

(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 3 月 2 日 (02.03.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/025249 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/114858

(22) 国际申请日: 2022 年 8 月 25 日 (25.08.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110985497.7 2021年8月25日 (25.08.2021) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司(JIANGSU HENGRUI PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。上海盛迪医药有限公司(SHANGHAI SHENGDI PHARMACEUTICAL CO., LTD) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江镇海科路 1288 号, Shanghai 201210 (CN)。

(72) 发明人: 马夏珍(MA, Xiazhen); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。田晨敏(TIAN, Chenmin); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。李小菲(LI, Xiaofei); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司(GE CHENG & CO., LTD); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼10层程伟, Beijing 100738 (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, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING FUSION PROTEIN

(54) 发明名称: 一种含融合蛋白的药物组合物

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition containing a fusion protein. Specifically, the present invention relates to a pharmaceutical composition comprising the fusion protein containing covalently bonded IL-2 and an anti-IL-2 antibody, and the use thereof.

(57) 摘要: 涉及一种含融合蛋白的药物组合物; 具体地, 涉及包含含有共价结合的 IL-2 与抗 IL-2 抗体的融合蛋白的药物组合物及其用途。



WO 2023/025249 A1

一种含融合蛋白的药物组合物

技术领域

本披露属于药物制剂领域，具体地，本披露涉及一种包含含有共价结合的 IL-2 与抗 IL-2 抗体的融合蛋白的药物组合物，以及其作为药物的用途。

背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

人白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2)，也称为 T 细胞生长因子 (TCGF)，基因位于 4 号染色体 (4q27)，包括共 7kb 的序列，由 133 个氨基酸组成，分子量约 15kD。1976 年和 1977 年，Doris Morgan, Francis Ruscetti, Robert Gallo 和 Steven Gillis, Kendal Smith 等分别发现活化后的 T 细胞培养液可以促进 T 细胞增殖。之后培养液中的刺激因子被纯化并被鉴定为单一的蛋白质即 IL-2。

IL-2 通过细胞表面的 IL-2R 发生作用。IL-2R 包括三个亚基，IL-2R α (即 CD25)、IL-2R β (即 CD122) 和 IL-2R γ (即 CD132)。三个亚基可以形成三种受体形式：高结合力受体包含所有三个亚基 IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$ ，中结合力受体包含 IL-2R β/γ ，低结合力受体为 IL-2R α 。其中，IL-2R β 和 IL-2R γ 是 IL-2 激活下游信号通路所必需的，当 IL-2 同时结合 IL-2R β 和 IL-2R γ 时，两个受体亚基形成异源二聚体，磷酸化细胞内的 STAT5，进入细胞核导致相应的基因转录和表达；IL-2R α 并非信号传导所必需，但可以增强 IL-2 与 IL-2R β 和 IL-2R γ 的结合。Treg 持续表达高结合力受体 IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$ ，而未被激活的 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞等只表达中结合力受体 IL-2R β/γ 。因此，低剂量 IL-2 优先结合并激活 Treg，而高剂量 IL-2 则也可以激活 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞等免疫效应细胞。

由于 Treg 具有免疫抑制作用，而低剂量 IL-2 具有优先激活 Treg 的性质，因此低剂量 IL-2 被报道可以用于一系列免疫相关，如自身免疫疾病和炎症疾病的治疗，例如系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE)、I 型糖尿病 (type I diabetes, T1D)、慢性移植物对抗宿主疾病 (chronic Graft versus Host Disease, cGvHD)、骨髓移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)、斑秃 (alopecia areata)、丙型肝炎病毒诱导的血管炎 (hepatitis C virus-induced vasculitis)、慢性 GvHD、哮喘、皮炎、斑秃、急性肺损伤、慢性铍尘病、败血症等。在很多接受低剂量 IL-2 处理的患者中，Treg 与效应 T 细胞的比例均有上升，症状也有所缓解。然而一方面，IL-2 半衰期较短，需要频繁给药；另一方面，IL-2 的给药窗口较小，如果剂量略高，则可能激活免疫效应细胞，加重自身免疫疾病。这些 IL-2 本身的性质或缺点使得 IL-2 难以在患者体内保持持续的低剂量，限制了其进一步应用。

发明内容

本披露提供一种含融合蛋白的药物组合物。该组合物具有治疗活性。此外，该组合物还可具有稳定性好，适于冻干等优势。

在一些实施方案中，本披露提供一种药物组合物，包含融合蛋白和缓冲剂，其中所述融合蛋白包含共价结合的 IL-2 与抗 IL-2 抗体，所述缓冲剂为组氨酸缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或琥珀酸盐缓冲剂。在一些实施方案中，所述缓冲剂为组氨酸缓冲剂或醋酸盐缓冲剂。在一些实施方案中，所述缓冲剂为组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂或醋酸-醋酸钠缓冲剂。在一些实施方案中，所述缓冲剂为组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲剂的 pH 为 5.0-6.5。在一些实施方案中，所述缓冲剂的 pH 为 5.0-6.0。在一些实施方案中，所述缓冲剂的 pH 为 5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 或 6.5。在一些实施方案中，所述缓冲剂的 pH 为 5.5-6.0。在一些实施方案中，所述缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 相比其含有的缓冲剂的 pH 具有不超过 ± 0.3 的差异。在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物的 pH 为 5.0-6.5。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 6.0-6.5。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 6.0-6.3。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 或 6.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述融合蛋白的浓度为 5 mg/mL 至 50 mg/mL。在一些实施方案中，所述融合蛋白的浓度为 5 mg/mL 至 30 mg/mL。在一些实施方案中，所述融合蛋白的浓度为 10 mg/mL 至 30 mg/mL。在一些实施方案中，所述融合蛋白的浓度为 5 mg/mL、10 mg/mL、15 mg/mL、20 mg/mL、25 mg/mL、30 mg/mL。在一些实施方案中，所述融合蛋白的浓度为 30 mg/mL。在一些实施方案中，所述融合蛋白的浓度为 10 mg/mL。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含表面活性剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂是非离子表面活性剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂选自聚山梨酯、聚山梨酯 20、聚山梨酯 80、聚羟亚烃、Triton、十二烷基磺酸钠、月桂基磺酸钠、辛基糖甙钠、月桂基-磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-甜菜碱、柯卡酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-二甲基胺、棕榈酰胺基丙基-二甲基胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺、甲基可可酰基钠、甲基油基牛磺酸钠、聚乙二

