞培养基中培养所述细胞，其中，所述第一定点修饰

的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 如权利要求 1-15 任一项中定义。

41. 权利要求 40 所述的方法，其中，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是经改造的免疫细胞，其表达嵌合抗原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子；

优选地，所述嵌合抗原受体如权利要求 37-39 任一项中定义。

42. 权利要求 41 所述的方法，其中，所述经改造的免疫细胞包括表达 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的淋巴细胞，如 T 细胞、NK 细胞或其任意组合。

43. 权利要求 40 所述的方法，其中，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

44. 制备用于过继性细胞治疗的免疫细胞的方法，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是经改造的免疫细胞，其表达嵌合抗原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子，其中，所述方法包括：

(1) 提供来自患者或者健康供体的免疫细胞；

(2) 在存在第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的条件下，将编码嵌合抗原受体的核酸分子引入步骤(1)所述的免疫细胞，从而提供所述经改造的免疫细胞；其中，所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 如权利要求 1-15 任一项中定义。

45. 权利要求 44 所述的方法，其中步骤(2)在包含所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的细胞培养基中进行。

46. 权利要求 44 或 45 所述的方法，其中，在步骤(2)中所述编码嵌合抗原受体的核酸分子存在于表达载体中。

47. 权利要求 44-46 任一项所述的方法，其中，在步骤(2)中所述编码嵌合抗原受体的核酸分子由病毒（例如，慢病毒、逆转录病毒或腺病毒）载体通过感染的方式引入细胞。

48. 权利要求 44-47 任一项所述的方法，其中，在步骤(1)中，所述免疫细胞经预处理，所述预处理包括免疫细胞的分选、激活和/或增殖。

49. 权利要求 48 所述的方法，其中，所述预处理包括将免疫细胞与抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体接触，从而刺激所述免疫细胞并诱导其增殖，由此生成经预处理的免疫细胞。

50. 权利要求 44-49 任一项所述的方法，其中，在步骤(2)之后所述方法还包括：(3) 在包含所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的细胞培养基中继续培养步骤(2)获得的免疫细胞的步骤。

51. 权利要求 44-50 任一项所述的方法，其中，所述免疫细胞包括表达 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的淋巴细胞，如 T 细胞、NK 细胞或其任意组合。

52. 权利要求 36-43 任一项所述的方法，其中，所述嵌合抗原受体如权利要求 37-39 任一项中定义。

53. 制备用于过继性细胞治疗的免疫细胞的方法，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)，其中，所述方法包括：从肿瘤组织中分离浸润淋巴细胞并在包含第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 的细胞培养基中进行培养，所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 如权利要求 1-15 任一项中定义。

54. 用于过继性细胞治疗的免疫细胞，其由权利要求 40-53 任一项所述的方法获得。

55. 免疫细胞群，其包括权利要求 54 所述的免疫细胞。

56. 权利要求 1-15 任一项所述的组合物用于体外制备或培养用于过继性细胞治疗的免疫细胞的用途。

57. 权利要求 56 所述的用途，其中，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞为经改造的免疫细胞，其表达嵌合抗原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子；

优选地，所述嵌合抗原受体如权利要求 37-39 任一项中定义。

58. 权利要求 57 所述的用途，其中，所述经改造的免疫细胞包括表达 IL2-R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体的淋巴细胞，如 T 细胞、NK 细胞或其任意组合。

59. 权利要求 56 所述的用途，其中，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

60. 药物组合物，其包含权利要求 1-15 任一项所述的组合物以及药学上可接受的载体和/或赋形剂；

例如，所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 在分开的组合物或剂型中；

例如，所述第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 在相同的组合物或剂型中。

61. 权利要求 1-15 任一项所述的组合物或权利要求 60 所述的药物组合物用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病的用途，或者，在制备用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病的药物中的用途；

例如，所述组合物中的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 同时、分开或相继施用。

62. 用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病的方法，其包括向有需要的受试者施用权利要求 1-15 任一项所述的组合物或权利要求 60 所述的药物组合物；

优选地，所述受试者为哺乳动物，例如人；

优选地，所述组合物中的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 同时、分开或相继施用。

63. 药盒，其包含含有权利要求 1-15 任一项所述的组合物中的第一定点修饰的 IL-2 和可选的药学上可接受的载体和/或赋形剂的药物，和包装说明书，所述包装说明书包含将所述药物与含有权利要求 1-15 任一项所述的组合物中的第二定点修饰的 IL-2 和可选的药学上可接受的载体和/或赋形剂的组合物组合施用来在受试者中增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病（例如肿瘤）的说明。

64. 药盒，其包含含有权利要求 1-15 任一项所述的组合物中的第二定点修饰的 IL-2 和可选的药学上可接受的载体和/或赋形剂的药物，和包装说明书，所述包装说明书包含将所述药物与含有权利要求 1-15 任一项所述的组合物中的第一定点修饰的 IL-2 和可选的药学上可接受的载体和/或赋形剂的组合物组合施用来在受试者中增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病（例如肿瘤）的说明。

65. 药盒，其包含含有权利要求 1-15 任一项所述的组合物中的第一定点修饰的 IL-2 和可选的药学上可接受的载体和/或赋形剂的第一药物，含有权利要求 1-15 任一项所述的组合物中的第二定点修饰的 IL-2 和可选的药学上可接受的载体和/或赋形剂的第二药物；

优选地，所述药盒进一步包含包装说明书，所述包装说明书包含施用所述第一药物和所述第二药物来在受试者中增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病（例如肿瘤）的说明。

66. 权利要求 61 所述的用途、权利要求 62 所述的方法或权利要求 63-65 任一项所述的药盒，其中，所述增生性疾病是肿瘤；

优选地，所述肿瘤包括实体瘤或血液肿瘤；

优选地，所述肿瘤包括转移性癌症、复发性或难治性癌症；

优选地，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾细胞癌、非小细胞肺癌、淋巴瘤、头颈部鳞状细胞癌、尿路上皮癌、卵巢癌、胃癌和乳腺癌。

67. 药物组合物，其包含权利要求 54 所述的免疫细胞或权利要求 55 所述的免疫细胞群以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

68. 权利要求 54 所述的免疫细胞、权利要求 55 所述的免疫细胞群或权利要求 67 所述的药物组合物用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病的用途，或者，在制备用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病的药物中的用途。

69. 权利要求 68 所述的用途，其中，所述免疫细胞、免疫细胞群或药物组合物与权利要求 1-15 任一项中定义的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 联合施用，例

如同时、分开或相继施用。

70. 用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病的方法，其包括向有需要的受试者施用权利要求 54 所述的免疫细胞、权利要求 55 所述的免疫细胞群或权利要求 67 所述的药物组合物；

优选地，所述受试者为哺乳动物，例如人。

71. 权利要求 70 所述的方法，其中，所述方法包括：使用权利要求 42 所述的方法或权利要求 44-52 所述的方法获得经改造的免疫细胞，向所述受试者施用所述经改造的免疫细胞。

72. 权利要求 70 所述的方法，其中，所述方法包括：使用权利要求 43 所述的方法或权利要求 53 所述的方法获得肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)，向所述受试者施用所述肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

73. 权利要求 70-72 任一项所述的方法，其中，所述免疫细胞、免疫细胞群或药物组合物与权利要求 1-15 任一项中定义的第一定点修饰的 IL-2 和第二定点修饰的 IL-2 联合施用，例如同时、分开或相继施用。

74. 权利要求 1-15 任一项所述的组合物与用于过继性细胞治疗的免疫细胞的组合用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病的用途，或者，在制备用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病的药物中的用途；

优选地，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是经改造的免疫细胞，其表达嵌合抗原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子；

优选地，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

75. 用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病的方法，其包括向有需要的受试者施用权利要求 1-15 任一项所述的组合物与用于过继性细胞治疗的免疫细胞的组合；

优选地，所述受试者为哺乳动物，例如人；

优选地，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是经改造的免疫细胞，其表达嵌合抗

原受体和/或包含编码所述嵌合抗原受体的核酸分子；

优选地，所述用于过继性细胞治疗的免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

76. 权利要求 68 或 69 所述的用途、权利要求 70-73 任一项所述的方法、权利要求 74 所述的用途或权利要求 75 所述的方法，其中，所述增生性疾病是肿瘤；

