



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118515780 A

(43) 申请公布日 2024.08.20

(21) 申请号 202410591221.4

(74) 专利代理机构 深圳永慧知识产权代理事务

(22) 申请日 2018.11.28

所(普通合伙) 44378

(30) 优先权数据

专利代理人 黄鑫

62/595,357 2017.12.06 US

(51) Int.Cl.

62/675,972 2018.05.24 US

C07K 19/00 (2006.01)

16/109,875 2018.08.23 US

C07K 14/55 (2006.01)

16/109,897 2018.08.23 US

C12N 15/62 (2006.01)

62/721,644 2018.08.23 US

C12N 15/26 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

C12N 5/10 (2006.01)

201880077653.6 2018.11.28

C12N 15/85 (2006.01)

(71) 申请人 潘迪恩运营公司

A61K 38/20 (2006.01)

地址 美国马萨诸塞州

A61K 47/68 (2017.01)

(72) 发明人 N·希金森-斯科特 J·L·瓦伊尼
J·威斯维斯瓦拉亚
E·R·桑普森 K·L·奥蒂波比

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

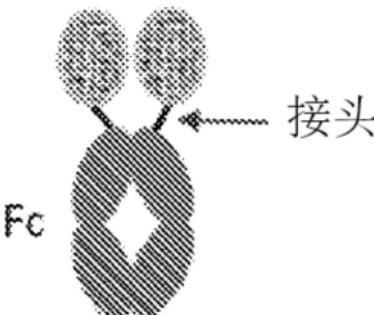
(54) 发明名称

IL-2突变蛋白及其用途

(57) 摘要

本文描述了可以调节(例如增加)T-reg细胞增殖、存活、激活和/或功能的治疗剂。在一些实施方式中,所述调节对T-reg细胞是选择性或特异性的。本申请提供了IL-2突变蛋白、包含其的组合物及其使用方法。在另一方面,本发明实施方式提供组合物,例如,药学上可接受的组合物,其包含与药学上可接受的载剂一起配制的本文所述的治疗性化合物(IL-2突变蛋白)。包含本文所述的治疗性化合物的试剂盒也在本发明的范围内。

IL-2突变蛋白



1. 一种用于激活调节性T细胞的二聚体,其中所述二聚体包含两个肽,每个肽独立地由SEQ ID NO:40的序列组成。
2. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1所述的二聚体和药学上可接受的载剂。
3. 根据权利要求1所述的二聚体在制备用于激活T调节细胞的药物中的用途。
4. 根据权利要求1所述的二聚体在制备用于治疗受试者的炎性病症的药物中的用途。
5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述炎性病症是斑秃、特应性皮炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、白癜风和系统性红斑狼疮(SLE)。
6. 根据权利要求1所述的二聚体在制备用于促进或刺激T调节细胞中STAT5磷酸化的药物中的用途。
7. 根据权利要求2所述的药物组合物在制备用于激活T调节细胞的药物中的用途。
8. 根据权利要求2所述的药物组合物在制备用于治疗受试者的炎性病症的药物中的用途。
9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述炎性病症是斑秃、特应性皮炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、白癜风和系统性红斑狼疮(SLE)。
10. 根据权利要求2所述的药物组合物在制备用于促进或刺激T调节细胞中STAT5磷酸化的药物中的用途。
11. 根据权利要求4所述的用途,其中所述炎性病症是斑秃。
12. 根据权利要求4所述的用途,其中所述炎性病症是特应性皮炎。
13. 根据权利要求4所述的用途,其中所述炎性病症是克罗恩病。
14. 根据权利要求4所述的用途,其中所述炎性病症是溃疡性结肠炎。
15. 根据权利要求4所述的用途,其中所述炎性病症是白癜风。
16. 根据权利要求4所述的用途,其中所述炎性病症是系统性红斑狼疮(SLE)。
17. 根据权利要求8所述的用途,其中所述炎性病症是斑秃。
18. 根据权利要求8所述的用途,其中所述炎性病症是特应性皮炎。
19. 根据权利要求8所述的用途,其中所述炎性病症是克罗恩病。
20. 根据权利要求8所述的用途,其中所述炎性病症是溃疡性结肠炎。
21. 根据权利要求8所述的用途,其中所述炎性病症是白癜风。
22. 根据权利要求8所述的用途,其中所述炎性病症是系统性红斑狼疮(SLE)。

IL-2突变蛋白及其用途

技术领域

[0001] 本文提供的实施方式涉及称为IL-2突变蛋白的蛋白质、包含其的组合物及其使用方法。

背景技术

[0002] IL-2结合三个跨膜受体亚基:IL-2R β 和IL-2R γ (它们在IL-2结合后一起激活细胞内信号传导事件),和CD25(IL-2R α) (其用于将IL-2呈递至其他2个受体亚基)。IL-2R β γ 传递的信号包括PI3-激酶、Ras-MAP-激酶和STAT5途径的信号。

[0003] T细胞需要CD25的表达以应答通常存在于组织中的低浓度IL-2。表达CD25的T细胞包括CD4 $^+$ FOXP3 $^+$ 调节性T细胞(T-reg细胞)-其对于抑制自身免疫性炎症而言是必需的-和FOXP3 $^-$ T细胞,其已被激活以表达CD25。FOXP3 $^-$ CD4 $^+$ T效应细胞(T-eff)可以是CD4 $^+$ 或CD8 $^+$ 细胞,两者都可以是促炎的,并且可以有助于自身免疫性和其中受试者的免疫系统攻击器官或其他组织的其他疾病。IL-2刺激的STAT5信号传导对于正常T-reg细胞生长和存活以及对于高FOXP3表达而言是关键的。

[0004] 由于IL-2对三条IL-2R链中的每一条具有的亲和力低,对IL-2R β 和IL-2R γ 亲和力的进一步降低可以被对CD25亲和力的增加所抵消。已经产生了IL-2的突变变体。这些IL-2突变体可称为IL-2突变蛋白,并已发现可用于治疗多种疾病。然而,仍然需要可用于各种应用和组合物的其他IL-2突变蛋白。本发明实施方式满足这些需求以及其他需求。

发明内容

[0005] 在一些实施式中,提供了包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的肽,其中所述肽包含在73、76、100或138位处的突变。

[0006] 在一些实施方式中,提供了包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的肽,其中所述肽包含在53、56、80或118位处的突变。

[0007] 在一些实施方式中,肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:43,其中X₁、X₂、和X₃和X₄中至少一个为I,并且其余为L或I。

[0008] 还提供了包含所述肽的药物组合物和编码本文所述蛋白质的核酸分子。本文还提供了包含编码本文所述蛋白质的核酸分子的载体。在一些实施方式中,提供了包含编码本文所述蛋白质的核酸的质粒。在一些实施方式中,提供了包含编码本文所述蛋白质的核酸分子、载体或质粒的细胞。

[0009] 在一些实施方式中,提供了激活T调节细胞的方法。在一些实施方式中,所述方法包括使T调节细胞与本文所述的肽或本文所述的药物组合物接触。

[0010] 在一些实施方式中,提供了治疗受试者中的炎性病症的方法。在一些实施方式中,所述方法包括向受试者,包括但不限于有需要的受试者,施用肽(例如治疗有效量的肽)。

[0011] 在一些实施方式中,提供了促进或刺激T调节细胞中STAT5磷酸化的方法。在一些实施方式中,所述方法包括向受试者施用肽(例如治疗有效量的肽)。

附图说明

[0012] 图1显示了本文提供的IL-2突变蛋白的非限制性实施方式。

具体实施方式

[0013] 本文描述了可以调节(例如增加)T-reg细胞增殖、存活、激活和/或功能的治疗剂。在一些实施方式中,所述调节对T-reg细胞是选择性或特异性的。

[0014] 如本文所用,术语“选择性”是指治疗剂或蛋白质调节T-reg细胞中的活性,但促进非调节性T细胞中的活性的能力有限或缺乏。

[0015] 在一些实施方式中,治疗剂是IL-2的突变体。IL-2的突变体可称为IL-2突变蛋白。IL-2可以以两种不同形式(未成熟形式和成熟形式)存在。成熟形式是前导序列已经被去除的形式。这在翻译后过程中完成。未成熟IL-2的野生型序列如下:

[0016] MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMP KKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:1)。

[0017] 成熟IL-2的野生型序列如下:

[0018] APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE ELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI ISTLT (成熟IL-2序列) (SEQ ID NO:2)。

[0019] IL-2突变蛋白分子可通过使IL-2的一个或多个残基突变来制备。IL-2突变蛋白的非限制性实例可在W02016/164937、US9580486、US7105653、US9616105、US 9428567、US2017/0051029、US2014/0286898A1、W02014153111A2、W02010/085495、W02016014428A2、W02016025385A1和US20060269515中找到,将它们各自以其全文通过引用并入。

[0020] 在一些实施方式中,上述序列(SEQ ID NO:2)的1位处的丙氨酸缺失。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白分子包含置换在成熟IL-2序列125位处的半胱氨酸的丝氨酸。IL-2突变蛋白分子的突变和置换的其他组合描述于US20060269515,将其以其全文通过引用并入。在一些实施方式中,125位处的半胱氨酸也被缬氨酸或丙氨酸置换。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白分子包含V91K置换。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白分子包含N88D置换。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白分子包含N88R置换。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白分子包含H16E、D84K、V91N、N88D、V91K或V91R置换,其任意组合。在一些实施方式中,这些IL-2突变蛋白分子还包含如本文所述的125位处的置换。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白分子包含选自由下述组成的组中的一个或多个置换:T3N、T3A、L12G、L12K、L12Q、L12S、Q13G、E15A、E15G、E15S、H16A、H16D、H16G、H16K、H16M、H16N、H16R、H16S、H16T、H16V、H16Y、L19A、L19D、L19E、L19G、L19N、L19R、L19S、L19T、L19V、D20A、D20E、D20H、D20I、D20Y、D20F、D20G、D20T、D20W、M23R、R81A、R81G、R81S、R81T、D84A、D84E、D84G、D84I、D84M、D84QD84R、D84S、D84T、S87R、N88A、N88D、N88E、N88I、N88F、N88G、N88M、N88R、N88S、N88V、N88W、V91D、V91E、V91G、V91S、I92K、I92R、E95G和Q126。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白分子的氨基酸序列与成熟IL-2序列中所示的氨基酸序列的不同之处在于C125A或C125S置换和选自T3N、T3A、L12G、L12K、L12Q、L12S、Q13G、E15A、E15G、E15S、H16A、H16D、H16G、H16K、H16M、H16N、H16R、H16S、H16T、H16V、H16Y、L19A、L19D、L19E、L19G、L19N、L19R、L19S、L19T、L19V、D20A、D20E、D20F、

D20G、D20T、D20W、M23R、R81A、R81G、R81S、R81T、D84A、D84E、D84G、D84I、D84M、D84Q、D84R、D84S、D84T、S87R、N88A、N88D、N88E、N88F、N88I、N88G、N88M、N88R、N88S、N88V、N88W、V91D、V91E、V91G、V91S、I92K、I92R、E95G、Q126I、Q126L和Q126F中的一个置换。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白分子与成熟IL-2序列中所示的氨基酸序列的不同之处在于C125A或C125S置换和选自D20H、D20I、D20Y、D20E、D20G、D20W、D84A、D84S、H16D、H16G、H16K、H16R、H16T、H16V、I92K、I92R、L12K、L19D、L19N、L19T、N88D、N88R、N88S、V91D、V91G、V91K和V91S中的一个置换。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含N88R和/或D20H突变。

[0021] 在一些实施方式中,IL-2突变蛋白分子在多肽序列中包含选自由30位氨基酸、31位氨基酸、35位氨基酸、69位氨基酸和74位氨基酸组成的组中的位置处的突变,在一些实施方式中,30位处的突变是N30S。在一些实施方式中,31位处的突变是Y31H。在一些实施方式中,35位处的突变是K35R。在一些实施方式中,69位处的突变是V69A。在一些实施方式中,74位处的突变是Q74P。在一些实施方式中,突变蛋白不包含在30、31和/或35位处的突变。

[0022] 在一些实施方式中,相对于以上提供的成熟的人IL-2序列,IL-2突变蛋白分子包含选自由下述组成的组中的置换:N88R、N88I、N88G、D20H、D109C、Q126L、Q126F、D84G或D84I。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白分子包含D109C置换以及N88R置换和C125S置换中的一种或两种。在一些实施方式中,在IL-2突变蛋白分子中位于109位的半胱氨酸与聚乙二醇部分连接,其中聚乙二醇部分的分子量为约5至约40kDa。在一些实施方式中,突变蛋白不包含在109、126或84位处的突变。