醇、聚丙二醇、乙烯与丙烯二醇的共聚物等。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯或泊洛沙姆。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯 80 (PS80)、聚山梨酯 20 (PS20) 或泊洛沙姆 188 (PF68)。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯 80 或泊洛沙姆 188。在一些实施方案中，所述表面活性剂为泊洛沙姆 188。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯 80。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述表面活性剂浓度为 0.05 mg/mL 至 2 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.05 mg/mL 至 1.0 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.1 mg/mL 至 0.8 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.1 mg/mL 至 0.6 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.2 mg/mL 至 0.6 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL、0.6 mg/mL、0.7 mg/mL、0.8 mg/mL、0.9 mg/mL、1.0 mg/mL、1.1 mg/mL、1.2 mg/mL、1.3 mg/mL、1.4 mg/mL、1.5 mg/mL、1.6 mg/mL、1.7 mg/mL、1.8 mg/mL、1.9 mg/mL 或 2.0 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 1.6 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 1.5 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.8 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.6 mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.4 mg/mL。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含糖。在一些实施方案中，所述糖选自常规组合物 $(CH_2O)_n$ 及其衍生物，包括单糖，二糖，三糖，多糖，糖醇，还原性糖，非还原性糖等等。所述的糖可选自葡萄糖，蔗糖，海藻糖，乳糖，果糖，麦芽糖，右旋糖苷，甘油，赤藻糖醇，丙三醇，阿拉伯糖醇，sylitol，山梨糖醇，甘露醇，密里二糖，松三糖，蜜三糖，甘露三糖，水苏糖，麦芽糖，乳果糖，麦芽酮糖，山梨醇，麦芽糖醇，乳糖醇，异-麦芽酮糖等。在一些实施方案中，所述糖选自蔗糖、甘露醇和海藻糖中的一种或多种。在一些实施方案中，所述糖为蔗糖。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，在一些实施方案中，所述糖的浓度为 20 mg/mL 至 100 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 30 mg/mL 至 80 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 40 mg/mL 至 80 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 30 mg/mL 至 50 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 20 mg/mL、30 mg/mL、36 mg/mL、40 mg/mL、45 mg/mL、50 mg/mL、60 mg/mL、70 mg/mL、80 mg/mL、87 mg/mL、90 mg/mL 或 100 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 87 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 80 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 50 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 45 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 40 mg/mL。在一些实施方案中，所述糖的浓度为 36 mg/mL。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物还

包含辅料。在一些实施方案中，所述辅料为甘氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、盐酸精氨酸、谷氨酸、天冬氨酸或乙二胺四乙酸二钠。在一些实施方案中，所述辅料为甘氨酸。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述辅料的浓度为 1 mg/mL 至 30 mg/mL；优选地，辅料的浓度为 5 mg/mL 至 15 mg/mL。在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述辅料的浓度为 12 mg/mL。在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述辅料的浓度为 10 mg/mL。在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述辅料的浓度为 9 mg/mL。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述缓冲剂的浓度为 5 mM 至 100 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 5 mM、10 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM 或 100 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 5 mM 至 30 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 10 mM 至 30 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 5 mM 至 10 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 10 mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 5 mM。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述抗 IL-2 抗体与 IL-2 的亲合力的 KD 值 ≤ 5 nM。在另一些实施方案中，所述抗 IL-2 抗体与 IL-2 的亲合力的 KD 值 > 5 nM 或 ≥ 10 nM，且 ≤ 200 nM 或 ≤ 150 nM 或 ≤ 100 nM 或 ≤ 80 nM 或 ≤ 60 nM。在一些实施方案中，所述 KD 值 > 5 nM 且 ≤ 60 nM， > 5 nM 且 ≤ 50 nM， ≥ 10 nM 且 ≤ 50 nM， ≥ 10 nM 且 ≤ 60 nM， > 5 nM 且 ≤ 80 nM， ≥ 10 nM 且 ≤ 80 nM， > 5 nM 且 ≤ 100 nM， ≥ 10 nM 且 ≤ 100 nM， > 5 nM 且 ≤ 150 nM，或 ≥ 10 nM 且 ≤ 150 nM。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述抗 IL-2 抗体包含 SEQ ID NO: 13、19、25、31、37 或 43 所示的 HCDR1，和/或 SEQ ID NO: 14、20、26、32、38 或 44 所示的 HCDR2，和/或 SEQ ID NO: 15、21、27、33、39 或 45 所示的 HCDR3，和/或 SEQ ID NO: 16、22、28、34、40 或 46 所示的 LCDR1，和/或 SEQ ID NO: 17、23、29、35、41 或 47 所示的 LCDR2，和/或 SEQ ID NO: 18、24、30、36、42 或 48 所示的 LCDR3。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述抗 IL-2 抗体包含 SEQ ID NO: 13、25 或 37 所示的 HCDR1，和/或 SEQ ID NO: 14、26 或 38 所示的 HCDR2，和/或 SEQ ID NO: 15、27 或 39 所示的 HCDR3，和/或 SEQ ID NO: 16、28 或 40 所示的 LCDR1，和/或 SEQ ID NO: 17、29 或 41 所示的 LCDR2，和/或 SEQ ID NO: 18、30 或 42 所示的 LCDR3。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述抗 IL-2 抗体包含 SEQ ID NO: 19、31 或 43 所示的 HCDR1，和/或 SEQ ID NO: 20、32 或 44 所示的 HCDR2，和/或 SEQ ID NO: 21、33 或 45 所示的 HCDR3，和/或 SEQ ID NO: 22、34 或 46 所示的 LCDR1，和/或 SEQ ID NO: 23、35 或 47 所示的 LCDR2，和/或 SEQ ID NO: 24、36 或 48 所示的 LCDR3。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述抗 IL-2 抗体包含 SEQ ID NO: 13-15 所示的 HCDR1-3，和/或 SEQ ID NO: 16-18 所示的 LCDR1-3；SEQ ID NO: 19-21 所示的 HCDR1-3，和/或 SEQ ID NO: 22-24 所示的 LCDR1-3；SEQ ID NO: 25-27 所示的 HCDR1-3，和/或 SEQ ID NO: 28-30 所示的 LCDR1-3；SEQ ID NO: 31-33 所示的 HCDR1-3，和/或 SEQ ID NO: 34-36 所示的 LCDR1-3；SEQ ID NO: 37-39 所示的 HCDR1-3，和/或 SEQ ID NO: 40-42 所示的 LCDR1-3；SEQ ID NO: 43-45 所示的 HCDR1-3，和/或 SEQ ID NO: 46-48 所示的 LCDR1-3。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述抗 IL-2 抗体包含如 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11 之一所示或与之具有至少 90%、95%、98%、99%同一性的 VH；和/或