优选地，所述肿瘤包括实体瘤或血液肿瘤；

优选地，所述肿瘤包括转移性癌症、复发性或难治性癌症；

优选地，所述肿瘤选自黑色素瘤、肾细胞癌、非小细胞肺癌、淋巴瘤、头颈部鳞状细胞癌、尿路上皮癌、卵巢癌、胃癌和乳腺癌。

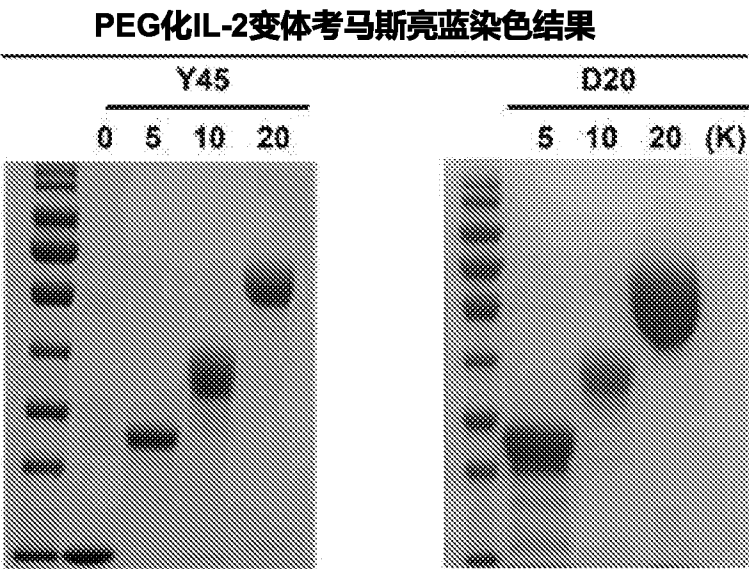


图 1

与白介素-2α受体单体结合力测试

白介素-2 变体	1:1 结合 ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
H16-20K	2.70e+5	3.16e-2	1.17e-7
D20-20K	4.88e+5	4.88e-2	9.99e-8
A73-20K	7.70e+05	7.38e-02	9.6e-8
H79-20K	2.15e+05	3.08e-02	1.43e-7
K35-20K	1.09e+5	1.99e-2	1.83e-7
T37-20K	2.21e+5	5.06e-2	2.29e-7
R38-20K	1.56e+5	2.02e-1	1.30e-6
T41-20K	8.72e+4	2.41e-2	2.76e-7
F42-20K	ND	ND	NA
Y45-20K	ND	ND	NA
K48-20K	2.91e+5	7.42e-2	2.55e-7
K49-20K	3.63e+5	5.33e-2	1.47e-7
E62-20K	ND	ND	NA
K64-20K	ND	ND	NA
P65-20K	ND	ND	NA
E68-20K	ND	ND	NA
IL-2	1.91e+7	1.6e-1	8.47e-9

与白介素-2αβγ三聚体受体结合力测试

白介素-2 变体	1:1 结合 ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
H16-20K	5.65e+5	3.42e-2	6.06e-8
D20-20K	8.64e+5	4.57e-2	5.29e-8
A73-20K	3.32e+06	7.51e-02	2.26e-8
H79-20K	1.33e+06	3.14e-02	2.36e-8
K35-20K	4.37e+5	6.42e-3	1.47e-8
T37-20K	3.75e+9	5.85e+1	1.56e-8
R38-20K	2.60e+6	2.47e-2	9.51e-9
T41-20K	1.93e+5	2.99e-3	1.55e-8
F42-20K	ND	ND	NA
Y45-20K	ND	ND	NA
K48-20K	1.80e+9	3.41e+1	1.89e-8
K49-20K	4.19e+9	3.14e+1	7.51e-9
E62-20K	ND	ND	NA
K64-20K	ND	ND	NA
P65-20K	ND	ND	NA
E68-20K	ND	ND	NA
IL-2	1.94e+8	5.49e-3	2.82e-11

与白介素-2β受体单体结合力测试

白介素-2 变体	1:1 结合 ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
H16-20K	ND	ND	NA
D20-20K	ND	ND	NA
A73-20K	ND	ND	NA
H79-20K	ND	ND	NA
K35-20K	1.17e+8	4.95e+1	4.24e-7
T37-20K	1.62e+5	1.62e-1	9.99e-7
R38-20K	1.21e+5	7.90e-2	6.52e-7
T41-20K	1.07e+5	8.71e-2	8.18e-7
F42-20K	1.53e+5	9.10e-2	5.95e-7
Y45-20K	5.98e+4	4.18e-2	6.99e-7
K48-20K	1.46e+5	1.38e-1	9.45e-7
K49-20K	1.44e+5	1.08e-1	7.46e-7
E62-20K	9.32e+4	9.10e-2	9.76e-7
K64-20K	5.76e+4	1.28e-1	2.22e-6
P65-20K	6.02e+4	3.84e-2	6.39e-7
E68-20K	1.12e+5	9.90e-2	8.82e-7
IL-2	5.16e+05	1.59e-01	3.08e-7

与白介素-2βγ二聚体受体结合力测试

白介素-2 变体	1:1 结合 ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
H16-20K	ND	ND	NA
D20-20K	ND	ND	NA
A73-20K	ND	ND	NA
H79-20K	ND	ND	NA
K35-20K	3.16e+4	1.57e-3	4.97e-8
T37-20K	3.22e+4	1.99e-3	6.17e-8
R38-20K	4.44e+4	1.52e-3	3.43e-8
T41-20K	3.73e+4	1.66e-3	4.46e-8
F42-20K	4.25e+4	1.30e-3	3.07e-8
Y45-20K	4.41e+4	1.19e-3	2.70e-8
K48-20K	2.85e+4	1.82e-3	6.38e-8
K49-20K	3.40e+4	1.80e-3	5.29e-8
E62-20K	3.71e+4	1.55e-3	4.17e-8
K64-20K	2.08e+4	1.34e-3	6.42e-8
P65-20K	3.10e+4	1.13e-3	3.65e-8
E68-20K	2.99e+4	1.28e-3	4.28e-8
IL-2	8.63e+5	9.66e-4	1.12e-9