[0023] 在一些实施方式中,本文所述的任何置换与125位处的置换组合。所述置换可以是C125S、C125A或C125V置换。在一些实施方式中,突变蛋白不包含在125位处的突变。

[0024] 除非另有说明,本文中所指的IL-2突变蛋白的编号参考成熟序列。如果序列或位置参考SEQ ID NO:1,则其是未成熟序列。然而,为了将位置从未成熟序列(SEQ ID NO:1)转换为成熟序列(SEQ ID NO:2),所有需要做的是从参考SEQ ID NO:1的位置减去20,以获得SEQ ID NO:2中的相应位置。

[0025] 除了本文所述的置换或突变之外,在一些实施方式中,IL-2突变蛋白在对应于SEQ ID NO:1的73、76、100或138位中的一个或多个位置或在对应于SEQ ID NO:2的53、56、80或118位中的一个或多个位置处具有置换/突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白在对应于SEQ ID NO:1的下述位置处包含突变:73和76;73和100;73和138;76和100;76和138;100和138;73、76和100;73、76和138;73、100和138;76、100和138;或者73、76、100和138中的每一个。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白在对应于SEQ ID NO:2的下述位置处包含突变:53和56;53和80;53和118;56和80;56和118;80和118;53、56和80;53、56和118;53、80和118;56、80和118;或者53、56、80和118中的每一个。由于IL-2可以与其他蛋白质融合或拴系(tethered),如本文所用,所述术语对应于参照SEQ ID NO:6或15是指序列如何与比对软件的默认设置比对,例如可以与NCBI网站一起使用。在一些实施方式中,突变是亮氨酸至异亮氨酸。因此,IL-2突变蛋白在对应于SEQ ID NO:1的73、76、100或138位或者在对应于SEQ ID NO:2的53、56、80或118位中的一个或多个位置处包含一个或多个异亮氨酸。在一些实施方式中,突变蛋白在对应于SEQ ID NO:2的L53处包含突变。在一些实施方式中,突变蛋白在对应于SEQ ID NO:2的L56处包含突变。在一些实施方式中,突变蛋白在对应于SEQ ID NO:2的L80处包含突变。在一些实施方式中,突变蛋白在对应于SEQ ID NO:2的L118处包含突变。在

一些实施方式中,突变是亮氨酸至异亮氨酸。在一些实施方式中,突变蛋白还在这些突变蛋白中对应于SEQ ID N0:2的69、74、88、125位处包含突变,或包含其任意组合。在一些实施方式中,突变是V69A突变。在一些实施方式中,突变是Q74P突变。在一些实施方式中,突变是N88D或N88R突变。在一些实施方式中,突变是C125A或C125S突变。

[0026] 在一些实施方式中,IL-2突变蛋白在对应于SEQ ID N0:1的49、51、55、57、68、89、91、94、108和145位中的一个或多个位置或对应于SEQ ID N0:2的29、31、35、37、48、69、71、74、88和125位中的一个或多个位置处包含突变。置换可以单独使用或者彼此组合使用。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白在49、51、55、57、68、89、91、94、108和145位中的2、3、4、5、6、7、8、9个或每一个位置处包含突变。此类组合的非限制性实例包括但不限于在以下位置处的突变:49、51、55、57、68、89、91、94、108和145;49、51、55、57、68、89、91、94和108;49、51、55、57、68、89、91和94;49、51、55、57、68、89和91;49、51、55、57、68和89;49、51、55、57和68;49、51、55和57;49、51和55;49和51;51、55、57、68、89、91、94、108和145;51、55、57、68、89、91、94和108;51、55、57、68、89、91和94;51、55、57、68、89和91;51、55、57、68和89;55、57和68;55和57;55、57、68、89、91、94、108和145;55、57、68、89、91、94和108;55、57、68、89、91和94;55、57、68、89、91和94;55、57、68、89和91;55、57、68和89;55、57和68;55和57;57、68、89、91、94、108和145;68、89、91、94和108;68、89、91和94;68、89和91;68和89;89、91、94、108和145;89、91、94和108;89、91和94;89和91;91、94、108和145;91、94和108;91和94;或94和108。每个突变可以彼此组合。在SEQ ID N0:2中可以进行相同的置换,但是如从本公开清楚的,编号将适当地调整(比SEQ ID N0:1的编号少20,对应于SEQ ID N0:2中的位置)。

[0027] 在一些实施方式中,IL-2突变蛋白在对应于SEQ ID N0:1的35、36、42、104、115或146位或在SEQ ID N0:2的等同位置(例如,15、16、22、84、95和126位)中的一个或多个位置处包含突变。这些突变可以与本文所述的其他亮氨酸至异亮氨酸突变或者在对应于SEQ ID N0:1的73、76、100或138位处或者在对应于SEQ ID N0:2的53、56、80或118位中的一个或多个位置处的突变组合。在一些实施方式中,突变是E35Q、H36N、Q42E、D104N、E115Q或Q146E,或者其任意组合。在一些实施方式中,这些置换中的一个或多个是野生型。在一些实施方式中,突变蛋白在对应于SEQ ID N0:1的35、36、42、104、115或146位或在SEQ ID N0:2的等同位置(例如,15、16、22、84、95或126位)中的一个或多个位置处包含野生型残基。

[0028] 这些位置处的突变可与本文所述的任何其他突变组合,所述其他突变包括但不限于在本文和上文所述的对应于SEQ ID N0:1的73、76、100或138位或在对应于SEQ ID N0:2的53、56、80或118位中的一个或多个位置处的置换。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID N0:1的N49S突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID N0:1的Y51S或Y51H突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID N0:1的K55R突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID N0:1的T57A突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID N0:1的K68E突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID N0:1的V89A突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID N0:1的N91R突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID N0:1的Q94P突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID N0:1的N108D或N108R突变。在一

些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID NO:1的C145A或C145S突变。

[0029] 这些置换可以单独使用或彼此组合使用。在一些实施方式中,突变蛋白包含这些置换中的每一个。在一些实施方式中,突变蛋白包含这些突变中的1、2、3、4、5、6、7或8个。在一些实施方式中,突变蛋白在对应于SEQ ID NO:1的35、36、42、104、115或146位或在SEQ ID NO:2的等同位置(例如15、16、22、84、95、126和126位)中的一个或多个位置处包含野生型残基。

[0030] 在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID NO:2的N29S突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID NO:2的Y31S或Y31H突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID NO:2的K35R突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID NO:2的T37A突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID NO:2的K48E突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID NO:2的V69A突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID NO:2的N71R突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID NO:2的Q74P突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID NO:2的N88D或N88R突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含对应于SEQ ID NO:2的C125A或C125S突变。这些置换可以单独使用或彼此组合使用。在一些实施方式中,突变蛋白包含这些突变中的1、2、3、4、5、6、7或8个。在一些实施方式中,突变蛋白包含这些置换中的每一个。在一些实施方式中,突变蛋白在对应于SEQ ID NO:1的35、36、42、104、115或146位或在SEQ ID NO:2的等同位置(例如15、16、22、84、95和126位)中的一个或多个位置处包含野生型残基。

[0031] 对于本文所述的任何IL-2突变蛋白,在一些实施方式中,对应于SEQ ID NO:1的35、36、42、104、115或146位或在SEQ ID NO:2的等同位置(例如15、16、22、84、95和126位)中的一个或多个位置是野生型的(例如如SEQ ID NO:1或2所示)。在一些实施方式中,对应于SEQ ID NO:1的35、36、42、104、115或146位或在SEQ ID NO:2的等同位置(例如15、16、22、84、95和126位)中的2、3、4、5、6个或每一个位置是野生型的。

[0032] 在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含以下序列:

[0033] MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGISNHKNPRLARMLT FKFYMP EKATEIKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKSGETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO:3)

[0034] 在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含以下序列:

[0035] MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGISNHKNPRLARMLT FKFYMP EKATELKHIQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKSGETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO:4)

[0036] 在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含以下序列:

[0037] MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGISNHKNPRLARMLT FKFYMP EKATELKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHIRPRDLISDINVIVLELKSGETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO:5)

[0038] 在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含以下序列:

[0039] MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGISNHKNPRLARMLT FKFYMP EKATELKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKSGETTFMCEY

ADETATIVEFINRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO:6)

[0040] 在一些实施方式中,本文所述IL-2突变蛋白序列不包含IL-2前导序列。IL-2前导序列可以由序列MYRMQLLSCIALSLALVTNS (SEQ ID NO:7) 表示。因此,在一些实施方式中,上文所示的序列也可涵盖不具有前导序列的肽。尽管示出仅在对应于SEQ ID NO:1的位置73、76、100或138位中的一个位置或对应于SEQ ID NO:2的53、56、80或118位中的一个或多个位置处具有突变的SEQ ID NO:3-6,但所述肽可在这些位置包含1、2、3或4个突变。在一些实施方式中,每个位置处的置换是异亮氨酸或其他类型的保守性氨基酸置换。在一些实施方式中,在所述位置处的亮氨酸独立地被异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸或甘氨酸、丙氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸置换。

[0041] 在一些实施方式中,SEQ ID NO:2的IL-2蛋白包含以下突变:V69A、Q74P、N88D,和C125S或C125A,以及选自由L53I、L56I、L80I和L118I组成的组中的一个突变。在一些实施方式中,IL-2蛋白包含选自由L53I、L56I、L80I和L118I组成的组中的两个突变。在一些实施方式中,IL-2蛋白包含选自由L53I、L56I、L80I和L118I组成的组中的三个突变或者每一个突变。在一些实施方式中,IL-2蛋白包含L53I和L56I,L53I和L80I,L53I和L118I,L56I和L80I,L56I和L118I,L80I和L118I,L53I、L56I和L80I,L53I、L56I和L118I,L56I、L80I和L118I,或L53I、L56I、L80I和L118I。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白不包含L53I、L56I、L80I或L118I突变。在一些实施方式中,IL-2突变蛋白包含T3A突变。

[0042] 在一些实施方式中,SEQ ID NO:2的IL-2蛋白包含以下突变:V69A、Q74P、N88D,和C125S或C125A,以及SEQ ID NO:2的45-55、50-60、52-57、75-85、100-130、115-125区域中的一个或多个突变,例如但不限于保守性置换。

[0043] 在一些实施方式中,IL-2突变蛋白分子与Fc区或如本文所述的其他接头区融合。这种融合蛋白的实例可在US9580486、US7105653、US9616105、US9428567、US2017/0051029、W02016/164937、US2014/0286898A1、W02014153111A2、W02010/085495、W02016014428A2、W02016025385A1、US2017/0037102和US2006/0269515中找到,将它们各自以其全文通过引用并入。

[0044] 在一些实施方式中,Fc区包含LALA突变处已知的突变。在一些实施方式中,Fc区包含L234A和L235A突变(EU编号)。在一些实施方式中,Fc区包含G237A(EU编号)。在一些实施方式中,Fc区不包含G237位(EU编号)处的突变。使用Kabat编号,这将对应于L247A、L248A和/或G250A。在一些实施方式中,使用EU编号系统,Fc区包含L234A突变、L235A突变和/或G237A突变。无论使用何种编号系统,在一些实施方式中,Fc部分可包含对应于这些残基中的一个或多个的突变。在一些实施方式中,Fc区包含N297G或N297A(kabat编号)突变。Kabat编号基于全长序列,但基于本领域技术人员对Fc区使用的传统比对将以片段形式使用(参见,例如Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest," US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91,将其通过引用并入本文),将其通过引用并入本文。在一些实施方式中,Fc区包含以下序列:

[0045] DKTHTCPPCPAPEAAGAPSFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPG. (SEQ ID NO:8)

[0046] 在一些实施方式中,Fc区包含以下序列:

[0047] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKS
LSLSPG (SEQ ID NO:15)

[0048] 在一些实施方式中,IL-2突变蛋白与Fc区连接。接头的非限制性实例是甘氨酸/丝氨酸接头。例如,甘氨酸/丝氨酸接头可以是或包含序列GGGGSGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:9),或者可以是或包含序列GGGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:16)。这只是一个非限制性实例,并且接头可以具有不同数量的GGGS (SEQ ID NO:10) 重复。在一些实施方式中,接头包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个GGGS (SEQ ID NO:10) 重复。

[0049] 在一些实施方式中,使用柔性、刚性或可切割接头将IL-2突变蛋白连接至Fc区。接头可以如本文所述或如下表中所示:

[0050]