如 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12 之一所示或与之具有至少 90%、95%、98%、99%同一性的 VH。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述抗 IL-2 抗体包含

如 SEQ ID NO: 1 所示或与之具有至少 90%同一性的 VH，如 SEQ ID NO: 2 所示或与之具有至少 90%同一性的 VL；

如 SEQ ID NO: 3 所示或与之具有至少 90%同一性的 VH，如 SEQ ID NO: 4 所示或与之具有至少 90%同一性的 VL；

如 SEQ ID NO: 5 所示或与之具有至少 90%同一性的 VH，如 SEQ ID NO: 6 所示或与之具有至少 90%同一性的 VL；

如 SEQ ID NO: 7 所示或与之具有至少 90%同一性的 VH，如 SEQ ID NO: 8 所示或与之具有至少 90%同一性的 VL；

如 SEQ ID NO: 9 所示或与之具有至少 90%同一性的 VH，如 SEQ ID NO: 10 所示或与之具有至少 90%同一性的 VL；或

如 SEQ ID NO: 11 所示或与之具有至少 90%同一性的 VH，如 SEQ ID NO: 12 所示或与之具有至少 90%同一性的 VL。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述抗 IL-2 抗体的可变区与 CDR 采用 Kabat 编号系统。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述抗 IL-2 抗体的重链可变区（VH）与人 IgG1 重链恒定区连接，轻链可变区（VL）与 kappa 或 lamda

链恒定区连接。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述抗 IL-2 抗体包含如 SEQ ID NO: 157、159、161、163、165、167 之一所示或与之具有至少 80%、90%、95%、98%、99% 同一性的 HC；和/或

如 SEQ ID NO: 158、160、162、164、166、168 之一所示或与之具有至少 80%、90%、95%、98%、99% 同一性的 LC。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述抗 IL-2 抗体包含如 SEQ ID NO: 157 所示或与之具有至少 80%、90%、95%、98%、99% 同一性的全长重链 (HC)，如 SEQ ID NO: 158 所示或与之具有至少 80%、90%、95%、98%、99% 同一性的全长轻链 (LC)；

如 SEQ ID NO: 159 所示或与之具有至少 80%、90%、95%、98%、99% 同一性的 HC，如 SEQ ID NO: 160 所示或与之具有至少 80%、90%、95%、98%、99% 同一性的 LC；

如 SEQ ID NO: 161 所示或与之具有至少 80%、90%、95%、98%、99% 同一性的 HC，如 SEQ ID NO: 162 所示或与之具有至少 80%、90%、95%、98%、99% 同一性的 LC；

如 SEQ ID NO: 163 所示或与之具有至少 90% 同一性的 HC，如 SEQ ID NO: 164 所示或与之具有至少 80%、90%、95%、98%、99% 同一性的 LC；

如 SEQ ID NO: 165 所示或与之具有至少 90% 同一性的 HC，如 SEQ ID NO: 166 所示或与之具有至少 80%、90%、95%、98%、99% 同一性的 LC；或

如 SEQ ID NO: 167 所示或与之具有至少 80%、90%、95%、98%、99% 同一性的 HC，如 SEQ ID NO: 168 所示或与之具有至少 80%、90%、95%、98%、99% 同一性的 LC。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述抗 IL-2 抗体为 Fab、Fv、sFv、Fab'、F(ab')₂、线性抗体、单链抗体、scFv、sdAb、sdFv、纳米抗体、肽抗体 peptibody、结构域抗体和多特异性抗体（双特异性抗体、diabody、triabody 和 tetraabody、串联二- scFv、串联三-scFv），例如具体为 scFv、Fv、Fab 或 Fab' 片段。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述融合蛋白中的 IL-2 与抗 IL-2 抗体的轻链可变区或重链可变区连接，例如，IL-2 与抗 IL-2 抗体的轻链可变区或重链可变区的 N 端连接。在一些实施方案中，IL-2 与抗 IL-2 抗体的轻链可变区的 N 端连接。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述融合蛋白中的 IL-2 与抗 IL-2 抗体通过连接子连接。在一些实施方案中，所述连接子是柔性肽连接子。在一些实施方案中，所述连接子的氨基酸长度为 5-50、10-40、20-30 或 25。在一些实施方案中，所述连接子选自：如 (G_mS_n)_x 或 (GGNGT)_x 或 (YGNGT)_x