图 2

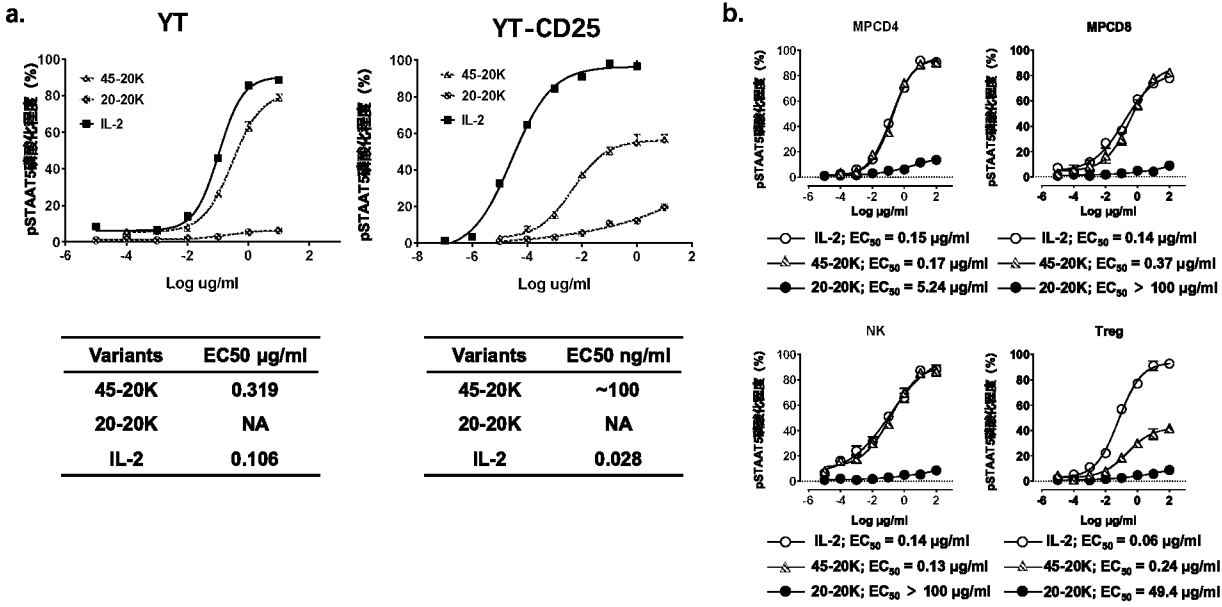


图 3

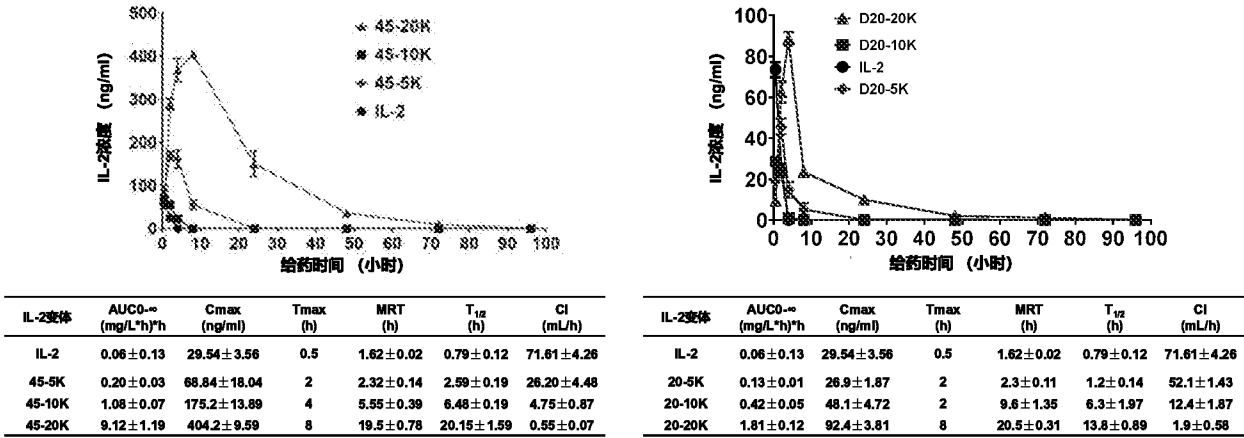


图 4

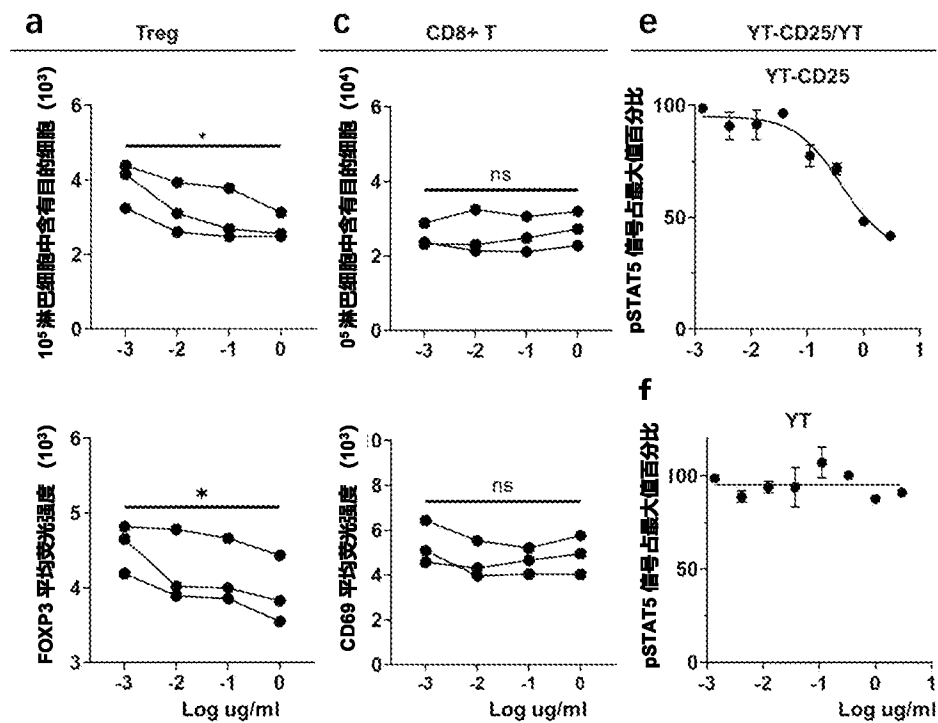


图 5

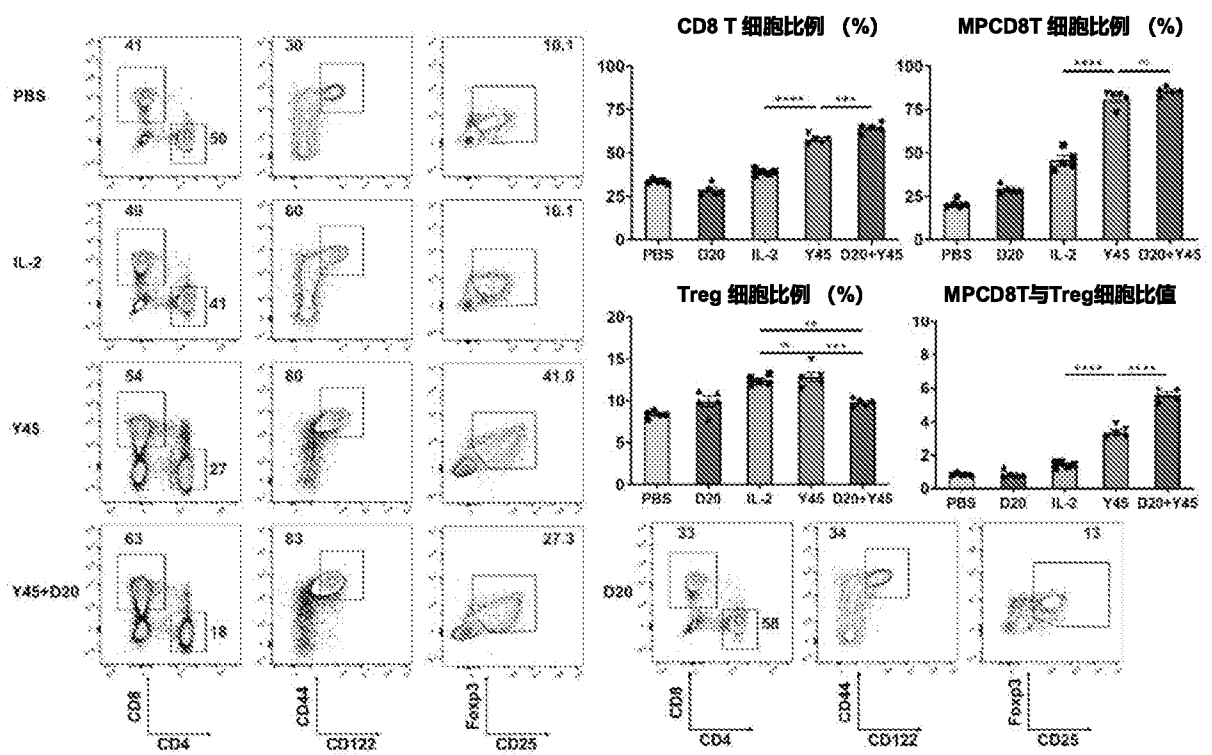


图 6

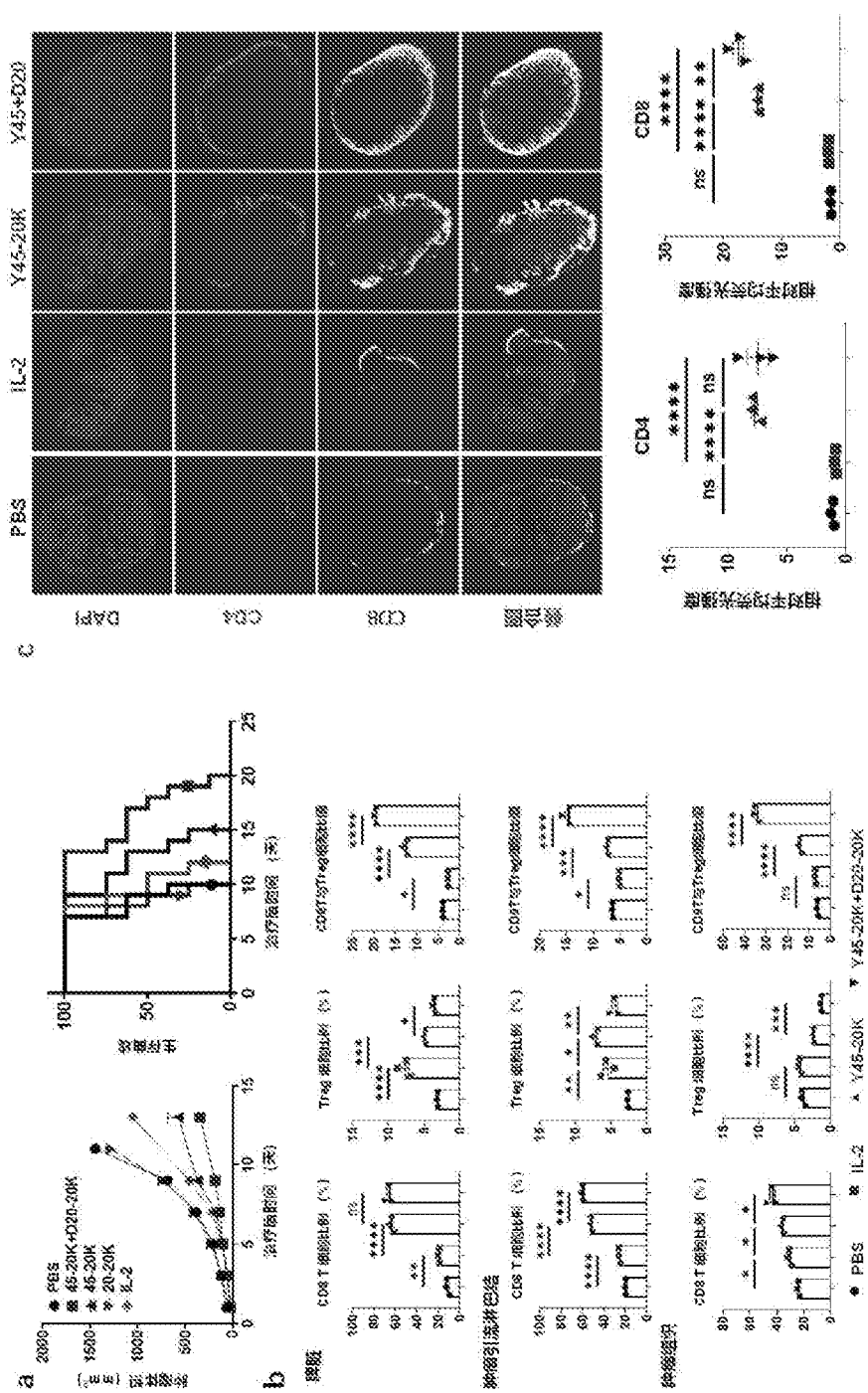


图 7

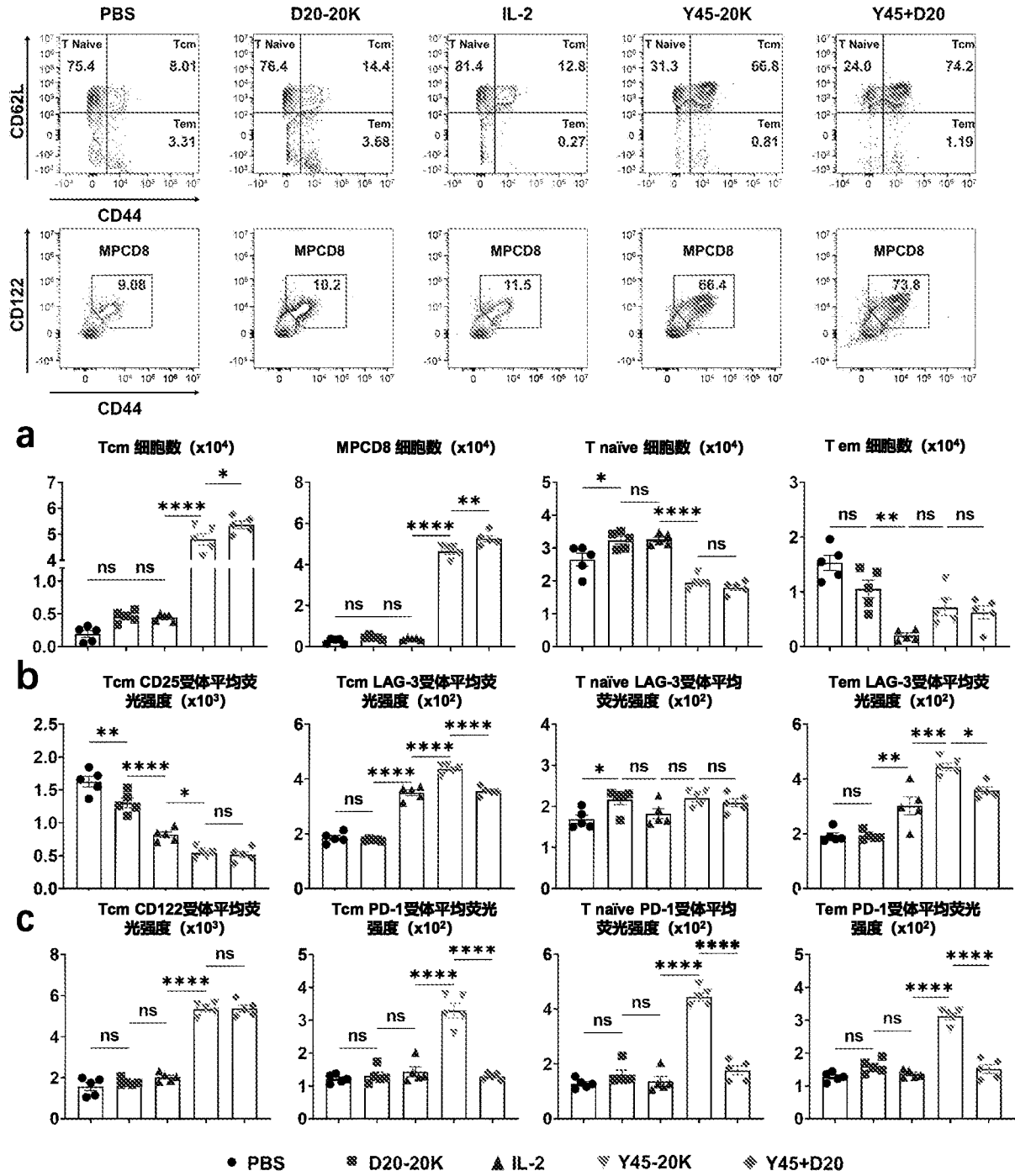


图 8

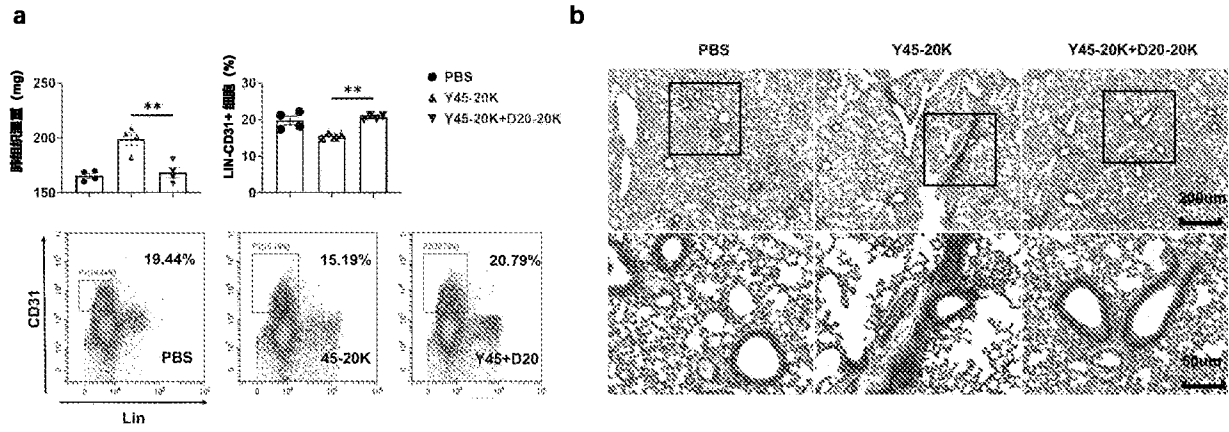