类型	序列
柔性	GGGS
柔性	(GGGS) ₃
柔性	(GGGS) _n (n=1, 2, 3, 4)
柔性	(Gly) ₈
柔性	(Gly) ₆
刚性	(EAAK) ₃
刚性	(EAAK) _n (n=1-3)
刚性	A (EAAK) ₄ ALEA (EAAK) ₄ A
刚性	AEAAAKEAAAKA
刚性	PAPAP
刚性	(Ala-Pro) _n (10-34aa)
可切割	二硫化物
可切割	VSQTSKLTRAETVFPDV
可切割	PLGLWA
可切割	RVLAEA
可切割	EDVVCCSMSY
可切割	GGIEGRGS
可切割	TRHRQPRGWE
可切割	AGNRVRRSVG
可切割	RRRRRRRR
可切割	GFLG
二肽	LE

[0051] 因此,IL-2/Fc融合体可以由式 $Z_{IL-2M}-L_{gs}-Z_{Fc}$ 表示,其中 Z_{IL-2M} 是如本文所述的IL-2突变蛋白, L_{gs} 是如本文所述的接头序列(例如甘氨酸/丝氨酸接头),并且 Z_{Fc} 是本文所述的或本领域技术人员已知的Fc区。在一些实施方式中,式可以是反向取向 $Z_{Fc}-L_{gs}-Z_{IL-2M}$ 。

[0052] 在一些实施方式中,IL-2/Fc融合体包含以下序列:

[0053] MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGISNHKNPRLARMLTFKFYMPK
KATEIKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF
SQSIIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTCPCPAPEAAGAPSFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:11)

[0054] 在一些实施方式中, IL-2/Fc融合体包含以下序列:

[0055] MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGISNHKNPRLARMLTFKFYMPK
KATELKHIQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF
SQSIIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTCPCPAPEAAGAPSFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:12)

[0056] 在一些实施方式中, IL-2/Fc融合体包含以下序列:

[0057] MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGISNHKNPRLARMLTFKFYMPK
KATELKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHIRPRDLISDINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF
SQSIIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTCPCPAPEAAGAPSFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:13)

[0058] 在一些实施方式中, IL-2/Fc融合体包含以下序列:

[0059] MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGISNHKNPRLARMLTFKFYMPK
KATELKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELGSETTFMCEYADETATIVEFINRWITF
SQSIIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTCPCPAPEAAGAPSFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:14)。

[0060] 在一些实施方式中, SEQ ID NO:8的Fc区被SEQ ID NO:15置换。

[0061] 本文所述的蛋白质也可与另一蛋白质(例如抗体或其他类型的治疗性分子)融合。

[0062] 在一些实施方式中, IL-2突变蛋白或IL-2/Fc融合体的序列如下表所示:

SEQ ID NO:	简要描述	氨基酸序列
[0063]	17	人 IL-2, 具有 C125S 突变
	18	人 IL-2, 具有 C125S 和 T3A 突变
	19	人 IL-2, 具有

[0064]

	N88R 和 C125S	ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
20	人 IL-2, 具有 V69A 、 Q74P 和 C125S 突变	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
21	人 IL-2, 具有 V69A 、 Q74P 、 N88D 和 C125S 突变	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
22	人 IL-2, 具有 V69A 、 Q74P 、 N88R 和 C125S 突变	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
23	人 IL-2, 具有 N88D 和 C125S	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVNLQAQSKNFHLRPRDLISINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
24	人 IL-2, 具有 L53I 、 V69A 、 Q74P 、 N88D 和 C125S 突变	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATEIKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISINVIVLEKGSE TTTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
25	人 IL-2, 具有 L53I 、 V69A 、 Q74P 、 N88D 和 C125S 突变	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHIQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISINVIVLEKGSE TTTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
26	人 IL-2, 具有 V69A 、 Q74P 、 L80I 、 N88D 和 C125S 突变	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISINVIVLEKGSE TTTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
27	人 IL-2, 具有 V69A 、 Q74P 、 N88D 、 L118I , 和 C125S 突变	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
28	人 IgG1 Fc (N-末端融合体), 具有 L234A 、 L235A 和 G237A 突变	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	人 IgG1 Fc (截短的), 具有 N297G 突变	DKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYQSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	IL-2 C125S-G4Sx3-Fc	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVNLQAQSKNFHLRPRDLISINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGGGGGGGSD KTHTCPPCPAPEAAGAPSFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	IL-2 T3A 、 C125S-G4Sx3-	APASSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVNLQAQSKNFHLRPRDLISINVIVLEKG

	Fc	SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGGS DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
32	IL-2 N88R 、 C125S-G4Sx3- Fc	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVNLQAQSKNFHLPRLDISRINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSD KTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE PEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
33	IL-2 V69A 、 Q74P 、 C125S,-G4Sx3- Fc	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSD KTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE PEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
[0065]	34	IL-2 N88D V69A、Q74P、 C125S-G4Sx3- Fc	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSD KTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE PEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
	35	IL-2 N88R V69A、Q74P、 C125S-G4Sx3- Fc	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSD KTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE PEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
	36	IL-2 N88D 、 C125S-G4Sx3- Fc	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVNLQAQSKNFHLPRLDISDINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSD KTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE PEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

37	IL-2 L53I 、 N88D、 V69A、 Q74P 、 C125S-G4Sx4- Fc	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATEIKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGGGGGG GGSDKTHTCPCPAPEAAGAPSFLFPPPKDKTLMSRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
38	IL-2 L56I N88D、 V69A、 Q74P 、 C125S-G4Sx4- Fc	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHIQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGGGGGG GGSDKTHTCPCPAPEAAGAPSFLFPPPKDKTLMSRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
39	IL-2 L80I N88D V69A、 Q74P 、 C125S-G4Sx4- Fc	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGGGGGG GGSDKTHTCPCPAPEAAGAPSFLFPPPKDKTLMSRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
[0066]	40	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGGGG GGSDKTHTCPCPAPEAAGAPSFLFPPPKDKTLMSRTPEVTCVVVD VSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
41	IL-2 N88D V69A、 Q74P、 C125S-G4Sx4- Fc	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGGGG GGSDKTHTCPCPAPEAAGAPSFLFPPPKDKTLMSRTPEVTCVVVD VSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
42	Fc-G4S-IL-2 N88D V69A、 Q74P	DKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSAFTSSSTKKTQ LQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL EEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEKGSETTFMCEYAD ETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
[0067]	43 IL-2 N88D V69A、 Q74P、 C125S-G4Sx4- Fc, 其中 X ₁ 、 X ₂ 、X ₃ 和 X ₄ 中 的至少一个是 I, 并且其余是 L 或 I ₁	APTSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATEX ₁ KHX ₂ QCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHX ₃ RPRDLISDINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFX ₄ NRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGGGG SGGGGSDKTHTCPCPAPEAAGAPSFLFPPPKDKTLMSRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0068] 也可认为每种蛋白质具有如本文提供的C125S和LALA和/或G237A突变。C125置换也可以是如整个本申请中所述的C125A。

[0069] 在一些实施方式中,表中或整个本申请中所示的序列包含或不包含对应于位置L53、L56、L80和L118位的一个或多个突变。在一些实施方式中,表中或整个本申请中所示的序列包含或不包含对应于L59I、L63I、I24L、L94I、L96I或L132I位的一个或多个突变,或在相同位置的其他置换。在一些实施方式中,突变是亮氨酸至异亮氨酸。在一些实施方式中,突变蛋白不包含除如本文所示或所述以外的另一突变。在一些实施方式中,所述肽包含以下序列:SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:43。

[0070] 在一些实施方式中,不包括融合体的Fc部分。在一些实施方式中,所述肽基本上由本文提供的IL-2突变蛋白组成。在一些实施方式中,蛋白质不含Fc部分。

[0071] 在一些实施方式中,提供了包含SEQ ID NO:43的多肽,其中X₁、X₂、X₃和X₄中的至少一个是I,并且其余是L或I。在一些实施方式中,X₁、X₂和X₃是L并且X₄是I。在一些实施方式中,X₁、X₂和X₄是L并且X₃是I。在一些实施方式中,X₂、X₃和X₄是L并且X₁是I。在一些实施方式中,X₁、X₃和X₄是L并且X₂是I。在一些实施方式中,X₁、X₂是L并且X₃和X₄是I。在一些实施方式中,X₁和X₃是L并且X₂和X₄是I。在一些实施方式中,X₁和X₄是L并且X₂和X₃是I。在一些实施方式中,X₂和X₃是L并且X₁和X₄是I。在一些实施方式中,X₂和X₄是L并且X₁和X₃是I。在一些实施方式中,X₃和X₄是L并且X₁和X₂是I。在一些实施方式中,X₁、X₂和X₃是L并且X₄是I。在一些实施方式中,X₂、X₃和X₄是L并且X₁是I。在一些实施方式中,X₁、X₃和X₄是L并且X₂是I。在一些实施方式中,X₁、X₂和X₄是L并且X₃是I。

[0072] 在一些实施方式中,IL-2突变蛋白可以是如图1所示的形式。但是如本文所述,在一些实施方式中,可以使用没有Fc结构域的IL-2突变蛋白,或者Fc结构域与IL-2突变蛋白的N-末端连接,这与Fc结构域与IL-2突变蛋白的C-末端连接相反。本文所述的多肽还涵盖所述肽的变体。在一些实施方式中,IL-2变体包含与本文提供的序列至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%基本上相似的氨基酸序列。变体包括本文所述的那些变体,其具有本文和上文所述的各种置换。在一些实施方式中,变体具有1、2、3、4或5个额外的置换。在一些实施方式中,所述置换是G至A、L至I、G至S、K至R,或其他类型的保守性置换。在一些实施方式中,保守性置换基于下表选择:

[0073]	碱性(带正电的 R 基团):	精氨酸 赖氨酸 组氨酸
	酸性(带负电的 R 基团):	谷氨酸 天冬氨酸
	极性(不带电的 R 基团):	谷氨酰胺 天冬酰胺 丝氨酸 苏氨酸 半胱氨酸 脯氨酸
	非极性(脂肪族 R 基团):	甘氨酸 丙氨酸 缬氨酸 甲硫氨酸 亮氨酸 异亮氨酸
	非极性(芳香族 R 基团):	苯丙氨酸 色氨酸 酪氨酸

原始残基	置换
Ala	Gly; Ser; Thr
Arg	Lys; Gln
Asn	Gln; His; Ser
Asp	Glu; Asn
Cys	Ser, Sec
Gln	Asn; Ser; Asp; Glu
Glu	Asp; Gln; Lys
Gly	Ala; Pro; Asn
His	Asn; Gln; Tyr; Phe
Ile	Leu; Val; Met; Phe
Leu	Ile; Val; Met; Phe
Lys	Arg; Gln;
Met	Leu; Tyr; Ile; 正亮氨酸;

	Val; Phe
Pro	β 高脯氨酸; Ser; Thr; Ala; Gly; α 高脯氨酸
Phe	Met; Leu; Tyr; Trp
Ser	Thr; Gly; Asn; Asp
Thr	Ser; Asn
Trp	Tyr; Phe; ,
Tyr	Trp; Phe;
Val	Ile; Leu; Met; Phe

[0076] 两个氨基酸或两个核酸序列的百分比同一性可以通过目视检查和数学计算来确定,或者例如,通过使用计算机程序比较序列信息来进行比较。示例性的计算机程序是 Genetics Computer Group (GCG; Madison, Wis.) Wisconsin package version 10.0 program, GAP (Devereux et al. (1984), Nucleic Acids Res. 12:387-95)。GAP程序的

优选默认参数包括: (1) 核苷酸的一元比较矩阵(对于同一性含有值1, 并且对于非同一性含有值0) 的GCG实施, 以及Gribskov和Burgess的加权氨基酸比较矩阵((1986) Nucleic Acids Res. 14:6745), 如Atlas of Polypeptide Sequence and Structure, Schwartz and Dayhoff, eds., National Biomedical Research Foundation, pp.353-358 (1979) 所述, 或其他相当的比较矩阵; (2) 对于氨基酸序列, 每个缺口罚分8, 并且每个缺口中的每个符号另外罚分2, 或者对于核苷酸序列, 每个缺口罚分50, 并且每个缺口中的每个符号另外罚分3; (3) 对于末端缺口不罚分; 和(4) 对于长缺口没有最大罚分。也可使用序列比较领域的技术人员所用的其他程序。

[0077] 在一些实施方式中, 本文提供的IL-2突变蛋白包括下述蛋白质, 其通过野生型IL-2经IL-2R激活的某些途径具有改变的信号传导并导致T-reg优先增殖/存活/激活。