所示的氨基酸序列，其中 m、n 各自独立地选自 1-8 的整数（例如，1、2、3、4、5、6、7 或 8），x 独立地选自 1-20 的整数（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20）。在一些具体实施方案中，所述连接子具有如 $(G_4S)_x$ 所示的氨基酸序列，x 独立地选自 1-6 的整数（例如，x 为 4 或 5）。所述连接子还可以为与上述 $(G_mS_n)_x$ 或 $(GGNGT)_x$ 或 $(YGNGT)_x$ 所示的氨基酸序列具有类似柔性和长度的其他连接子。在一些实施方案中，所述连接子的氨基酸序列如 SEQ ID No: 190 所示。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述融合蛋白选择性增强高表达 IL-2Ra 的细胞的活性或促进其增殖，所述高表达 IL-2Ra 的细胞例如为调节性 T (Treg) 细胞。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述融合蛋白中的 IL-2 存在第三位氨基酸（作为一个示例，T3）的氨基酸取代或 N 端缺失。一些具体实施方案中，IL-2 的第三位氨基酸取代为 Ala、Gln 或 Glu（作为一个示例，T3A、T3Q、T3E），N 端缺失为 N 端前 3 个或前 7 个氨基酸缺失。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述融合蛋白包含选自以下组的 HC 和 LC：

SEQ ID No: 169 所示的 HC，SEQ ID No: 158 所示的 LC；
SEQ ID No: 171 所示的 HC，SEQ ID No: 160 所示的 LC；
SEQ ID No: 159 所示的 HC，SEQ ID No: 172 所示的 LC；
SEQ ID No: 173 所示的 HC，SEQ ID No: 162 所示的 LC；
SEQ ID No: 175 所示的 HC，SEQ ID No: 164 所示的 LC；
SEQ ID No: 163 所示的 HC，SEQ ID No: 176 所示的 LC；
SEQ ID No: 177 所示的 HC，SEQ ID No: 166 所示的 LC；
SEQ ID No: 179 所示的 HC，SEQ ID No: 168 所示的 LC；
SEQ ID No: 167 所示的 HC，SEQ ID No: 180 所示的 LC；
SEQ ID No: 161 所示的 HC，SEQ ID No: 174、181-186 任一所示的 LC；
SEQ ID No: 157 所示的 HC，SEQ ID No: 170、187 所示的 LC；
SEQ ID No: 165 所示的 HC，SEQ ID No: 178、188、189 任一所示的 LC；
或与上述 HC、LC 具有至少 80%、90%、95%、98%、99% 同一性的序列。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述融合蛋白选择性的增强了 IL-2 对 Treg 活性的作用（例如促增殖活性、促 STAT5 磷酸化活性），和/或选择性地提高 IL-2 促 Treg 细胞中 FOXP3、CD25 和 Icos 中的一种或多种表达的能力。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述融合蛋白还具有 (i) - (iii) 中的一项或多项：

- (i) 对 Treg 的活性激活程度高于对 CD8+T 细胞的活性激活程度；
- (ii) 相较于在 CD8+T 细胞中，在 Treg 细胞中对 STAT5 磷酸化的促进程度更

高；

(iii) 相较于 CD8+T 细胞、CD4+T 细胞或 NK 细胞的增殖，对 Treg 细胞的增殖促进程度更高。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述抗 IL-2 抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区具有：包含 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列的 HCDR1、包含 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO: 39 的氨基酸序列的 HCDR3，所述轻链可变区具有：包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列的 LCDR1、包含 SEQ ID NO: 41 的氨基酸序列的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO: 42 的氨基酸序列的 LCDR3。在一些实施方案中，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述抗 IL-2 抗体包含 SEQ ID NO: 165 的氨基酸序列的重链和 SEQ ID NO: 166 的氨基酸序列的轻链。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述 IL-2 直接或通过连接子融合至抗 IL-2 抗体的轻链的 N 端。在一些实施方案中，所述 IL-2 的第 3 位氨基酸残基为 E。在一些实施方案中，所述融合蛋白包含 SEQ ID NO: 165 的氨基酸序列的重链和 SEQ ID NO: 189 的氨基酸序列的轻链。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.05 mg/mL 至 2 mg/mL 的聚山梨酯或泊洛沙姆，(c) 20 mg/mL 至 100 mg/mL 的糖，和 (d) 10 mM 至 30 mM 的组氨酸缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或琥珀酸盐缓冲剂，所述缓冲剂的 pH 为 5.5 至 6.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.1 mg/mL 至 0.8 mg/mL 的聚山梨酯或泊洛沙姆，(c) 30 mg/mL 至 80 mg/mL 的糖，和 (d) 10 mM 至 30 mM 的组氨酸缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或琥珀酸盐缓冲剂，所述缓冲剂的 pH 为 5.5 至 6.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.1 mg/mL 至 0.8 mg/mL 的聚山梨酯或泊洛沙姆，(c) 40 mg/mL 至 80 mg/mL 的糖，和 (d) 10 mM 至 30 mM 的组氨酸缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或琥珀酸盐缓冲剂，所述缓冲剂的 pH 为 5.5 至 6.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.1 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨酯或泊洛沙姆，(c) 40 mg/mL 至 80 mg/mL 的糖，和 (d) 10 mM 至 30 mM 的组氨酸缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或琥珀酸盐缓冲剂，所述缓冲剂的 pH 为 5.5 至 6.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.1 mg/mL 至 0.8 mg/mL 的聚山梨酯或泊洛沙姆，(c) 40 mg/mL 至 80 mg/mL 的糖，和 (d) 10 mM 至 30 mM 的