图 9

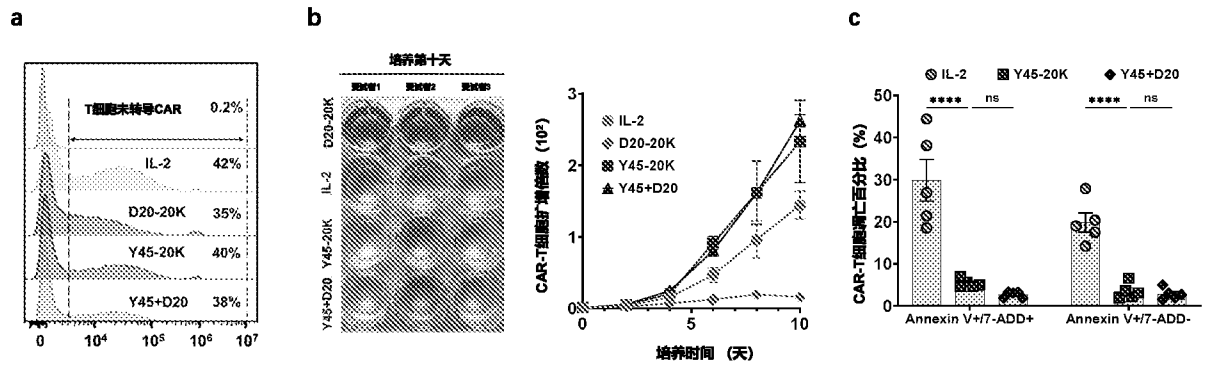


图 10

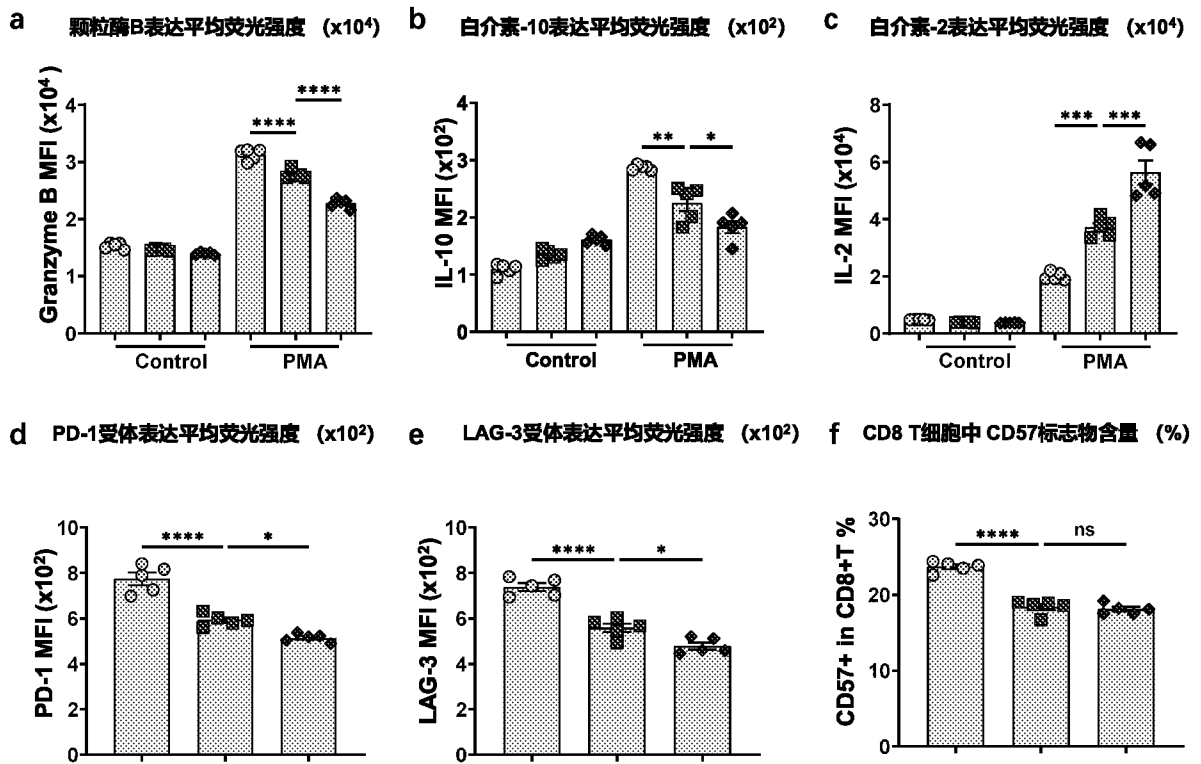


图 11

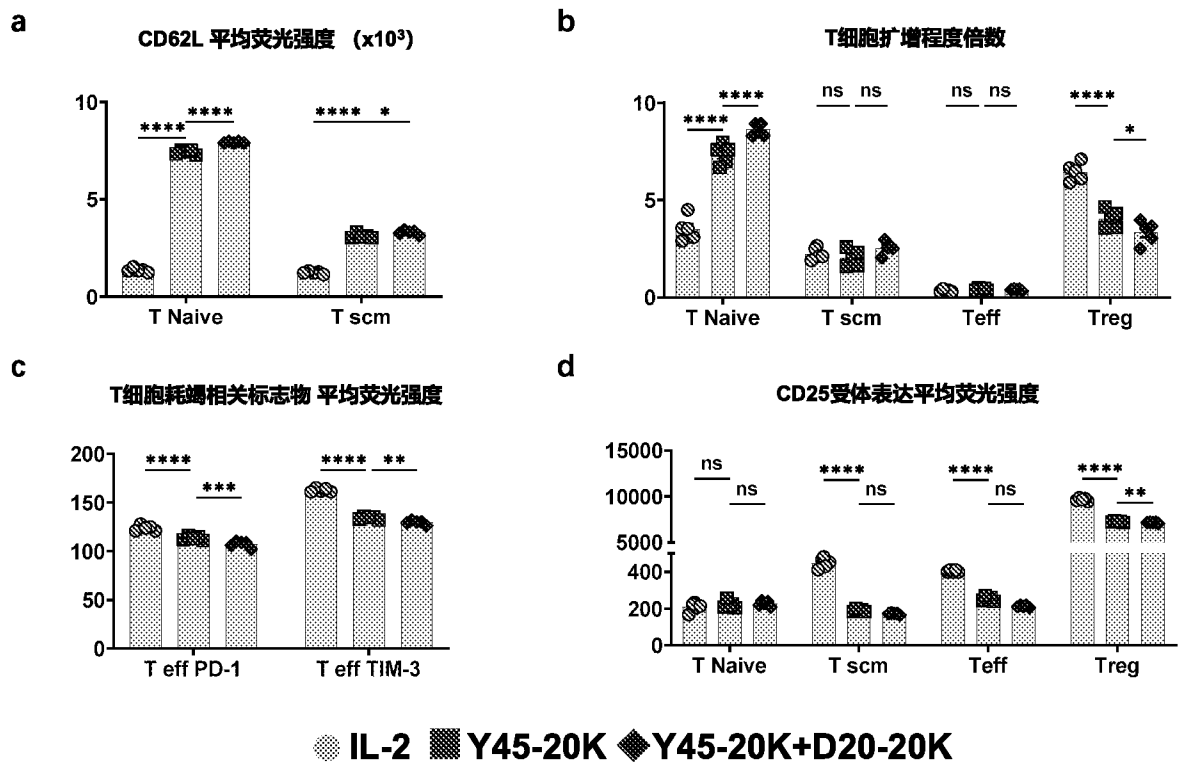


图 12

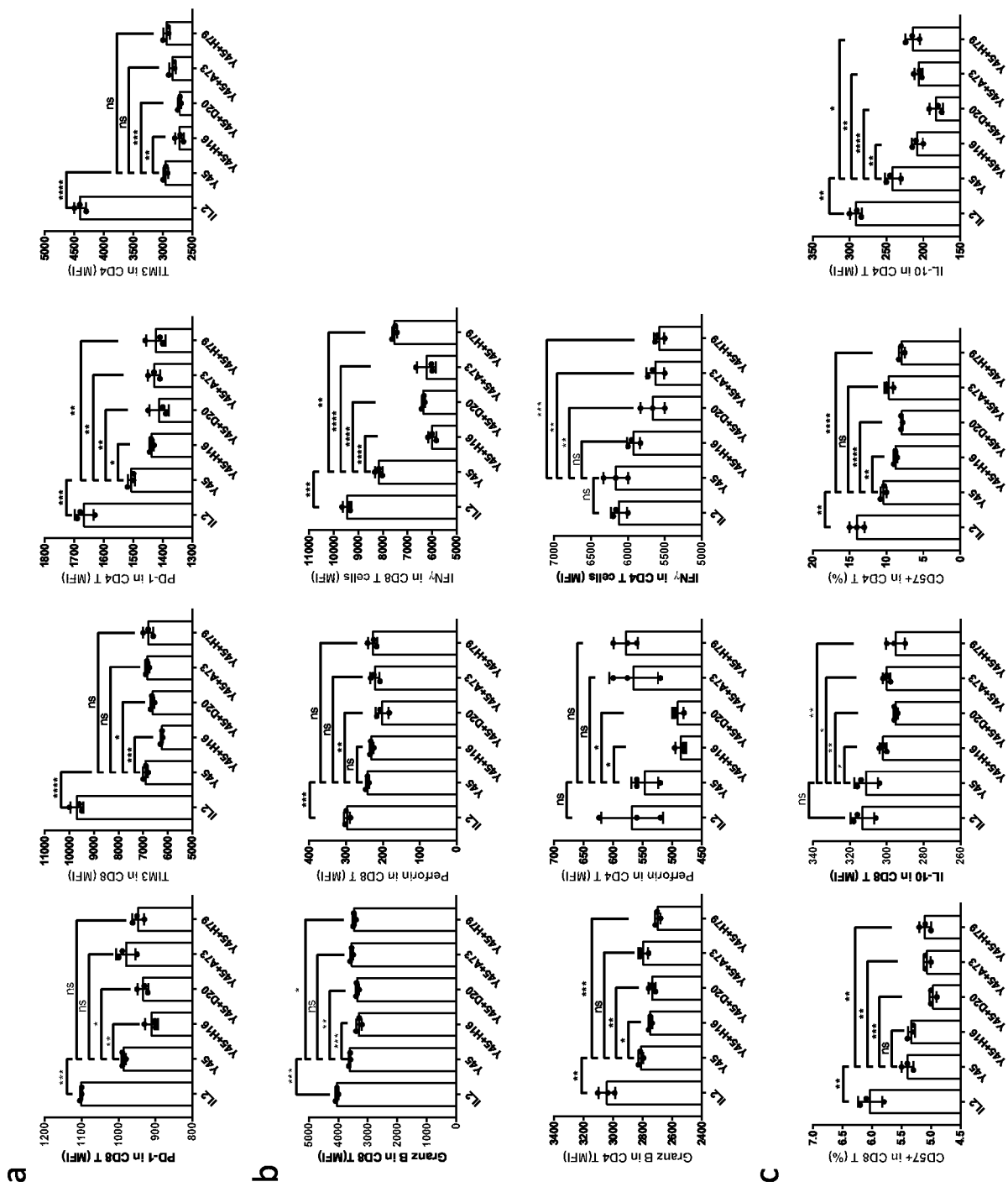


图 13

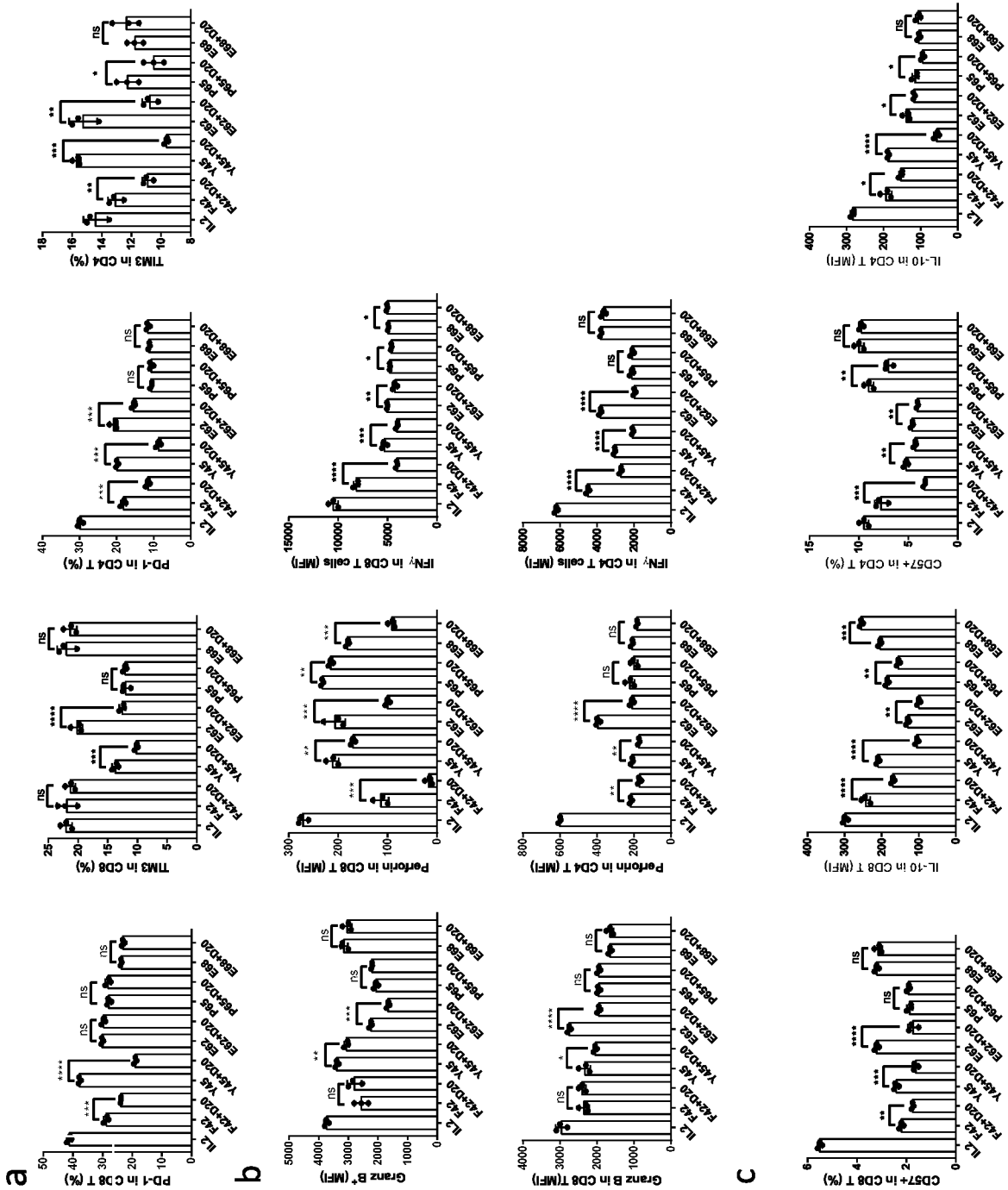


图 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/129975

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/55(2006.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A61K; A61P

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

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

CNABS; CNTXT; ENTXT; VEN, NCBI, EBI, STN, ISI Web of Science, Baidu, 万方数据库, WANFANG DATABASE, CNKI: 受体, 偏向, IL-2, 组合, non-β, non-α, IL2-Rα, IL2-Rβ, 突变, 缀合, F42, Y45, E62, K64, P65, E68, K35, T37, R38, T41, K48, K49, H16, D20, A73, H79, PEG, 非天然氨基酸, 叠氮, click化学, 点击化学, 培养, 过继性细胞治疗, 免疫细胞, 嵌合抗原受体, 免疫应答, 增生性疾病, 肿瘤, 癌症, cancer, adoptive cell therapy, CAR-T, chimeric antigen receptor, combination, synergy, culture, non-natural amino acid, 北京大学宁波海洋药物研究院