[0078] 本文提供的IL-2突变蛋白可以使用本领域已知的任何合适的方法产生, 包括美国专利号6,955,807中描述的用于产生IL-2变体的那些方法, 将其通过引用并入本文。此类方法包括构建编码IL-2变体的DNA序列, 并在适当转化的宿主如宿主细胞中表达这些序列。利用这些方法将产生如本文提供的重组蛋白。蛋白质也可以合成地产生, 或在细胞中合成和重组地产生片段的组合, 并且然后组合片段以制备完整的目的蛋白质。

[0079] 在一些实施方式中, 通过分离或合成编码目的蛋白质的核酸分子来制备核酸分子(例如DNA或RNA)。可替代地, 可以分离IL-2的野生型序列, 并用常规技术, 如位点特异性诱变进行突变。

[0080] 构建编码IL-2变体的DNA序列的另一种方法将是化学合成。这例如包括通过化学手段直接合成编码展示本文所述性质的IL-2变体的蛋白质序列的肽。该方法可在不同位置引入天然和非天然氨基酸。可替代地, 编码所需蛋白质的核酸分子可以使用寡核苷酸合成仪通过化学手段合成。寡核苷酸是基于所需蛋白质的氨基酸序列设计的, 其也可通过使用在将产生重组变体的细胞中有利的密码子来选择。公认的是遗传密码是简并的--氨基酸可以由多于一种密码子编码。因此, 将意识到, 对于编码特定IL-2蛋白的给定DNA序列, 将有许多将编码该IL-2变体的DNA简并序列。因此, 在一些实施方式中, 提供了编码本文所述的蛋白质的核酸分子。核酸分子可以是DNA或RNA。

[0081] 在一些实施方式中, 核酸分子将编码信号序列。信号序列可以基于将在其中表达的细胞来选择。在一些实施方式中, 如果宿主细胞是原核的, 则核酸分子不包含信号序列。在一些实施方式中, 如果宿主细胞是真核细胞, 则可以使用信号序列。在一些实施方式中, 信号序列是IL-2信号序列。

[0082] 如本文所指, 如果核酸分子或其互补物包含编码蛋白质的密码子, 则所述核酸分子“编码”蛋白质。

[0083] “重组的”当应用于多肽或蛋白质时, 是指蛋白质的产生依赖于至少一个步骤, 其中将可以编码或不编码蛋白质的核酸导入细胞, 在所述细胞中它们不是天然存在的。

[0084] 可以使用各种宿主(动物或细胞系统)来产生本文所述的蛋白质。合适的宿主细胞的实例包括但不限于细菌、真菌(包括酵母)、植物、昆虫、哺乳动物或其他合适的动物细胞或细胞系, 以及转基因动物或植物。在一些实施方式中, 这些宿主可以包括组织培养中的公知的真核和原核宿主, 例如大肠杆菌菌株、假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株、芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株、链霉菌属(*Streptomyces*)菌株、真菌、酵母, 昆虫细胞例如草地贪夜蛾

(Sf9), 动物细胞例如中国仓鼠卵巢(CHO)和小鼠细胞例如NS/0, 非洲绿猴细胞例如COS1、COS 7、BSC 1、BSC 40和BNT 10, 以及人细胞, 以及植物细胞。对于动物细胞表达, 可以使用培养物中的CHO细胞和COS 7细胞, 并且特别是CHO细胞系CHO(DHFR-)或HKB系。

[0085] 当然, 应该理解, 不是所有的载体和表达控制序列都能同样好地表达本文所述的DNA序列。也不是所有的宿主都用相同的表达系统同样好地起作用。然而, 本领域技术人员可以在这些载体、表达控制序列和宿主中进行选择, 而无需过度实验。例如, 在选择载体时, 必须考虑宿主, 因为载体必须在其中复制。还应考虑载体拷贝数、控制该拷贝数的能力和由载体编码的任何其他蛋白质(例如抗生素标志物)的表达。例如, 用于本发明的优选载体包括那些允许编码IL-2变体的DNA的拷贝数扩增的载体。这种可扩增载体是本领域公知的。

[0086] 载体和宿主细胞

[0087] 因此, 在一些实施方式中, 提供了编码本文所述的蛋白质的载体, 以及用这样的载体转化的宿主细胞。编码本文所述蛋白质的任何核酸可包含在载体中, 所述载体可以例如包含选择性标志物和复制起点, 以在宿主中增殖。在一些实施方式中, 载体进一步包括合适的转录或翻译调节序列, 例如衍生自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的那些, 其与编码蛋白质的核酸分子可操作地连接。此类调节序列的实例包括转录启动子、操纵基因或增强子、mRNA核糖体结合位点和控制转录和翻译的合适序列。当调节序列与编码靶蛋白的DNA功能上相关时, 核苷酸序列是可操作地连接的。因此, 如果启动子核苷酸序列指导核酸分子的转录, 则启动子核苷酸序列与核酸分子可操作地连接。

[0088] 本文描述了此处可以使用的宿主细胞。

[0089] 药物组合物

[0090] 另一方面, 本发明实施方式提供组合物, 例如, 药学上可接受的组合物, 其包含与药学上可接受的载剂一起配制的本文所述的治疗性化合物(IL-2突变蛋白)。如本文所用, “药学上可接受的载剂”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。载剂可以适于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、直肠、局部、外用、脊柱或表皮施用(例如通过注射或输注)。

[0091] 本发明的组合物可以是多种形式。这些包括例如液体、半固体和固体剂型, 例如液体溶液(例如, 可注射和可输注溶液)、分散体或悬浮液、脂质体和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗应用。典型的组合物是可注射或可输注溶液的形式。在一个实施方式中, 施用模式是肠胃外的(例如, 静脉内、皮下、腹膜内、肌内)。在一个实施方式中, 治疗性分子通过静脉内输注或注射施用。在另一个实施方式中, 治疗性分子通过肌内或皮下注射施用。在另一个实施方式中, 治疗性分子局部施用, 例如通过注射或外用应用至靶位点。

[0092] 如本文所用短语“肠胃外施用”和“肠胃外地施用”是指除了肠内和外用施用之外的施用模式, 通常通过注射, 并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下(subcuticular)、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0093] 治疗组合物通常应该是无菌的, 并且在制造和储存条件下是稳定的。组合物可以配制成为溶液、微乳、分散体、脂质体或其他适于高治疗性分子浓度的有序结构。无菌可注射溶液可以通过将所需量的活性化合物(即治疗性分子)与一种以上枚举的成分或其组合(根据需要)一起引入适当溶剂中, 然后过滤灭菌来制备。通常, 分散体通过将活性化合物引入

到含有基本分散介质和来自以上枚举的那些的所需其他成分的无菌载体中来制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,这从其先前无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何另外的所需成分的粉末。例如,通过使用包衣如卵磷脂,通过在分散体的情况下保持所需的粒径,以及通过使用表面活性剂,可以保持溶液的适当流动性。通过在组合物中包含延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸盐和明胶,可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0094] 如技术人员所理解的,施用途径和/或模式将根据所需结果而变化。在某些实施方式中,活性化合物可以与将保护化合物不被快速释放的载剂一起制备,例如控释制剂,包括植入物、透皮贴剂和微囊化递送系统。可以使用生物可降解的、生物可相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。许多制备此类制剂的方法已获得专利,或者是本领域技术人员公知的。参见,例如, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0095] 在某些实施方式中,治疗性化合物可以口服施用,例如,与惰性稀释剂或可同化的可食用载剂一起口服施用。化合物(和其他成分,如果需要)也可以包封在硬壳或软壳明胶胶囊中,压制成片剂,或直接引入受试者的饮食中。对于口服治疗施用,化合物可以与赋形剂合并,并以可吸收片剂、口含片剂、锭剂、胶囊、酏剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂等形式使用。为了通过除肠胃外施用以外的方式施用本发明的化合物,可能需要用材料包被所述化合物或将所述化合物与所述材料一起共施用,以防止其失活。治疗组合物也可以用本领域已知的医疗装置施用。

[0096] 调整剂量方案以提供最佳的期望应答(例如,治疗性应答)。例如,可以施用单次推注,可以随时间施用若干分开的剂量,或者可以如治疗情况的紧急情况所指示的那样按比例减少或增加剂量。为了易于施用和剂量的均匀性,将肠胃外组合物以剂量单位形式进行配制是特别有利的。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为用于待治疗的受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位含有经计算产生所需治疗效果的预定量的活性化合物以及所需的药物载剂。本发明的剂量单位形式的规格由(a)活性化合物的独特特征和要达到的特定治疗效果,和(b)配混用于治疗个体敏感性的这种活性化合物的领域中固有的限制决定,并直接取决于(a)和(b)。

[0097] 治疗或预防有效量的治疗性化合物的示例性非限制性范围是0.1-30mg/kg,更优选1-25mg/kg。治疗性化合物的剂量和治疗方案可由技术人员确定。在某些实施方式中,治疗性化合物通过注射(例如皮下或静脉内)以约1至40mg/kg,例如1至30mg/kg,例如约5至25mg/kg,约10至20mg/kg,约1至5mg/kg,1至10mg/kg,5至15mg/kg,10至20mg/kg,15至25mg/kg,或约3mg/kg的剂量施用。给药方案可以从例如一周一次变化到每2、3或4周一次,或在一些实施方式中,给药方案可以是每月一次、每2个月一次、每3个月一次或每6个月一次。在一个实施方式中,治疗性化合物以约10至20mg/kg每两周的剂量施用。治疗性化合物可以通过静脉内输注以超过20mg/min,例如20-40mg/min,并且通常大于或等于40mg/min的速率施用,以达到约35至440mg/m²,通常约70至310mg/m²,并且更通常约110至130mg/m²的剂量。在实施方式中,约110至130mg/m²的输注速率实现约3mg/kg的水平。在其他实施方式中,治疗性化合物可以通过静脉内输注以小于10mg/min,例如小于或等于5mg/min的速率施用,以达到约1至100mg/m²,例如约5至50mg/m²、约7至25mg/m²或约10mg/m²的剂量。在一些实施方式

中,治疗性化合物在约30min的时间段内输注。应当注意,剂量值可以随待缓解的病况的类型和严重程度而变化。进一步应理解,对于任何特定的受试者,具体的剂量方案应根据个体需要和施用或监督组合物施用的人员的专业判断随时间进行调整,并且本文所述的剂量范围仅是示例性的,并且不旨在限制要求保护的组合物的范围或实践。

[0098] 本发明的药物组合物可以包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的治疗性分子。“治疗有效量”是指以必要的剂量和时间段,达到所需治疗结果而言有效的量。治疗性分子的治疗有效量可以根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及治疗性化合物在个体中引起所需应答的能力等因素而变化。治疗有效量也是治疗性分子的任何毒性或有害作用被治疗有益作用超过的量。相对于未治疗的受试者,“治疗有效剂量”优选将可测量的参数(例如免疫攻击)抑制至少约20%,更优选至少约40%,甚至更优选至少约60%,并且还更优选至少约80%。化合物抑制可测量参数(例如免疫攻击)的能力可以在动物模型系统中评价,所述动物模型系统预测在移植排斥或自身免疫性病症中的功效。可替代地,组合物的这种性质可以通过用熟练的从业人员已知的试验在体外检查化合物抑制这种抑制的能力来评价。

[0099] “预防有效量”是指以必要的剂量和时间段,达到所需预防结果而言有效的量。通常,由于在疾病之前或在疾病的早期阶段在受试者中使用预防剂量,预防有效量将小于治疗有效量。

[0100] 包含本文所述的治疗性化合物的试剂盒也在本发明的范围内。试剂盒可以包括一个或多个其他要素,包括:使用用法说明;其他试剂,例如标记、治疗剂或用于将治疗性分子螯合或以其他方式偶联至标记或其他治疗剂的试剂,或辐射防护组合物;制备用于施用的治疗性分子的装置或其他材料;药学上可接受的载剂;以及用于向受试者施用的装置或其他材料。

[0101] 联合

[0102] 本文所述的蛋白质还可以与用于治疗患者所患病况的其他试剂联合施用。此类试剂的实例包括蛋白质和非蛋白质药物。当共施用多种治疗剂时,如相关领域中公认的,可以相应地调整剂量。“共施用”和联合治疗不限于同时施用,还包括在涉及向患者施用至少一种其他治疗剂的治疗过程期间施用T-reg-选择性IL-2蛋白至少一次的治疗方案。