组氨酸缓冲剂，所述组氨酸缓冲剂的 pH 为 5.5 至 6.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.1 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨酯或泊洛沙姆，(c) 40 mg/mL 至 80 mg/mL 的糖，和 (d) 10 mM 至 30 mM 的组氨酸缓冲剂，所述组氨酸缓冲剂的 pH 为 5.5 至 6.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 80 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 的醋酸盐缓冲剂，所述醋酸盐缓冲剂的 pH 为 5.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 80 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 的组氨酸缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或琥珀酸盐缓冲剂，所述缓冲剂的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 80 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 的组氨酸缓冲剂，所述组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 80 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 的组氨酸缓冲剂，所述组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 80 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 的醋酸盐缓冲剂，所述醋酸盐缓冲剂的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.2 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 80 mg/mL 的海藻糖，和 (d) 10 mM 的醋酸盐缓冲剂，所述醋酸盐缓冲剂的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.1 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的泊洛沙姆 188，(c) 80 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 的醋酸盐缓冲剂，所述醋酸盐缓冲剂的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.1 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的泊洛沙姆 188，(c) 80 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 的组氨酸缓冲剂，所述组氨酸缓冲剂的 pH 为 5.5。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.1 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的泊洛沙姆 188，(c) 80 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 5.5 至 6.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.6 mg/mL 的泊洛沙姆 188，(c) 80 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.6 mg/mL 的泊洛沙姆 188，(c) 80 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.6 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 80 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.4 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 87 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.8 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 87 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 1.5 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 87 mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.1 mg/mL 至 0.8 mg/mL 的聚山梨酯或泊洛沙姆，(c) 30 mg/mL 至 80 mg/mL 的蔗糖，(d) 1 mg/mL 至 30 mg/mL 的甘氨酸，和 (e) 5 mM 至 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 0.1 mg/mL 至 0.8 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 30 mg/mL 至 50 mg/mL 的蔗糖，(d) 5 mg/mL 至 15 mg/mL 的甘氨酸，和 (e) 5 mM 至 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 10 mg/mL 的所述融合蛋白，(b) 1.6 mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 36 mg/mL

的蔗糖, (d) 12 mg/mL 甘氨酸, 和 (e) 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, 所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 10 mg/mL 的所述融合蛋白, (b) 0.8 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 36 mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, 所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 10 mg/mL 的所述融合蛋白, (b) 0.8 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 36 mg/mL 的蔗糖, (d) 12 mg/mL 甘氨酸, 和 (e) 5 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, 所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 10 mg/mL 的所述融合蛋白, (b) 0.8 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 36 mg/mL 的蔗糖, (d) 12 mg/mL 甘氨酸, 和 (e) 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, 所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 10 mg/mL 的所述融合蛋白, (b) 1.6 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 36 mg/mL 的蔗糖, (d) 12 mg/mL 甘氨酸, 和 (e) 5 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, 所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 10 mg/mL 的所述融合蛋白, (b) 0.8 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 50 mg/mL 的蔗糖, (d) 9 mg/mL 甘氨酸, 和 (e) 5 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, 所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 10 mg/mL 的所述融合蛋白, (b) 0.8 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 50 mg/mL 的蔗糖, (d) 9 mg/mL 甘氨酸, 和 (e) 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, 所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 10 mg/mL 的所述融合蛋白, (b) 0.8 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 45 mg/mL 的蔗糖, (d) 10 mg/mL 甘氨酸, 和 (e) 5 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, 所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 10 mg/mL 的所述融合蛋白, (b) 0.8 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 45 mg/mL 的蔗糖, (d) 10 mg/mL 甘氨酸, 和 (e) 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, 所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 10 mg/mL 的所述融合蛋白, (b) 0.8 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 40 mg/mL

的蔗糖, (d) 10 mg/mL 甘氨酸, 和 (e) 5 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, 所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 10 mg/mL 的所述融合蛋白, (b) 0.8 mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 40 mg/mL 的蔗糖, (d) 10 mg/mL 甘氨酸, 和 (e) 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, 所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

本披露的数值范围旨在包括该范围内的每个数字和数字子集, 无论是否被明确地公开。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 所述药物组合物是液体制剂。在一些实施方案中, 所述液体制剂的溶剂是水。在一些实施方案中, 所述组合物的施用途为皮下注射、皮内注射、静脉注射或肌肉注射。在一些实施方案中, 所述组合物的施用途为皮下注射。

本披露还提供一种的冻干制剂, 其特征在于所述冻干制剂复溶后可形成如上任一项所述的药物组合物。本披露还提供一种的冻干制剂, 其为如上任一项所述的药物组合物的冻干形式。

本披露还提供一种制备冻干制剂的方法, 其中包括将如上任一项所述的药物组合物进行冷冻干燥的步骤。

本披露还提供一种冻干制剂, 所述制剂通过将如上任一项所述的药物组合物经冷冻干燥获得。

本披露还提供一种复溶溶液, 其特征在于所述复溶溶液是通过将如上任一项所述的冻干制剂复溶制备的。本披露还提供一种的冻干制剂, 其为如上任一项所述的冻干制剂的复溶形式。

本披露还提供一种制品, 其包括容器, 该容器中装有如上任一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻干制剂或如上任一项所述的复溶溶液。

在一些实施方案中, 本披露还提供如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的制品在制备治疗自身免疫疾病或延缓自身免疫疾病进展的药物中的用途。

本披露还提供一种治疗自身免疫疾病或延缓自身免疫疾病进展的方法, 包括给予患者有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的制品。

在一些实施方案中, 本披露还提供如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的制品, 其用于治疗自身免疫疾病或延缓自身免疫疾病进展。

在一些实施方案中, 所述自身免疫疾病选自以下的任一项或组合: 狼疮、移植物抗宿主病、丙型肝炎诱导的脉管炎、I 型糖尿病、多发性硬化、炎症肠病、慢性 GvHD、哮喘、皮炎、斑秃、急性肺损伤、败血症、反应性关节炎、类风湿性关节

炎。

附图说明

图 1A 和图 1B 分别为抗 IL-2 抗体阻断 IL-2 与 IL-2R α 和 IL-2R β 结合的 ELISA 实验结果；其中图 1A 为抗 IL-2 抗体阻断 IL-2 与 IL-2R α 结合的 ELISA 结果；图 1B 为抗 IL-2 抗体阻断 IL-2 与 IL-2R β 结合的 ELISA 结果。