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 113660946 A (SYNTHORX, INC.) 16 November 2021 (2021-11-16) description paragraphs 2, 85, 354, 409, 417-433, 448-449, 477-478	54-55, 67-68, 70-72, 76
Y	CN 113660946 A (SYNTHORX, INC.) 16 November 2021 (2021-11-16) description paragraphs 2, 85, 354, 409, 417-433, 448-449, 477-478	1-29, 60, 63-64, 65, 66
Y	CN 110325205 A (CUE BIOPHARMA INC.) 11 October 2019 (2019-10-11) claims 8, 29-35, 70-77	1-29, 60, 63-64, 65, 66
X	CN 111194322 A (SYNTHORX INC.) 22 May 2020 (2020-05-22) description paragraphs 4-15, 238	54-55, 67-68, 70-72, 76
Y	CN 111194322 A (SYNTHORX INC.) 22 May 2020 (2020-05-22) description paragraphs 4-15, 238	1-29, 60, 63-64, 65, 66
A	CN 110642934 A (PEKING UNION MEDICAL COLLEGE HOSPITAL, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES et al.) 03 January 2020 (2020-01-03) entire document	1-76



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

Date of the actual completion of the international search

08 December 2022

Date of mailing of the international search report

21 December 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/129975

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5162503 A (HOFFMANN-LA ROCHE, INC.) 10 November 1992 (1992-11-10) entire document	1-76
A	CN 110366421 A (NEKTAR THERAPEUTICS et al.) 22 October 2019 (2019-10-22) entire document	1-76
A	WO 2021146436 A2 (SYNTHETIKINE INC.) 22 July 2021 (2021-07-22) entire document	1-76
A	CN 102101885 A (SONG, Bo) 22 June 2011 (2011-06-22) entire document	1-76
A	CN 113321722 A (SUZHOU FORLONG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 31 August 2021 (2021-08-31) entire document	1-76
A	ZHANG, Q. et al. "A Human Orthogonal IL-2 and IL-2R β System Enhances CAR T Cell Expansion and Antitumor Activity in a Murine Model of Leukemia" <i>Science Translational Medicine</i> , Vol. 13, No. (625), 22 December 2021 (2021-12-22), eabg6986, pages 1-33	1-76
A	OVERWIJK, W.W. et al. "Engineering IL-2 to Give New Life to T Cell Immunotherapy" <i>Annual Review of Medicine</i> , Vol. vol. 72, 06 November 2020 (2020-11-06), pages 281-311	1-76
A	ZHANG, B. et al. "Site-specific PEGylation of Interleukin-2 Enhances Immunosuppression Via the Sustained Activation of Regulatory T Cells" <i>Nature Biomedical Engineering</i> , Vol. vol. 5, 30 November 2021 (2021-11-30), pages 1288-1305	1-76

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/129975

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

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

[1] The actually submitted sequence listing is an XML file in Standard ST.26.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/129975

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **62, 66 (in part), 68-69 (in part), 70-73, 74 (in part), 75, 76 (in part)**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 62, 66 (in part), 68-69 (in part), 70-73, 74 (in part), 75 and 76 (in part) relate to a method or use for enhancing immune response, and preventing and/or treating proliferative diseases, which falls within the subject matter to be excluded for which no search is performed (PCT Rule 39.1(IV)); methods for treatment of the human or animal body by therapy. A search is carried out on the basis of the use of a corresponding composition or a pharmaceutical composition or an immune cell or an immune cell population or a combination of a composition and an immune cell in the preparation of a drug for treatment of proliferative diseases.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/129975

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113660946	A	16 November 2021	SG	11202107354W	A	30 August 2021
				CO	2021009695	A2	09 August 2021
				CN	114949240	A	30 August 2022
				US	2020330601	A1	22 October 2020
				KR	20210123299	A	13 October 2021
				US	2022016249	A1	20 January 2022
				TW	202045208	A	16 December 2020
				IL	285285	A	30 September 2021
				AU	2020218203	A1	26 August 2021
				EP	3923974	A1	22 December 2021
				MA	54952	A	11 May 2022
				WO	2020163532	A1	13 August 2020
				JP	2022519271	A	22 March 2022
				CA	3127689	A1	13 August 2020
				US	2020246467	A1	06 August 2020
CN	110325205	A	11 October 2019	US	2022289808	A1	15 September 2022
				JP	2020511949	A	23 April 2020
				CA	3043630	A1	28 June 2018
				WO	2018119114	A1	28 June 2018
				US	2020207824	A1	02 July 2020
				EP	3558339	A1	30 October 2019
				BR	112019012964	A2	08 October 2019
				US	2022177536	A1	09 June 2022
				US	2020199181	A1	25 June 2020
				AU	2017379900	A1	13 June 2019
				US	2019352363	A1	21 November 2019
				MX	2019007611	A	29 July 2020
				KR	20190111022	A	01 October 2019
				US	2022340632	A1	27 October 2022
				US	2021107962	A1	15 April 2021
				US	2022356224	A1	10 November 2022
				US	2022064247	A1	03 March 2022
				IL	266696	A	31 July 2019
				US	2022033456	A1	03 February 2022
				US	2021198337	A1	01 July 2021
				TW	201829451	A	16 August 2018
				PH	12019501413	A1	16 March 2020
CN	111194322	A	22 May 2020	MX	2020001332	A	09 September 2020
				MA	49770	A	26 May 2021
				KR	20200035102	A	01 April 2020
				US	2020231644	A1	23 July 2020
				CA	3071016	A1	07 February 2019
				MX	2020001336	A	20 August 2020
				SG	11202000944S	A	27 February 2020
				AR	112969	A1	15 January 2020
				US	2020188484	A1	18 June 2020
				CO	2020001823	A2	01 April 2020
				JP	2020529976	A	15 October 2020
				TW	201920241	A	01 June 2019
				RU	2020107926	A	03 September 2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/129975

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
				BR	112020002272 A2	28 July 2020
				CN	111183149 A	19 May 2020
				PH	12020500241 A1	04 January 2021
				WO	2019028425 A1	07 February 2019
				EP	3661956 A1	10 June 2020
				CA	3071013 A1	07 February 2019
				RU	2020107917 A	03 September 2021
				KR	20200035092 A	01 April 2020
				CO	2020001828 A2	01 April 2020
				JP	2022169649 A	09 November 2022
				MA	49767 A	26 May 2021
				IL	272412 A	31 March 2020
				WO	2019028419 A1	07 February 2019
				AU	2018309166 A1	27 February 2020
				IL	272410 A	31 March 2020
				PH	12020500238 A1	11 January 2021
				US	2020181220 A1	11 June 2020
				SG	11202000939P A	27 February 2020
				BR	112020002271 A2	28 July 2020
				EP	3661955 A1	10 June 2020
				US	2019314455 A1	17 October 2019
				AU	2018309172 A1	27 February 2020
				JP	2020529977 A	15 October 2020
CN	110642934	A	03 January 2020	CN	114853874 A	05 August 2022
				WO	2021093633 A1	20 May 2021
US	5162503	A	10 November 1992	DK	272288 D0	18 May 1988
				JP	S643198 A	06 January 1989
				AT	82755 T	15 December 1992
				EP	0291988 A2	23 November 1988
				DE	3876138 D1	07 January 1993
CN	110366421	A	22 October 2019	IL	269015 A	31 October 2019
				WO	2018160877 A1	07 September 2018
				KR	20190121773 A	28 October 2019
				CA	3055040 A1	07 September 2018
				US	2020016206 A1	16 January 2020
				AU	2018227810 A1	29 August 2019
				JP	2020509018 A	26 March 2020
				MX	2019010382 A	22 October 2019
				EP	3589303 A1	08 January 2020
WO	2021146436	A2	22 July 2021	EP	4090674 A2	23 November 2022
				CA	3166509 A1	22 July 2021
				US	2021275641 A1	09 September 2021
				AU	2021207652 A1	21 July 2022
				KR	20220127867 A	20 September 2022
				IL	294659 A	01 September 2022
CN	102101885	A	22 June 2011	None		
CN	113321722	A	31 August 2021	None		

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/129975

A. 主题的分类

C07K 14/55(2006.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS; CNTXT; ENTXT; VEN, NCBI, EBI, STN, ISI Web of Science, Baidu, 万方数据库, CNKI:受体, 偏向, IL-2, 组合, non-β, non-α, IL2-Rα, IL2-Rβ, 突变, 缀合, F42, Y45, E62, K64, P65, E68, K35, T37, R38, T41, K48, K49, H16, D20, A73, H79, PEG, 非天然氨基酸, 叠氮, click化学, 点击化学, 培养, 过继性细胞治疗, 免疫细胞, 嵌合抗原受体, 免疫应答, 增生性疾病, 肿瘤, 癌症, cancer, adoptive cell therapy, CAR-T, chimeric antigen receptor, combination, synergy, culture, non-natural amino acid, 北京大学宁波海洋药物研究院