[0103] 在一些实施方式中,T-reg-选择性IL-2蛋白与PI3-K/AKT/mTOR途径的抑制剂,例如雷帕霉素(雷帕鸣(rapamune),西罗莫司(sirolimus))组合施用。该途径的抑制剂与IL-2组合有利于T-reg富集。在一些实施方式中,施用IL-2蛋白而不施用未直接融合或附着至IL-2蛋白的另一种治疗剂。

[0104] 治疗方法

[0105] 本文提及的任何疾病的“治疗”包括减轻疾病的至少一种症状、降低疾病的严重性,或延迟或预防疾病进展至在一些情况下可以伴随疾病的更严重的症状或进展至至少一种其他疾病。治疗不需要意味着疾病完全治愈。有用的治疗剂仅需要降低疾病的严重性,降低与疾病或其治疗相关的一种或多种症状的严重性,或延迟更严重的症状或更严重的疾病的发作,所述更严重的症状或更严重的疾病可能在治疗的病况后以一定的频率发生。例如,如果疾病是炎性肠病,则治疗剂可以减少肠中不同炎症部位的数目、受影响的肠的总程度、减少疼痛和/或肿胀、减少诸如腹泻、便秘或呕吐等症状和/或防止肠穿孔。患者的病况可以

通过标准技术来评估,例如在钡灌肠或灌肠术后进行的X射线、内窥镜检查、结肠镜检查和/或活组织检查。合适的程序根据患者的病况和症状而变化。

[0106] 在一些实施方式中,所述蛋白质用于治疗炎性病症。在一些实施方式中,炎性病症是炎症、自身免疫性疾病、特应性疾病、副肿瘤性自身免疫性疾病、软骨炎症、关节炎、类风湿性关节炎(例如活动性)、幼年型关节炎、幼年型类风湿性关节炎、少关节幼年型类风湿性关节炎、多关节幼年型类风湿性关节炎、全身发作性幼年型类风湿性关节炎、幼年型强直性脊柱炎、幼年型肠病性关节炎、幼年型反应性关节炎、幼年型赖特综合征、SEA综合征(血清阴性、末端病、关节病综合征)、幼年型皮肌炎、幼年型银屑病性关节炎、幼年型硬皮病、幼年型系统性红斑狼疮、幼年型血管炎、少关节类风湿性关节炎、多关节类风湿性关节炎、全身发作性类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、肠病性关节炎、反应性关节炎、赖特综合征、SEA综合征(血清阴性、末端病、关节病综合征)、皮肌炎、银屑病性关节炎、硬皮病、血管炎、肌炎、多发性肌炎、结节性多动脉炎、韦氏肉芽肿病、动脉炎、风湿性多肌痛、结节病、硬化、原发性胆汁性硬化、硬化性胆管炎、干燥综合征、银屑病、斑块状银屑病、滴状银屑病、皮褶银屑病、脓疱性银屑病、红皮病型银屑病、皮炎、特应性皮炎、疱疹样皮炎、白塞氏病(包括但不限于对皮肤的作用)、脱发、斑秃、全秃、动脉粥样硬化、狼疮、斯蒂尔病(Still's disease)、系统性红斑狼疮(SLE)(例如活动性)、重症肌无力、炎性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、乳糜泻、多发性硬化症(MS)、哮喘、COPD、鼻窦炎、鼻窦炎伴鼻息肉、嗜酸性粒细胞性食管炎、嗜酸性粒细胞性支气管炎、格林-巴利病(Guillain-Barre disease)、I型糖尿病、甲状腺炎(例如,格雷夫斯病(Graves' disease))、艾迪生氏病(Addison's disease)、雷诺氏现象(Raynaud's phenomenon)、自身免疫性肝炎、移植植物抗宿主病、类固醇难治性慢性移植植物抗宿主病、移植排斥(例如肾、肺、心脏、皮肤等)、肾损伤、丙型肝炎诱导性血管炎、妊娠自发性丢失(spontaneous loss of pregnancy)、脱发、白癜风、局灶性节段性肾小球硬化症(FSGS)、微小病变型疾病(Minimal Change Disease)、膜性肾病、ANCA相关的肾小球肾病、膜增生性肾小球肾炎、IgA肾病和狼疮肾炎等。在一些实施方式中,所述蛋白质用于治疗类固醇难治性慢性移植植物抗宿主病。在一些实施方式中,所述蛋白质用于治疗活动性系统性红斑狼疮。在一些实施方式中,所述蛋白质用于治疗活动性类风湿性关节炎。

[0107] 在一些实施方式中,所述方法包括向受试者施用包含本文所述的蛋白质的药物组合物。在一些实施方式中,所述受试者是有需要的受试者。任何上述治疗性蛋白质可以以本文所述的组合物(例如药物组合物)的形式施用。例如,组合物可以包含如本文所述的IL-2蛋白加上缓冲液,抗氧化剂如抗坏血酸,低分子量多肽(如具有少于10个氨基酸的那些)、蛋白质,氨基酸,碳水化合物如葡萄糖、蔗糖或糊精,螯合剂如EDTA、谷胱甘肽,和/或其他稳定剂、赋形剂、和/或防腐剂。组合物可以配制成液体或冻干物。可用于药物制剂的组分的另外实例在Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.sup.th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1980) 和如本文所述的其他地方提出。

[0108] 为了治疗目的疾病,包含本文所述的治疗性分子的组合物可以通过任何合适的方法施用,包括但不限于肠胃外、外用、口服、鼻、阴道、直肠或肺(通过吸入)施用。如果注射,一种或多种组合物可通过推注注射或连续输注关节内、静脉内、动脉内、肌内、腹膜内或皮下施用。将局部施用,即在疾病部位施用,设想为经皮递送和从植入物、皮肤贴剂或栓剂持续释放。通过吸入递送包括例如鼻或口吸入、使用喷雾器、以气雾剂形式吸入等。通过插入

体腔的栓剂施用可以通过例如将固体形式的组合物插入选择的体腔并使其溶解来完成。其他替代物包括滴眼剂,口服制剂如丸剂、锭剂、糖浆剂和口香糖,以及外用制剂如洗剂、凝胶剂、喷雾剂和软膏剂。在大多数情况下,作为多肽的治疗性分子可以外用施用或通过注射或吸入施用。

[0109] 在实施治疗方法时,可如本文和上文所述施用上述治疗性分子。例如,组合物可以以任何可有效治疗所治疗病况的剂量、频率和持续时间施用。剂量取决于治疗性分子的分子性质和所治疗的病症的性质。只要需要,可以继续治疗以实现所需的结果。本发明的治疗性分子可以作为单一剂量或作为周期性给予的一系列剂量施用,包括每天多次、每天、每隔一天、每周两次、每周三次、每周、每隔一周和每月给药,以及其他可能的给药方案。治疗的周期性在整个治疗期间可以是恒定的或不恒定的。例如,治疗可以最初以每周的间隔进行,并且随后每隔一周进行。本发明包括持续数天、数周、数月或数年的治疗。治疗可以中断,并且然后重新开始。维持剂量可以在初始治疗后施用或不施用。

[0110] 剂量可以测量为毫克/千克体重 (mg/kg) 或毫克/平方米皮肤表面 (mg/m²) 或作为固定剂量,与身高或体重无关。所有这些都是本领域的标准剂量单位。使用标准公式从人的身高和体重计算人的皮肤表面积。

[0111] 本文还提供了促进或刺激T调节细胞中STAT5磷酸化的方法。在一些实施方式中,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所述的肽或包含其的药物组合物。

[0112] 如本文所用,短语“有需要”是指受试者(动物或哺乳动物)已被鉴定为需要特定方法或治疗。在一些实施方式中,鉴定可以通过任何诊断手段进行。在本文所述的任何方法和治疗中,动物或哺乳动物可以是有需要的。在一些实施方式中,动物或哺乳动物处于特定疾病、病症或病况流行的环境中或将旅行至特定疾病、病症或病况流行的环境。

[0113] 除非另外定义,否则所有科技术语具有与所公开的实施方式所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0114] 如本文所用,术语“一个”或“一种”是指“至少一个/种”或“一个/种或多个/种”,除非上下文另外明确指出。

[0115] 如本文所用,术语“约”是指数值是近似的,并且小的变化不会显著影响所公开的实施方式的实施。在使用数值限制的情况下,除非上下文另外指出,“约”是指数值可变化±10%并且保持在所公开的实施方式的范围内。

[0116] 如本文所用,术语“个体”或“受试者”或“患者”可互换使用,是指任何动物,包括哺乳动物,例如小鼠、大鼠、其他啮齿类动物、兔、狗、猫、猪、牛、羊、马或灵长类动物,例如人。

[0117] 如本文所用,术语“包含”(以及包含的任何形式,例如“包括”、“含有”和“被包含”)、“具有”(以及具有的任何形式,例如“拥有”和“具备”)、“包括”(以及包括的任何形式,例如“囊括”和“包含”)或“含有”(以及含有的任何形式,例如“包括”和“包含”)是包括性的或开放式的,并且不排除另外的未列举的要素或方法步骤。使用过渡性短语“包含”或“含有”的任何步骤或组合物也可被认为是描述与“由……组成”或“组成”相同。

[0118] 如本文所用,术语“接触”是指将体外系统或体内系统中的两种要素放在一起。例如,将本文所述的肽或组合物与T-reg细胞或与个体或患者或细胞“接触”包括将化合物施用至个体或患者,例如人,以及例如将化合物引入含有细胞的样品或含有T-reg细胞的纯化制剂中。

[0119] 如本文所用,当用于指具有不同结构域或异源序列的蛋白质时,术语“融合的”或“连接的”

[0120] 是指蛋白质结构域是通过肽键或其他共价键彼此连接的同一肽链的一部分。结构域或部分可以直接彼此连接或融合,或者另一个结构域或肽序列可以在两个结构域或序列之间,并且这样的序列仍将被认为彼此融合或连接。在一些实施方式中,本文提供的各种结构域或蛋白质彼此直接连接或融合,或者接头序列,例如本文所述的甘氨酸/丝氨酸序列将两个结构域连接在一起。

[0121] 在一些实施方式中,本文提供的实施方式还包括但不限于:

[0122] 1.一种包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的肽,其中所述肽包含在73、76、100或138位处的突变。

[0123] 2.根据实施方式1所述的肽,其中所述突变是在73、76、100或138位处的L至I突变。

[0124] 3.根据实施方式1所述的肽,其中所述肽进一步包含在49、51、55、57、68、89、91、94、108和145位中的一个或多个位置处的突变。

[0125] 4.根据实施方式1所述的肽,其进一步包含在E35、H36、Q42、D104、E115或Q146位中的一个或多个或位置处的突变,并且E35、H36、Q42、D104、E115或Q146中的1、2、3、4、5个或每一个是野生型的。

[0126] 5.根据实施方式4所述的肽,其中所述突变是E35Q、H36N、Q42E、D104N、E115Q或Q146E中的一个或多个。

[0127] 6.根据实施方式1-5中任一项所述的肽,其中所述肽包含N49S突变。

[0128] 7.根据实施方式1-6中任一项所述的肽,其中所述肽包含Y51S或Y51H突变。

[0129] 8.根据实施方式1-7中任一项所述的肽,其中所述肽包含K55R突变。

[0130] 9.根据实施方式1-8中任一项所述的肽,其中所述肽包含T57A突变。

[0131] 10.根据实施方式1-9中任一项所述的肽,其中所述肽包含K68E突变。

[0132] 11.根据实施方式1-10中任一项所述的肽,其中所述肽包含V89A突变。

[0133] 12.根据实施方式1-11中任一项所述的肽,其中所述肽包含N91R突变。

[0134] 13.根据实施方式1-12中任一项所述的肽,其中所述肽包含Q94P突变。

[0135] 14.根据实施方式1-13中任一项所述的肽,其中所述肽包含N108D或N108R突变。

[0136] 15.根据实施方式1-14中任一项所述的肽,其中所述肽包含C145A或C145S突变。

[0137] 15.1.根据实施方式1-15中任一项所述的肽,其中所述肽包含V89A、Q94P、N108R或N108D,以及L73I、L76I、L100I、L118I突变中的一个或多个,和任选的C145A或C145S突变。

[0138] 16.一种包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的肽,其中所述肽包含在53、56、80或118位处的突变。

[0139] 17.根据实施方式16所述的肽,其中所述突变是在53、56、80或118位处的L至I突变。

[0140] 18.根据实施方式16或17所述的肽,其中所述肽进一步包含在29、31、35、37、48、69、71、74、88和125位中的一个或多个位置处的突变。

[0141] 19.根据实施方式16所述的肽,其进一步包含在E15、H16、Q22、D84、E95或Q126位中的一个或多个位置处的突变,或者E15、H16、Q22、D84、E95或Q126位中的1、2、3、4、5个或每一个为野生型的。