图 2 为通过 ELISA 实验检测抗 IL-2 抗体与 IL-2 的结合能力的结果。

图 3A 至图 3H 为抗 IL-2 抗体与 IL-2 的非共价复合体刺激人外周血 Treg 和 CD8⁺T 细胞 STAT5 磷酸化的实验结果。

图 4A 至图 4D 为融合蛋白刺激人外周血调节性 T 细胞 Treg 和 CD8⁺T 细胞中 STAT5 磷酸化活性的实验结果。

图 5A 至图 5F 为融合蛋白对 Balb/c 小鼠体内外周血中淋巴细胞增殖影响的实验结果。

图 6 为融合蛋白对经过 OVA 免疫的小鼠脾脏中淋巴细胞增殖影响的实验结果。

图 7 为融合蛋白在小鼠延迟性过敏反应模型中的药效结果。

图 8A 至图 8B 为融合蛋白在小鼠关节炎模型中的药效结果。

图 9A 至图 9F 为抗 IL-2 抗体与不同 IL-2 变体形成的融合蛋白刺激人外周血调节性 T 细胞 Treg 和 CD8⁺T 细胞中 STAT5 磷酸化活性的实验结果。

图 10 为 D2-60-b-T3E 对 MRL/lpr 小鼠尿中蛋白含量影响的实验结果 (n=7 至 10)。

图 11A 和图 11B 分别为 D2-60-b-T3E 对 MRL/lpr 小鼠血清中 dsDNA IgG、IgM 含量影响的实验结果 (**P<0.01 vs. 模型对照组)。

图 12A 和图 12B 分别为 D2-60-b-T3E 对 MRL/lpr 小鼠肾功能影响的实验结果。*P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001 vs.模型对照组, n=9 至 10。

图 13 A 和图 13B 分别为 D2-60-b-T3E 对 MRL/lpr 小鼠血清 IL-6、INF- γ 含量影响的实验结果。*P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001 vs.模型对照组, n=9 至 10。

图 14 为 D2-60-b-T3E 对 MRL/lpr 小鼠血清 IL-10 含量影响的实验结果。*P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001 vs.模型对照组, n=9 至 10。

图 15 为 D2-60-b-T3E 对 MRL/lpr 小鼠病理评分的影响。*P<0.05, **P<0.01, ****P<0.0001 vs.模型对照组, n=9 至 10。

具体实施方式

术语

为了更容易理解本披露，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义，本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本披露所属领域的

一般技术人员通常理解的含义。

本披露所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558 (1968) 中所述。

“白介素-2”或“IL-2”旨在被广义地解释，包括任意 IL-2 相关的产品。包括但不限于人和非人的 IL-2 同系物、片段或截短体、融合蛋白（如与信号肽融合或其他活性、非活性成份融合，活性成份例如抗体）、修饰形式（如 PEG 化、糖基化、白蛋白缀合/融合、Fc 缀和/融合、羟乙基化等）、和保守修饰的蛋白等。该术语涵盖来自任何脊椎动物来源，包括哺乳动物如灵长类（例如人）和啮齿动物（例如小鼠和大鼠）的任何天然的 IL-2。该术语还涵盖未加工的 IL-2 以及源自细胞中的加工的任何形式的 IL-2，还涵盖天然存在的 IL-2 变体，例如剪接变体或等位变体，还涵盖 IL-2 的保守修饰变体。

“IL-2R α ”、“CD25”或“IL-2 受体的 α 亚基”指来自任何脊椎动物来源，包括哺乳动物如灵长类（例如人）和啮齿动物（例如小鼠和大鼠）的任何天然 CD25，包括“全长”的未加工的 CD25 以及源自细胞中的加工的任何形式的 CD25，还包括天然存在的 CD25 变体，例如剪接变体或等位变体。在某些实施方案中，CD25 是人 CD25，例示性序列如 SEQ ID NO.37 所示。

“高亲合力 IL-2 受体”指 IL-2 受体的异型三聚体形式，其由受体 γ 亚基（也称为通用细胞因子受体 γ 亚基、 γ_c 或 CD132）、受体 β 亚基（也称为 CD122、p70 或 IL-2R β ）和受体 α 亚基（也称为 CD25、p55、IL-2R α ）组成。比较而言，“中等亲合力 IL-2 受体”指仅包含 γ 亚基和 β 亚基而无 α 亚基的 IL-2 受体（参见例如 Olejniczak 和 Kasprzak, MedSci Monit 14, RA179-189 (2008)）。

“保守修饰”适用于氨基酸和核苷酸序列。对于特定的核苷酸序列，保守改性是指编码相同或基本相同的氨基酸序列的那些核酸，或在核苷酸不编码氨基酸序列的情况下，是指基本上相同的核苷酸序列。对于氨基酸序列，“保守修饰”是指具有类似特征（例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等）的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸，使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓，一般而言，多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性（参见例如 Watson 等 (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页，(第 4 版)）。

“氨基酸突变”包括氨基酸取代、缺失、插入、修饰及其任意组合，以实现最终构建体，使得最终构建体拥有期望的特性，例如增强的稳定性、提高的活性。氨基酸序列缺失和插入包括氨基和/或羧基端缺失和氨基酸插入。优选的氨基酸突变是氨基酸取代。为了改变例如抗 IL-2 抗体的结合特性，可以将非保守性的氨基酸取代，即将一个氨基酸用具有不同结构和/或化学特性的另一种氨基酸替换。优选的氨基酸取代包括用亲水性氨基酸替换疏水性氨基酸。氨基酸取代包括由非天然存在的氨基酸或由 20 种标准氨基酸的天然存在的氨基酸衍生物（例如 4-羟脯氨

酸、3-甲基组氨酸、鸟氨酸、高丝氨酸、5-羟赖氨酸) 替换。可以使用本领域中公知的遗传或化学方法生成氨基酸突变, 包括定点诱变、PCR、基因合成、化学修饰等方法。

“抗体”以最广义使用, 涵盖各种抗体结构, 包括但不限于单克隆抗体, 多克隆抗体; 单特异性抗体, 多特异性抗体(例如双特异性抗体), 全长抗体和抗体片段(或抗原结合片段, 或抗原结合部分), 只要它们展现出期望的抗原结合活性。抗体可以指免疫球蛋白, 是由两条重链和两条轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同, 故其抗原-特异性也不同。据此, 可将免疫球蛋白分为五类, 或称为免疫球蛋白的同种型, 即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE, 其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别, 又可分为不同的亚类, 如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大, 为可变区(V 区); 靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定, 为恒定区(C 区)。可变区包括 3 个高变区(CDR) 和 4 个序列相对保守的骨架区(FR)。3 个高变区决定抗体的特异性, 又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(VL) 和重链可变区(VH) 由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成, 从氨基端到羧基端依次排列的顺序为: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1, LCDR2, 和 LCDR3; 重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3。