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 113660946 A (新索思股份有限公司) 2021年11月16日 (2021 - 11 - 16) 说明书第2、85、354、409、417-433、448-449、477-478段	54-55, 67-68, 70-72, 76
Y	CN 113660946 A (新索思股份有限公司) 2021年11月16日 (2021 - 11 - 16) 说明书第2、85、354、409、417-433、448-449、477-478段	1-29, 60, 63-64, 65, 66
Y	CN 110325205 A (库尔生物制药有限公司) 2019年10月11日 (2019 - 10 - 11) 权利要求8, 29-35, 70-77	1-29, 60, 63-64, 65, 66
X	CN 111194322 A (辛索克斯公司) 2020年5月22日 (2020 - 05 - 22) 说明书第4-15、238段	54-55, 67-68, 70-72, 76
Y	CN 111194322 A (辛索克斯公司) 2020年5月22日 (2020 - 05 - 22) 说明书第4-15、238段	1-29, 60, 63-64, 65, 66
A	CN 110642934 A (中国医学科学院北京协和医院等) 2020年1月3日 (2020 - 01 - 03) 全文	1-76

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年12月8日

国际检索报告邮寄日期

2022年12月21日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

武雪梅

电话号码 86-(10)-53961961

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US 5162503 A (HOFFMANN LA ROCHE) 1992年11月10日 (1992 - 11 - 10) 全文	1-76
A	CN 110366421 A (尼克塔治疗公司等) 2019年10月22日 (2019 - 10 - 22) 全文	1-76
A	WO 2021146436 A2 (SYNTHETIKINE INC.) 2021年7月22日 (2021 - 07 - 22) 全文	1-76
A	CN 102101885 A (宋波) 2011年6月22日 (2011 - 06 - 22) 全文	1-76
A	CN 113321722 A (苏州复融生物技术有限公司) 2021年8月31日 (2021 - 08 - 31) 全文	1-76
A	ZHANG, Q. 等. "A human orthogonal IL-2 and IL-2R β system enhances CAR T cell expansion and antitumor activity in a murine model of leukemia" SCI. TRANS. MED., 第13卷, 第625期, 2021年12月22日 (2021 - 12 - 22), eabg6986, 第1-33页	1-76
A	OVERWIJK, W.W. 等. "Engineering IL-2 to Give New Life to T Cell Immunotherapy" ANNU. REV. MED., 第72卷, 2020年11月6日 (2020 - 11 - 06), 第281-311页	1-76
A	ZHANG, B. 等. "Site-specific PEGylation of interleukin-2 enhances immunosuppression via the sustained activation of regulatory T cells" NATURE BIOMEDICAL ENGINEERING, 第5卷, 2021年11月30日 (2021 - 11 - 30), 第1288-1305页	1-76

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

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

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

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

3. 补充意见:

[1] 实际提交的序列表是ST. 26标准的XML文件。

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 62、66（部分）、68-69（部分）、70-73、74（部分）、75、76（部分）
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求62、66（部分）、68-69（部分）、70-73、74（部分）、75、76（部分）涉及用于增强免疫应答、预防和/或治疗增生性疾病的方法或用途，属于PCT细则39.1(IV)所排除的不予检索的主题：处置人体或动物体的治疗方法。基于相应的组合物或药物组合物或免疫细胞或免疫细胞群或组合物与免疫细胞的组合在制备治疗增生性疾病中的用途进行了检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/129975

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	113660946	A	2021年11月16日	SG	11202107354W	A	2021年8月30日
				CO	2021009695	A2	2021年8月9日
				CN	114949240	A	2022年8月30日
				US	2020330601	A1	2020年10月22日
				KR	20210123299	A	2021年10月13日
				US	2022016249	A1	2022年1月20日
				TW	202045208	A	2020年12月16日
				IL	285285	A	2021年9月30日
				AU	2020218203	A1	2021年8月26日
				EP	3923974	A1	2021年12月22日
				MA	54952	A	2022年5月11日
				WO	2020163532	A1	2020年8月13日
				JP	2022519271	A	2022年3月22日
				CA	3127689	A1	2020年8月13日
				US	2020246467	A1	2020年8月6日
CN	110325205	A	2019年10月11日	US	2022289808	A1	2022年9月15日
				JP	2020511949	A	2020年4月23日
				CA	3043630	A1	2018年6月28日
				WO	2018119114	A1	2018年6月28日
				US	2020207824	A1	2020年7月2日
				EP	3558339	A1	2019年10月30日
				BR	112019012964	A2	2019年10月8日
				US	2022177536	A1	2022年6月9日
				US	2020199181	A1	2020年6月25日
				AU	2017379900	A1	2019年6月13日
				US	2019352363	A1	2019年11月21日
				MX	2019007611	A	2020年7月29日
				KR	20190111022	A	2019年10月1日
				US	2022340632	A1	2022年10月27日
				US	2021107962	A1	2021年4月15日
				US	2022356224	A1	2022年11月10日
				US	2022064247	A1	2022年3月3日
				IL	266696	A	2019年7月31日
				US	2022033456	A1	2022年2月3日
				US	2021198337	A1	2021年7月1日
				TW	201829451	A	2018年8月16日
				PH	12019501413	A1	2020年3月16日
CN	111194322	A	2020年5月22日	MX	2020001332	A	2020年9月9日
				MA	49770	A	2021年5月26日
				KR	20200035102	A	2020年4月1日
				US	2020231644	A1	2020年7月23日
				CA	3071016	A1	2019年2月7日
				MX	2020001336	A	2020年8月20日
				SG	11202000944S	A	2020年2月27日
				AR	112969	A1	2020年1月15日
				US	2020188484	A1	2020年6月18日
				CO	2020001823	A2	2020年4月1日
				JP	2020529976	A	2020年10月15日
				TW	201920241	A	2019年6月1日
				RU	2020107926	A	2021年9月3日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/129975

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		BR 112020002272 A2	2020年7月28日
		CN 111183149 A	2020年5月19日
		PH 12020500241 A1	2021年1月4日
		WO 2019028425 A1	2019年2月7日
		EP 3661956 A1	2020年6月10日
		CA 3071013 A1	2019年2月7日
		RU 2020107917 A	2021年9月3日
		KR 20200035092 A	2020年4月1日
		CO 2020001828 A2	2020年4月1日
		JP 2022169649 A	2022年11月9日
		MA 49767 A	2021年5月26日
		IL 272412 A	2020年3月31日
		WO 2019028419 A1	2019年2月7日
		AU 2018309166 A1	2020年2月27日
		IL 272410 A	2020年3月31日
		PH 12020500238 A1	2021年1月11日
		US 2020181220 A1	2020年6月11日
		SG 11202000939P A	2020年2月27日
		BR 112020002271 A2	2020年7月28日
		EP 3661955 A1	2020年6月10日
		US 2019314455 A1	2019年10月17日
		AU 2018309172 A1	2020年2月27日
		JP 2020529977 A	2020年10月15日
CN 110642934 A	2020年1月3日	CN 114853874 A	2022年8月5日
		WO 2021093633 A1	2021年5月20日
US 5162503 A	1992年11月10日	DK 272288 D0	1988年5月18日
		JP S643198 A	1989年1月6日
		AT 82755 T	1992年12月15日
		EP 0291988 A2	1988年11月23日
		DE 3876138 D1	1993年1月7日
CN 110366421 A	2019年10月22日	IL 269015 A	2019年10月31日
		WO 2018160877 A1	2018年9月7日
		KR 20190121773 A	2019年10月28日
		CA 3055040 A1	2018年9月7日
		US 2020016206 A1	2020年1月16日
		AU 2018227810 A1	2019年8月29日
		JP 2020509018 A	2020年3月26日
		MX 2019010382 A	2019年10月22日
		EP 3589303 A1	2020年1月8日
WO 2021146436 A2	2021年7月22日	EP 4090674 A2	2022年11月23日
		CA 3166509 A1	2021年7月22日
		US 2021275641 A1	2021年9月9日
		AU 2021207652 A1	2022年7月21日
		KR 20220127867 A	2022年9月20日
		IL 294659 A	2022年9月1日
CN 102101885 A	2011年6月22日	无	
CN 113321722 A	2021年8月31日	无	