- [0142] 20. 根据实施方式19所述的肽,其中所述突变是E15Q、H16N、Q22E、D84N、E95Q或Q126E中的一个或多个。
- [0143] 21. 根据实施方式16-20中任一项所述的肽,其中所述肽包含N29S突变。
- [0144] 22. 根据实施方式16-21中任一项所述的肽,其中所述肽包含Y31S或Y51H突变。
- [0145] 23. 根据实施方式16-22中任一项所述的肽,其中所述肽包含K35R突变。
- [0146] 24. 根据实施方式16-23中任一项所述的肽,其中所述肽包含T37A突变。
- [0147] 25. 根据实施方式16-24中任一项所述的肽,其中所述肽包含K48E突变。
- [0148] 26. 根据实施方式16-25中任一项所述的肽,其中所述肽包含V69A突变。
- [0149] 27. 根据实施方式16-26中任一项所述的肽,其中所述肽包含N71R突变。
- [0150] 28. 根据实施方式16-27中任一项所述的肽,其中所述肽包含Q74P突变。
- [0151] 29. 根据实施方式16-28中任一项所述的肽,其中所述肽包含N88D或N88R突变。
- [0152] 30. 根据实施方式16-29中任一项所述的肽,其中所述肽包含C125A或C125S突变。
- [0153] 31. 根据实施方式16-30中任一项所述的肽,其中所述肽包含V69A、Q74P、N88R或N88D,以及L53I、L56I、L80I、L118I突变中的一个或多个,和任选的C125A或C125S突变。
- [0154] 32. 根据前述实施方式中任一项所述的肽,其中所述肽不包含对应于30、31和/或35位的突变。
- [0155] 33. 根据前述实施方式中任一项所述的肽,其进一步包含Fc肽。
- [0156] 33A. 根据实施方式33所述的肽,其中所述Fc肽包含在L247、L248和G250位(使用Kabat编号)处或在L234、L235和G237位(使用EU编号)处的突变。
- [0157] 33B. 根据实施方式33所述的肽,其中所述Fc肽包含以下突变:L247A、L248A和G250A(Kabat编号)或L234A、L235A和G237A(EU编号)。
- [0158] 34. 根据实施方式33所述的肽,其中所述Fc肽包含序列SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:15。
- [0159] 35. 根据前述实施方式中任一项所述的肽,其进一步包含连接SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的肽与所述Fc肽的接头肽。
- [0160] 36. 根据实施方式35所述的肽,其中所述接头包含序列GGGGSGGGGSGGGS或GGGSGGGSGGGS。
- [0161] 37. 根据前述实施方式中任一项所述的肽,其中所述肽包含序列SEQ ID NO:17-43。
- [0162] 38. 一种肽,其包含氨基酸序列SEQ. ID. NO:27。
- [0163] 39. 根据实施方式38所述的肽,其进一步包含具有序列SEQ. ID. NO:7的N-末端前导肽。
- [0164] 40. 根据实施方式1所述的肽,其在C末端进一步包含接头肽。
- [0165] 41. 根据实施方式40所述的肽,其中所述接头肽包含序列(GGGGS)_n,其中n是1、2、3或4。
- [0166] 42. 根据实施方式41中所述的肽,其中n是1。
- [0167] 43. 根据实施方式41中所述的肽,其中n是2。
- [0168] 44. 根据实施方式41中所述的肽,其中n是3。
- [0169] 45. 根据实施方式41中所述的肽,其中n是4。

- [0170] 46. 根据实施方式48-45中任一项所述的肽,其进一步包含Fc肽。
- [0171] 47. 根据实施方式46所述的肽,其中所述Fc肽包含序列SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:15。
- [0172] 48. 根据实施方式47所述的肽,其在N-末端进一步包含具有序列SEQ. ID.No:7的前导肽。
- [0173] 49. 根据实施方式46所述的肽,其中所述Fc肽在包含SEQ ID NO:27的肽的C-末端。
- [0174] 50. 根据实施方式46所述的肽,其中所述Fc肽在包含SEQ ID NO:27的肽的N-末端。
- [0175] 51. 根据实施方式1所述的肽,其进一步包含连接SEQ ID NO:27的肽和Fc肽的接头肽。
- [0176] 52. 根据实施方式51所述的肽,其中所述接头肽为 $(GGGGS)_n$,其中n是1、2、3或4。
- [0177] 53. 根据实施方式52中所述的肽,其中n为4。
- [0178] 54. 根据实施方式51-53所述的肽,其中所述Fc肽包含序列SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:15。
- [0179] 55. 根据实施方式51-54所述的肽,其中所述Fc肽在包含SEQ ID NO:27的肽的C-末端。
- [0180] 56. 根据实施方式51-54所述的肽,其中所述Fc肽在包含SEQ ID NO:27的肽的N-末端。
- [0181] 57. 根据实施方式14所述的肽,其中所述肽包含具有序列SEQ ID NO:37、38、39或40的肽。
- [0182] 58. 一种药物组合物,其包含根据前述实施方式中任一项所述的肽。
- [0183] 59. 一种激活T调节细胞的方法,所述方法包括使T调节细胞与根据实施方式1-57中任一项所述的肽或根据实施方式58所述的药物组合物接触。
- [0184] 60. 一种治疗受试者中的炎性病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据实施方式1-57中任一项所述的肽或根据实施方式58所述的药物组合物。
- [0185] 61. 根据实施方式60所述的方法,其中所述炎性病症是炎症、自身免疫性疾病、特应性疾病、副肿瘤性自身免疫性疾病、软骨炎症、关节炎、类风湿性关节炎、幼年型关节炎、幼年型类风湿性关节炎、少关节幼年型类风湿性关节炎、多关节幼年型类风湿性关节炎、全身发作性幼年型类风湿性关节炎、幼年型强直性脊柱炎、幼年型肠病性关节炎、幼年型反应性关节炎、幼年型赖特综合征、SEA综合征(血清阴性、末端病、关节病综合征)、幼年型皮肌炎、幼年型银屑病性关节炎、幼年型硬皮病、幼年型系统性红斑狼疮、幼年型血管炎、少关节类风湿性关节炎、多关节类风湿性关节炎、全身发作性类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、肠病性关节炎、反应性关节炎、赖特综合征、SEA综合征(血清阴性、末端病、关节病综合征)、皮肌炎、银屑病性关节炎、硬皮病、血管炎、肌炎、多发性肌炎、结节性多动脉炎、韦氏肉芽肿病、动脉炎、风湿性多肌痛、结节病、硬化、原发性胆汁性硬化、硬化性胆管炎、干燥综合征、银屑病、斑块状银屑病、滴状银屑病、皮褶银屑病、脓疱性银屑病、红皮病型银屑病、皮炎、特应性皮炎、动脉粥样硬化、狼疮、斯蒂尔病、系统性红斑狼疮(SLE)、重症肌无力、炎性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、乳糜泻、多发性硬化症(MS)、哮喘、COPD、鼻窦炎、鼻窦炎伴鼻息肉、嗜酸性粒细胞性食管炎、嗜酸性粒细胞性支气管炎、格林-巴利病、I型糖尿病、甲状腺炎(例如,格雷夫斯病)、艾迪生氏病、雷诺氏现象、自身免疫性肝炎、移植物抗宿主病

(GVHD)、类固醇难治性慢性移植物抗宿主病、移植排斥(例如肾、肺、心脏、皮肤等)、肾损伤、丙型肝炎诱导性血管炎、妊娠自发性丢失、脱发、白癜风、局灶性节段性肾小球硬化症(FSGS)、微小病变型疾病、膜性肾病、ANCA相关的肾小球肾病、膜增生性肾小球肾炎、IgA肾病和狼疮肾炎等。

[0186] 62. 一种促进或刺激T调节细胞中STAT5磷酸化的方法,所述方法向有需要的受试者施用治疗有效量的根据实施方式1-57中任一项所述的肽或根据实施方式58所述的药物组合物。

[0187] 63. 根据实施方式1-57中任一项所述的肽或根据实施方式58所述的药物组合物在制备用于治疗炎性病症的药物中的用途。

[0188] 64. 根据实施方式63所述的用途,其中所述炎性病症是炎症、自身免疫性疾病、特应性疾病、副肿瘤性自身免疫性疾病、软骨炎症、关节炎、类风湿性关节炎、幼年型关节炎、幼年型类风湿性关节炎、少关节幼年型类风湿性关节炎、多关节幼年型类风湿性关节炎、全身发作性幼年型类风湿性关节炎、幼年型强直性脊柱炎、幼年型肠病性关节炎、幼年型反应性关节炎、幼年型赖特综合征、SEA综合征(血清阴性、末端病、关节病综合征)、幼年型皮肌炎、幼年型银屑病性关节炎、幼年型硬皮病、幼年型系统性红斑狼疮、幼年型血管炎、少关节类风湿性关节炎、多关节类风湿性关节炎、全身发作性类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、肠病性关节炎、反应性关节炎、赖特综合征、SEA综合征(血清阴性、末端病、关节病综合征)、皮肌炎、银屑病性关节炎、硬皮病、血管炎、肌炎、多发性肌炎、结节性多动脉炎、韦氏肉芽肿病、动脉炎、风湿性多肌痛、结节病、硬化、原发性胆汁性硬化、硬化性胆管炎、干燥综合征、银屑病、斑块状银屑病、滴状银屑病、皮褶银屑病、脓疱性银屑病、红皮病型银屑病、皮炎、特应性皮炎、动脉粥样硬化、狼疮、斯蒂尔病、系统性红斑狼疮(SLE)、重症肌无力、炎性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、乳糜泻、多发性硬化症(MS)、哮喘、COPD、鼻窦炎、鼻窦炎伴鼻息肉、嗜酸性粒细胞性食管炎、嗜酸性粒细胞性支气管炎、格林-巴利病、I型糖尿病、甲状腺炎(例如,格雷夫斯病)、艾迪生氏病、雷诺氏现象、自身免疫性肝炎、移植物抗宿主病(GVHD)、类固醇难治性慢性移植物抗宿主病、移植排斥(例如肾、肺、心脏、皮肤等)、肾损伤、丙型肝炎诱导性血管炎、妊娠自发性丢失、脱发、白癜风、局灶性节段性肾小球硬化症(FSGS)、微小病变型疾病、膜性肾病、ANCA相关的肾小球肾病、膜增生性肾小球肾炎、IgA肾病和狼疮肾炎等。

[0189] 65. 一种核酸分子,其编码根据实施方式1-57中任一项所述的肽。

[0190] 66. 一种载体,其包含根据实施方式65所述的核酸分子。

[0191] 67. 一种质粒,其包含根据实施方式65所述的核酸分子。

[0192] 68. 一种细胞,其包含根据实施方式65所述的核酸分子。

[0193] 69. 一种细胞,其包含根据实施方式67所述的质粒。

[0194] 70. 一种细胞,其包含根据实施方式66所述的载体。

[0195] 71. 一种细胞,其包含或表达根据实施方式1-57中任一项所述的肽或如本文所述的肽。

[0196] 以下实施例是说明本文所述的化合物、组合物和方法的,而并非限制其。本领域技术人员已知的其他合适的修改和适应在以下实施方式的范围内。

[0197] 实施例

[0198] 实施例1:

[0199] 向罹患IBD的受试者施用治疗组合物,其包含SEQ ID NO:11、12、13或14的蛋白质。受试者的免疫系统下调,并且IBD的症状减轻。

[0200] 实施例2:

[0201] 向罹患IBD的受试者施用治疗组合物,其包含具有或不具有前导序列的SEQ ID NO:3、4、5或6的蛋白质。受试者的免疫系统下调,并且IBD的症状减轻。

[0202] 实施例3:IL-突变蛋白的产生

[0203] 将含有编码与人IgG1 Fc结构域N末端(SEQ ID NO:40)或C末端(SEQ ID NO:41)融合的人IL-2M多肽的单一基因的pTT5载体转染入HEK293 Expi细胞。5-7天后,收获表达IL-2M的细胞培养上清液,并且通过离心而澄清,并通过0.22μm过滤装置过滤。IL-2M捕获在proA树脂上。用pH7.4的PBS洗涤树脂,并且使用pH3.5的0.25%乙酸洗脱所捕获的蛋白质,用十分之一体积的pH8.0的1M Tris中和。将蛋白质用缓冲液更换到pH7的30mM HEPES150mM NaCl,并在Superdex 200 3.2/300柱上通过尺寸排阻色谱法进行分析。通过在Bis-Tris4-12%凝胶上进行还原和非还原SDS-PAGE来分析5μg纯化的材料。IL-2M以超过10mg/L表达,并且如通过尺寸排阻色谱法和还原/非还原SDS-PAGE所示,在纯化后超过95%单分散。