对于 CDR 的确定或定义, 能够通过分辨抗体的结构和/或分辨抗体-配体复合物的结构来完成 CDR 的确定性描绘, 并鉴定参与抗原结合位点的残基。这可通过本领域技术人员已知的各种技术中的任一种, 例如 X 射线晶体学来实现。多种分析方法可用于鉴定 CDR, 包括但不限于 Kabat 编号系统、Chothia 编号系统、AbM 编号系统、IMGT 编号系统、接触定义、构象定义。

Kabat 编号系统是用于编号抗体中残基的标准并且通常用于鉴定 CDR 区域(参见例如 Johnson&Wu, 2000, *Nucleic Acids Res.*, 28: 214-8)。

Chothia 编号系统与 Kabat 编号系统类似, 但 Chothia 编号系统考虑了某些结构环区域的位置(参见例如 Chothia 等, 1986, *J.Mol.Biol.*, 196: 901-17; Chothia 等人, 1989, *Nature*, 342: 877-83)。

AbM 编号系统使用建模抗体结构的由 Oxford Molecular Group 生产的计算机程序集成套件(参见例如 Martin 等, 1989, *Proc Natl Acad Sci(USA)*, 86: 9268-9272; “AbMTM, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies,” Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd)。AbM 编号系统使用知识数据库和 de-novo 方法的组合, 从基本序列建模抗体的三级结构(参见 Samudrala 等, 1999, 在 *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3: 194-198 中的“Ab

Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach”描述的那些)。

接触定义基于可用复杂晶体结构的分析(参见例如 MacCallum 等, 1996, J.Mol.Biol., 5: 732-45)。

构象定义中, CDR 的位置可鉴定为对抗原结合做出熵贡献的残基(参见例如 Makabe 等, 2008, Journal of Biological Chemistry, 283: 1156-1166)。

其它的 CDR 边界定义可能不严格遵循上述方法之一, 但仍然与 Kabat CDR 的至少一部分重叠, 尽管根据特定残基或残基组不显著影响抗原结合的预测或实验结果, 它们可缩短或延长。如本文使用的, CDR 可指通过本领域已知的任何方法(包括方法的组合)定义的 CDR。本文使用的方法可利用根据这些方法中的任一种定义的 CDR。对于包含超过一个 CDR 的任何给定实施例, 可根据 Kabat、Chothia、延伸的、AbM、IMGT、接触和/或构象定义中的任一个来定义 CDR。

“单克隆抗体”或“单抗”指从基本上同质的抗体群体获得的抗体, 即除了可能以少量存在的天然存在的突变之外, 群体包含的各个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的, 针对单个抗原位点。此外, 与多克隆抗体不同, 每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰语“单克隆”指示如从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征, 并且不被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如, 根据本披露使用的单克隆抗体可通过首先由 Kohler 和 Milstein, 1975, Nature 256: 495 描述的杂交瘤方法来制备, 或者可通过例如美国专利号 4,816,567 中所述的重组 DNA 方法来制备。例如, 单克隆抗体也可从使用 McCafferty 等, 1990, Nature 348: 552-554 中描述的技术, 从所生成的噬菌体文库中分离。

“人抗体”包括具有人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本披露的人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变所引入的突变)。然而, “人抗体”不包括这样的抗体, 即其中已将衍生自另一种哺乳动物物种(诸如小鼠)种系的 CDR 序列移植到人骨架序列上(即“人源化抗体”)。

“人抗体”或“重组人抗体”包括通过重组方法制备、表达、创建或分离的人抗体, 所涉及的技术和方法在本领域中是熟知的, 诸如:

- (1) 从人免疫球蛋白基因的转基因、转染色体动物(例如小鼠)或由其制备的杂交瘤中分离的抗体;
- (2) 从经转化以表达抗体的宿主细胞如转染瘤中分离的抗体;
- (3) 从重组组合人抗体文库中分离的抗体; 以及
- (4) 通过将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他 DNA 序列等方法制备、表达、创建或分离的抗体。

此类重组人抗体包含可变区和恒定区, 这些区域利用特定的由种系基因编码的人种系免疫球蛋白序列, 但也包括随后诸如在抗体成熟过程中发生的重排和突

变。

“抗原 (Ag)” 指用于免疫接种免疫活性的脊椎动物的分子，以产生识别 Ag 的抗体 (Ab)；或在表达文库（例如尤其是噬菌体、酵母或核糖体展示文库）中进行筛选所使用的分子或模拟物。在本文中，Ag 被更广义地定义，并且一般预期包括被 Ab 识别的靶分子。因此，Ag 包括用于产生 Ab 的免疫接种过程或用于选择 Ab 的文库筛选中使用的分子、或其部分或模拟物。因此，对于本披露的与 IL-2 结合的抗体，来自哺乳动物物种的全长 IL-2（例如人、猴、小鼠和大鼠 IL-2），包括其单体和多聚体，例如二聚体、三聚体等，以及 IL-2 的截短变体和其它变体均被称为抗原。

“表位”是指抗原上与免疫球蛋白（或抗体）特异性结合的位点。表位可以由相邻的氨基酸、或通过蛋白质的三级折叠而并列的不相邻的氨基酸形成。由相邻的氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂后保持，而通过三级折叠形成的表位通常在变性溶剂处理后丧失。表位通常以独特的空间构象包括例如 3 至 15 个氨基酸。确定什么表位由给定的抗体结合的方法在本领域中是熟知的，包括免疫印迹和免疫沉淀检测分析等。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术和本文所述的技术，例如 X 射线晶体分析法和二维核磁共振等。