[0204] 实施例4:IL-2M分子可以结合CD25

[0205] 用在pH7.4的PBS中的0.5μg/mL浓度的CD25涂覆免疫吸附板,75μl/孔,并在4℃温育过夜。孔用含有0.05% Tween-20的pH7.4的PBS(洗涤缓冲液)洗涤三次,并且然后用200μl/孔的含1% BSA的pH7.4的PBS(封闭缓冲液)在室温下封闭两小时。用洗涤缓冲液洗涤三次后,将IL-2M分子在含有1% BSA和0.05% Tween-20的PBS(测定缓冲液)中稀释至11-2倍继续稀释,其中2nM为最高浓度。在室温下将稀释的材料以75μl/孔加入到CD25涂覆的板中1小时。用洗涤缓冲液洗涤三次后,将在测定缓冲液中稀释至0.05μg/mL的羊生物素化抗IL-2多克隆抗体在室温下以75μl/孔加入到板中1小时。用洗涤缓冲液洗涤三次后,将在测定缓冲液中以1:5000稀释的链霉亲和素HRP在室温下以75μl/孔加入到板中15分钟。用洗涤缓冲液洗涤三次和用洗涤缓冲液(不含tween-20)洗涤1次后,测定用TMB显影,并用1N HCl终止。测量OD 450nm。实验包括在不存在CD25时IL-2M分子与板/块非特异性结合的合适对照和不能结合CD25的阴性对照分子。

[0206] 结果表明,在2nM-1.9pM的浓度下,IL-2M分子能够以亚纳摩尔EC50结合CD25。另外,当在板表面上不存在CD25时,在任何测试浓度下都没有检测到任何化合物,表明没有测试化合物与板表面非特异性相互作用(数据未显示)。

[0207] 实施例5:体外P-STAT5测定以确定IL-2M分子的效力和选择性。使用FICOLL-PAQUE Premium和Sepmate管从新分离的肝素化人全血制备外周血单个核细胞(PBMC)。在野生型IL-2或实施例12的IL-2M存在下,将PBMC在10%胎牛血清RPMI培养基中培养20分钟,并且然后用BD Cytofix固定10分钟。

[0208] 固定的细胞依次用BD perm III和然后BioLegend FOXP3透化缓冲液透化。在用人血清封闭10分钟后,用针对磷酸-STAT5 FITC、CD25 PE、FOXP3 AF647和CD4 PerCP Cy5.5的抗体将细胞染色30分钟,并且然后用读板器在Attune NXT上获得。SEQ ID NO:23的IL-2M有效且选择性地诱导Treg而非Teff中的STAT5磷酸化。

[0209] 实施例6:IL-2突变蛋白的免疫原性

[0210] 使用NetMHCIIIPan 3.2软件分析IL-2突变蛋白突变体序列,其可以在www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/上找到。使用人工神经网络来确定肽对MHC II类等位基因的亲和力。在该分析中,具有与MHC II类分子潜在直接相互作用的9个残基的肽被认为是结合核心。邻近结合核心的残基(其具有间接影响结合的潜力),也作为掩蔽残基进行了检验。当包含结合核心和掩蔽残基的肽对MHC II类分子的预测 K_D 低于50nM时,其被标记为强结合物。强结合物具有引入T细胞免疫原性的更大机会。

[0211] 将在北美和欧洲高度表现的总共9个MHCII等位基因包括在计算机分析中。测试的IL-2M(IL-2突变蛋白)分子组包括具有L53I、L56I、L80I或L118I突变的IL-2突变蛋白。只有MHCII等位基因DRB1_1101、DRB1_1501、DRB1_0701和DRB1_0101用任何评估的分子产生命中。DRB_1501的肽命中在包括具有C125S突变的野生型IL-2的所有测试构建体之间是相同的。添加L80I除去了DRB1-0101[ALNLAPSKNFHLRPR]的1个T细胞表位,并适度降低了两个其他T细胞表位[EEALNLAPSKNFHLR和EALNLAPSKNFHLRP]的亲和力。对于MHCII等位基因DRB1-0701,L80I除去1T细胞表位[EEALNLAPSKNFHLR]。因此,数据表明包含L80I突变的IL-2突变蛋白应该具有较低的免疫原性,根据计算机分析,这是令人惊讶的和预料不到的结果。

[0212] 实施例7:产生另外的IL-2突变蛋白

[0213] 将含有单一基因的pTT5载体转染到HEK293 Expi细胞中,所述单一基因编码一个IL-2M(IL-2突变蛋白)SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40(和IL-2M对照;SEQ ID NO:34)多肽以及与人IgG1 Fc结构域N-末端融合的人IL-2M或IL-2M。5-7天后,收获表达SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40(和IL-2M对照;SEQ ID NO:34)的细胞培养上清液,并通过离心和经由0.22μM过滤装置过滤使其澄清。将SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40(和IL-2M对照;SEQ ID NO:34)捕获在proA树脂上。用pH7.4的PBS洗涤树脂,并使用pH3.5的0.25%乙酸洗脱捕获的蛋白质,其中用十分之一体积的pH8.0的1M Tris中和。将蛋白质用缓冲液更换到pH7的30mM HEPES150 mM NaCl,并在Superdex 200 3.2/300柱上通过尺寸排阻色谱法进行分析。通过在Bis-Tris4-12%凝胶上进行还原和非还原SDS-PAGE分析5μg纯化的材料。

[0214] IL-2M SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40(和IL-2M对照;SEQ ID NO:34)以超过45mg/L表达,并且如通过尺寸排阻色谱法和还原/非还原SDS-PAGE所示,在纯化后超过95%单分散。

[0215] 实施例8:IL-2M可以结合CD25

[0216] 用在pH7.4的PBS中的0.5μg/mL浓度的CD25涂覆免疫吸附板,75μl/孔,并在4℃温育过夜。孔用含有0.05% Tween-20的pH7.4的PBS(洗涤缓冲液)洗涤三次,并且然后用200μl/孔的含1% BSA的pH7.4的PBS(封闭缓冲液)在室温下封闭两小时。用洗涤缓冲液洗涤三次后,将IL-2M SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40在含有1% BSA和0.05% Tween-20的PBS(测定缓冲液)中稀释至11-2倍连续稀释,其中2nM为最高浓度。在室温下将稀释的材料以75μl/孔加入到CD25涂覆的板中1小时。用洗涤缓冲液洗涤三次后,将在测定缓冲液中稀释至0.05μg/mL的羊生物素化抗IL-2多克隆抗体在室温下以75μl/孔加入到板中1小时。用洗涤缓冲液洗涤三次后,在室温下以75μl/孔将在测定缓冲液中以1:5000稀释的高灵敏度链霉亲和素HRP加入板中15分钟。用洗涤缓冲液洗涤三次和用洗涤缓冲液(不含tween-20)洗涤1次后,用TMB显影测定,并用1N HCl终止。测量OD450 nm。实验包

括在不存在CD25时分子与板/块非特异性结合的适当对照。结果表明,在2nM-1.9pM的浓度下,实施例7的突变蛋白能够以亚纳摩尔EC50结合CD25。另外,当在板表面上不存在CD25时,在任何测试浓度下都没有检测到任何化合物,表明没有测试化合物与板表面非特异性相互作用。因此,实施例7的突变蛋白可以结合CD25。

[0217] 实施例9:实施例7的IL-2突变蛋白是有效的和选择性的

[0218] 使用FICOLL-PAQUE Premium和Sepmate管从新分离的肝素化人全血制备外周血单个核细胞(PBMC)。在野生型IL-2或实施例7的突变蛋白存在下,将PBMC在10%胎牛血清RPMI培养基中培养20分钟,并且然后用BD Cytofix固定10分钟。固定的细胞依次用BD perm III和然后BioLegend FOXP3透化缓冲液透化。在用人血清封闭10分钟后,用针对磷酸-STAT5 FITC(CST)、CD25 PE、FOXP3 AF647和CD4 PerCP Cy5.5(都是BD)的抗体将细胞染色30分钟,并且然后用读板器在Attune NXT上获得。发现实施例7的IL-2突变蛋白是有效力的,并且相对于Teff,对Treg具有选择性。发现包含L118I突变的突变蛋白与其他突变蛋白相比具有增加的活性和选择性。

[0219] 实施例10:IL-2突变蛋白在人源化小鼠中扩增Treg

[0220] 用人CD34+造血干细胞人源化的NSG小鼠购自Jackson Labs。在第0天和第7天,向小鼠皮下给药1 μ g IL-2突变蛋白SEQ ID NO:34或其他IL-2突变蛋白SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:40。在第7天,将小鼠安乐死,并收集全血和脾。将全血等分到96孔深孔板中,并使用BD Fix Lyse固定10分钟。使用70 μ m过滤器(BD)分离脾细胞,并且使用来自BioLegend的RBC裂解缓冲液裂解红细胞。用2%胎牛血清PBS洗涤后,用近红外活-死染色(Invitrogen)标记脾细胞20分钟,并且然后使用Biolegend固定缓冲液固定20分钟。然后全血细胞和脾细胞使用BioLegend FOXP3透化缓冲液透化,用人血清封闭,并用抗人CD8a FITC(BL)、人CD25 PE(BD)、人FOXP3 AF647(BD)CD4 PerCP Cy5.5(BD)、人Siglec-8 PE Cy7(BL)、人CD3BV421(BL)、人CD45 BV605(BL)、人CD56 BV785(BL)和小鼠CD45(BV711)的抗体染色30分钟,并用装载板(plate loader)在Attune NXT上获得。

[0221] 与载体对照相比,IL-2M SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40在人源化小鼠的小鼠脾和全血中选择性地诱导人Treg。人CD56pos NK细胞、CD3pos T细胞、CD8pos细胞毒性T淋巴细胞、CD4pos辅助T细胞或CD25lo/FOXP3neg T效应物的频率没有显著变化。这些结果证明IL-2突变蛋白增加调节性T细胞的频率。

[0222] 实施例11:由IL-2突变蛋白诱导的信号传导的持久性

[0223] 使用FICOLL-PAQUE Premium和Sepmate管从新分离的肝素化人全血制备外周血单个核细胞(PBMC)。在IL-2M的存在下,将PBMC在10%胎牛血清RPMI培养基中培养60分钟。然后将细胞洗涤3次并再温育3小时。然后用BD Cytofix固定细胞10分钟。固定的细胞依次用BD perm III以及然后BioLegend FOXP3透化缓冲液透化。在用人血清封闭10分钟后,用针对磷酸-STAT5 FITC、CD25 PE、FOXP3 AF647和CD4 PerCP Cy5.5的抗体将细胞染色30分钟,并且然后用读板器在Attune NXT上获得。与对照相比,实施例19的所有四种IL-2突变蛋白均在Treg而不是在Teff中诱导持久信号传导。SEQ ID NO:40优于SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:37。这些结果证明IL-2可在Treg中诱导持久的和选择性的信号传导,这将导致体内更大的Treg扩增,并允许更低频率的给药以实现Treg扩增。

[0224] 本文提供的实施例证明了令人惊讶且出乎意料的结果,即相对于Teff,IL-2突变

蛋白可以起作用以选择性且有效激活Treg,这证明了所述分子可以用于治疗或改善本文所述的病况。如本文提供的IL-2突变蛋白也可以与或不与如本文提供的Fc结构域或接头融合而产生和使用。

[0225] 已经参考具体实施例描述了实施方式。这些实施例并不意味着以任何方式限制实施方式。应当理解,为了本公开的目的,可以进行完全在本公开的范围内的各种改变和修改。可以进行许多其他的变化,这些变化对于本领域技术人员来说是容易想到的,并且包含在本文公开的本发明的精神中,并且如所附权利要求所限定的。

[0226] 实施例12:突变蛋白展示总体POI和较低的聚集。

[0227] 通过将载体转染到HEK293 Expi细胞,在pTT5载体中表达IL-2突变蛋白,所述IL-2突变蛋白具有V69A、Q74P、N88D和C125S的突变和下列突变之一:L3I、L56I、L80I或L118I,其与如本文提供的包含L234A、L235A和G237A突变的Fc区连接。将IL-2突变蛋白用4个GGGGS重复连接到Fc区的N-末端。5-7天后,收获表达不同IL-2突变蛋白的细胞培养上清液,并且通过离心和经由0.22μm过滤装置的过滤而澄清。IL-2突变蛋白被捕获在proA树脂上。用pH7.4的PBS洗涤树脂,并且用pH3.5的0.25%乙酸洗脱捕获的蛋白质,并用十分之一体积的pH8.0的1MTris中和。将蛋白质用缓冲液更换到pH7的30mM HEPES150 mM NaCl中,并通过AdvanceBio SEC柱上的尺寸排阻色谱法分析目的峰百分比(POI)。结果证明,不同突变蛋白以超过60mg/L表达。然而,令人惊讶地发现,具有L80I或L118I突变的突变蛋白大于90%单分散,而具有L53I或L56I突变的突变蛋白未如尺寸排阻色谱法所示。因此,具有L80I或L118I置换的突变蛋白具有较低的聚集。由于产生的突变类型,四种分子(包含L80I、L118I、L53I和L56I的IL-2突变蛋白)之间聚集的差异是令人惊奇的。因此,具有L80I或L118I突变的突变蛋白相对于其他突变蛋白所具有的惊人优点在于因为其聚集不如其他突变蛋白多。

[0228] 实施例13:IL-2突变蛋白具有出乎意料的效力增加

[0229] 在体外试验中分析实施例12中所述突变蛋白的效力。简言之,从肝素化的人全血中分离PBMC,并用不同突变蛋白以一定浓度在37C下刺激30min。通过固定终止刺激。透化后,将PBMC染色用于细胞内FoxP3和磷酸-STAT5水平以及表面CD4和CD25表达,并通过流式细胞术分析。调节性T细胞(Treg)和效应T细胞(Teff)分别被门控为CD4+CD4+CD25hiFoxP3+或CD4+CD25loFoxP3-。显示了针对磷酸-STAT5染色阳性的细胞的百分比。该试验测定突变蛋白特异性刺激Treg而不刺激Teff的能力。使用各测试制品的最佳拟合剂量-响应曲线来计算EC50值。

[0230] 令人惊讶的是,具有L118I、L80I、L56I或L53I突变的突变蛋白与没有任何这些突变的IL-2突变蛋白相比,具有增加的效力(刺激Treg)。没有L118I、L80I、L56I或L53I突变,但具有V69A、Q74P和N88D突变的IL-2突变蛋白约为51pM。包含L118I、L80I、L56I或L53I之一的突变蛋白的EC₅₀,其各自的EC₅₀分别为约30、40、41和45。刺激Treg的EC50的差异(Teff刺激方面没有变化)是令人惊讶的,并且对于具有本实施例所述突变之一的突变蛋白而言将无法预测。还可以通过比较亲本IL-2突变蛋白(包含V69A、Q74P、N88D和C125S)与还包含L118I、L80I、L56I或L53I突变之一的突变蛋白的比例来评估数据。使用该比例使不同实验所用的不同细胞群标准化。使用该比例,L118I与亲本对照相比效力平均增加约25%(平均0.16的标准误差),而其他突变与使用该比例的亲本对照相比活性降低。

[0231] 体内证实了具有L118I、L80I、L56I或L53I突变之一的突变蛋白的体外数据。发现

L118I在体内比没有L118I突变的突变蛋白更有效力。简言之,在第0和7天,将1微克所示测试制品或载体皮下注射到用人CD34+造血干细胞重建的Nod-Scid-IL-2R γ -缺陷(NSG)小鼠。在第11天,处死小鼠,并且通过心脏穿刺将血液收集到含有肝素的管中。通过裂解红细胞分离外周血白细胞(PBL),并用与人类标志物CD45、CD3、CD8、CD4、FoxP3、CD25和CD56反应的抗体染色。通过流式细胞术确定人调节性T细胞(Treg, CD45+CD3+CD4+CD25+FoxP3+)、激活的效应T细胞(act Teff, CD45+CD3+CD4+CD25+FoxP3-)和NK细胞(CD45+CD56+)的百分比。总CD45+、总CD4+和总CD8+细胞的频率未改变。在小鼠的脾中观察到类似的结果。如在该试验中测定的具有L80I突变的IL-2突变蛋白的体内效力与没有L80I突变的突变蛋白相比略有增加,并且如在该试验中测定的具有L56I或L53I突变的突变蛋白的体内效力与没有所述突变的突变蛋白大致相同。突变蛋白用20个氨基酸(GGGGS)₄接头N-末端连接至如本文所述的Fc区。其是连接IL-2突变蛋白C-末端和Fc区N-末端的接头。

[0232] 实施例14:具有20个氨基酸接头的N-末端Fc取向在刺激Treg方面最有效。使用不同长度的GGGGS重复,将具有V69A、Q74P和N88D的IL-2突变蛋白与包含L234A、L235A和G237A突变的突变的Fc区融合。测试了通过用包含3个和4个GGGGS重复的接头将突变蛋白c-末端与人IgG1 Fc的n-末端融合的IL2突变蛋白分子,以确定接头的长度是否影响IL-2突变蛋白的效力。还测试了通过用一个GGGGS重复将其n-末端与人IgG1 Fc的c-末端融合的突变蛋白。简言之,在第0天,向用人CD34+造血干细胞重建的Nod-Scid-IL-2R γ -缺陷(NSG)小鼠皮下注射1微克具有不同接头长度的不同IL-2突变蛋白或载体。在第7天,处死小鼠,并且通过心脏穿刺将血液收集到含有肝素的管中。通过裂解红细胞分离外周血白细胞(PBL),并用与人类标志物CD45、CD3、CD8、CD4、FoxP3、CD25和CD56反应的抗体染色。通过流式细胞术确定人调节性T细胞(Treg, CD45+CD3+CD4+CD25+FoxP3+)、激活的效应T细胞(act Teff, CD45+CD3+CD4+CD25+FoxP3-)和NK细胞(CD45+CD56+)的百分比。总CD45+、总CD4+和总CD8+细胞的频率未改变。在小鼠的脾中观察到类似的结果。

[0233] 发现与仅具有3个GGGGS重复的接头的突变蛋白或与用单个GGGGS重复在人IgG1 Fc的c末端融合的突变蛋白相比,用包含4个GGGGS重复的接头在人IgG1 Fc的N末端融合的突变蛋白是最有力的。另外,尽管具有4个GGGGS重复的蛋白质在扩增Treg中更有效,但所述构型不触发CD56+NK细胞的任何差异性扩增。不能预测具有用较长接头来N-末端Fc融合的突变蛋白的蛋白质将是最有力的,而且也不能触发CD56+NK细胞的任何差异性扩增。

[0234] 实施例15:治疗患有活动性类风湿性关节炎的患者。

[0235] 向患有活动性类风湿性关节炎的患者施用包含含有序列SEQ ID NO:37、38、39或40的IL-2突变蛋白蛋白质的药物组合物。发现IL-2突变蛋白有效地治疗患者中的活动性类风湿性关节炎。

[0236] 实施例16:治疗患有活动性系统性红斑狼疮的患者与受试者。

[0237] 向患有活动性系统性红斑狼疮的患者施用包含含有序列SEQ ID NO:37、38、39或40的IL-2突变蛋白蛋白质的药物组合物。发现IL-2突变蛋白有效地治疗活动性系统性红斑狼疮。

[0238] 实施例17:治疗患有类固醇难治性慢性移植物抗宿主病的患者与受试者。

[0239] 向患有类固醇难治性慢性移植物抗宿主病的患者施用包含含有序列SEQ ID NO:37、38、39或40的IL-2突变蛋白蛋白质的药物组合物。发现IL-2突变蛋白有效地治疗类固醇

难治性慢性移植植物抗宿主病。

[0240] 实施例18: IL-2突变蛋白在人Treg中诱导pSTAT5。用连续稀释的包含SEQ ID NO: 39或40序列的IL-2突变蛋白蛋白质在37C处理来自六个健康供体的肝素化全血的纯化PBMC 30分钟。将细胞固定、洗涤、透化和洗涤。用检测表面标志物和细胞内/核标志物(pSTAT5和FOXP3)的抗体染色细胞。数据在ATTUNE NxT细胞仪上收集。Treg门控为单核、单重、CD3pos、CD4pos、CD25hi、FoxP3pos。测定表达磷酸化STAT5的门控Treg的%。确定了被拟合为pSTAT5和EC50值的剂量-响应的最佳拟合曲线。对于SEQ ID NO:39的IL-2(37.26 ± 7.30 ; n=16)和SEQ ID NO:40的IL-2(23.11 ± 5.35 ; n=15), 测定所有6个供体的平均EC50值。数据证明IL-2突变蛋白可在人Treg中诱导pSTAT5。包含SEQ ID NO:40的序列的IL-2比包含SEQ ID NO:39的IL-2序列更有效力, 但两者在多个细胞群体中都有活性。

[0241] 实施例19: IL-2突变蛋白在体外诱导猴PBMC中的pSTAT5。用连续稀释的包含SEQ ID NO:39或40序列的IL-2突变蛋白蛋白质在37C下处理来自三个健康猴的肝素化全血的纯化PBMC 60分钟。在IL-2突变蛋白处理的最后30min加入荧光染料(Fluorochrome)偶联的抗CD25和抗CD4。将细胞固定、洗涤、透化和洗涤。用检测表面标志物和细胞内/核标志物(pSTAT5和FOXP3)的剩余抗体染色细胞。数据在ATTUNE NxT细胞仪上收集。Treg门控为单核、单重、CD4pos、CD25hi、FoxP3pos。测定表达磷酸化STAT5的门控Treg的%。发现IL-2突变蛋白在猴中诱导pSTAT5。

[0242] 实施例20: IL-2突变蛋白诱导Treg细胞扩增并诱导Treg体内增殖。在用SEQ ID NO:39或40的IL-2突变蛋白给药前(2个时间点/食蟹猴, 5只食蟹猴)和用SEQ ID NO:39(5个时间点/食蟹猴, 2只食蟹猴)或SEQ ID NO:40(5个时间点/食蟹猴, 3只食蟹猴)给药后, 在K2EDTA管中收集来自猴(食蟹猴)的静脉全血。将样品分成两份, 并且分别对两个FACS组染色。一个是“Treg组”, 并且一个是一般免疫表型组。裂解RBC, 并在固定和透化后对细胞的表面和细胞内标志物进行染色。对于FACs分析, 通过ADVIA测定总细胞数/ μ l。然后用总数/ μ l和总数的%计算给定亚群的细胞数/ μ l。对于每只猴, 将两次给药前出血的给定细胞类型/ μ l的平均数平均, 并用于使给药后出血标准化, 以便确定“与给药前相比的倍数变化”。为了分析血清细胞因子和趋化因子, 冷冻来自K2EDTA全血的血浆直到研究结束。通过多重MSD测定, 使用标准对照的系列稀释物定量趋化因子和细胞因子的量。确定给药前出血中MCP-1和IP-10的平均值和范围。发现两种突变蛋白在猴中扩增Treg并诱导Treg增殖。这些结果证明IL-2突变蛋白在与人相似的体内动物模型中起作用。还发现在猴(非人灵长类动物)中, 两种分子都没有显著扩增Tconv细胞、CD4细胞(T幼稚(Tnaive))或CD8细胞(细胞毒性T)、NK细胞。还发现, 两种分子都没有显著地诱导血清趋化因子。该数据证明IL-2突变蛋白可以扩增Treg细胞并诱导Treg细胞增殖, 而没有不想要的扩增或其他途径的激活。因此, IL-2突变蛋白对Treg扩增和增殖具有惊人的效力、有效性和选择性。

[0243] 总之, 本文提供的实施方式和实施例证实IL-2突变蛋白可以如意图的那样起作用, 并可用于治疗本文所述的疾病和病况。

[0244] 本说明书包含对专利、专利申请和出版物的大量引用。为了所有目的, 将各自通过引用并入本文。

IL-2突变蛋白

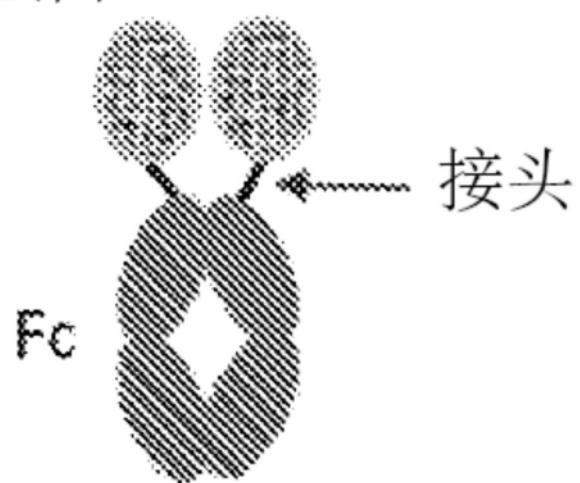


图1