“抗体片段”包括单链抗体；Fab、修饰的 Fab、Fab'、修饰的 Fab'、F(ab')₂、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、单结构域抗体（例如 VH 或 VL 或 VHH）、scFv、二价或三价或四价抗体、Bis-scFv、diabody、tribody、triabody、tetrabody 和上述任意一种的表位结合片段。产生和制备这些抗体片段的方法在本领域是公知的（参见例如 Verma 等人, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181）。Fab-Fv 形式首先公开于 WO2009/040562，其二硫键稳定化形式 Fab-dsFv 首先公开于 WO2010/035012。本披露的抗原结合片段还包括描述于 WO2005/003169、WO2005/003170 和 WO2005/003171 中的 Fab 和 Fab' 片段。多价抗体可包含多特异性例如双特异性或可以是单特异性的（参见例如 WO92/22583 和 WO05/113605），后者实例是描述于 WO 92/22583 中的 Tri-Fab（或 TFM）。

“与 IL-2 结合”，指能与 IL-2 或其表位相互作用，所述 IL-2 或其表位可以是人源的。

“抗原结合位点”指抗原上连续或不连续的，由本披露抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

“调节性 T 细胞”或“Treg”意指一种能抑制其它 T 细胞的应答的特殊化 CD4⁺T 细胞类型。Treg 的特征在于表达 IL-2 受体的 α 亚基（CD25）和转录因子叉头框 P3（FOXP3），并在诱导和维持对抗原（包括那些由肿瘤表达的抗原）的外周自体耐受性中起着关键作用。Treg 需要 IL-2 来实现其功能和发育以及其抑制性特征的诱导。

“效应子功能”指那些可归于抗体 Fc 区（天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体

Fc 区)且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应子功能的例子包括: C1q 结合和补体依赖性细胞毒性 (CDC); Fc 受体结合; 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC); 吞噬作用; 细胞表面受体 (例如 B 细胞受体) 下调; 和 B 细胞活化。“ADCC”是指表达 Fc 受体的细胞通过识别抗体的 Fc 段直接杀伤被抗体包被的靶细胞。可通过对 IgG 上 Fc 段的修饰, 降低或消除抗体的 ADCC 效应功能。所述的修饰指在抗体的重链恒定区进行突变, 如选自 IgG1 的 N297A、L234A、L235A、P329G; IgG2/4chimera, IgG4 的 F234A/L235A 突变。“CDC”是指通过使补体成分 C1q 与抗体 Fc 结合来激活补体级联的细胞毒性形式。检测抗体的 ADCC、CDC 活性的方法是本领域已知的, 例如可通过测定待测抗体与 Fc 受体 (例如 C1q) 之间的结合活性来评价 CDC。

“Fc 受体”或“FcR”描述结合抗体 Fc 区的受体。优选的 FcR 是人 FcR。此外, 优选的 FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR (γ 受体), 且包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体, 包括这些受体的等位基因变体和选择性剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA (“激活受体”) 和 Fc γ RIIB (“抑制受体”), 它们具有主要在其胞质结构域中不同的相似氨基酸序列。激活受体 Fc γ RIIA 在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM)。抑制受体 Fc γ RIIB 在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM) (参见综述 M.Daeron, *Annu.Rev.Immunol.*15:203-234 (1997))。FcR 综述于 Ravetch 和 Kinet, *Annu.Rev.Immunol.*9:457-92(1991); Capel 等, *Immunomethods* 4:25-34(1994); 及 de Haas 等, *J.Lab.Clin.Med.*126:330-41 (1995) 中。本文的术语“FcR”涵盖了其他 FcR, 包括有待在将来鉴定的那些。该术语还包括负责将母体 IgG 转移至胎儿的新生儿受体 FcRn (Guyer 等, *J.Immunol.*117:587(1976) 和 Kim 等, *J.Immunol.*24:249 (1994))。

“特异性结合”、“选择性结合”是指抗体与预定的抗原上的表位结合。通常, 当使用重组人 IL-2 或其表位作为分析物并使用抗体作为配体, 在仪器中通过表面等离子体共振 (SPR) 技术测定时, 抗体以大约低于 10^{-7} M 或甚至更小的平衡解离常数 (K_D) 与预定的抗原或其表位结合, 并且其与预定抗原或其表位结合的亲和力是其与预定抗原 (或其表位) 或紧密相关的抗原之外的非特异性抗原 (如 BSA 等) 结合的亲和力的至少两倍。术语“识别抗原的抗体”在本文中可以与术语“特异性结合的抗体”互换使用。

“亲和力”在本文中用作两个分子 (例如抗体或其抗原结合片段与抗原) 之间的非共价相互作用的强度量度。术语“亲和力”用于描述单价相互作用 (固有活性)。两个分子之间的结合亲和力可通过确定解离常数 (KD) 来量化。可通过使用例如表面等离子体共振 (SPR) 方法 (Biacore) 测量复合物形成和解离的动力学来确定 KD。对应于单价复合物的结合和解离的速率常数分别被称为结合速率常数 k_a (或 k_{on}) 和解离速率常数 k_d (或 k_{off})。KD 通过方程 $K_D = k_d/k_a$ 与 k_a 和 k_d 有

关。解离常数的值可通过众所周知的方法直接确定，并且可通过方法例如 Caceci 等人（1984，Byte 9：340-362）中所述的那些甚至对于复杂混合物进行计算。例如，可使用双重过滤硝化纤维素滤器结合测定如 Wong&Lohman（1993，Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90：5428-5432）中公开的那种来确定 K_D 。评估抗体针对靶抗原的结合能力的其它标准测定是本领域已知的，包括例如 ELISA、蛋白质印迹、RIA 和流式细胞术分析、以及本文其它地方例举的其它测定。抗体的结合动力学和结合亲合力也可通过本领域已知的标准测定，例如表面等离子共振（SPR），例如通过使用 Biacore™ 系统或 KinExA 来评价。可通过比较各个抗体/融合蛋白的 K_D 值来比较与不同分子相互作用相关的结合亲合力，例如，不同抗体对于给定抗原的结合亲和力的比较。类似地，相互作用的特异性可通过确定和比较目的相互作用（例如抗体和抗原之间的特异性相互作用）的 K_D 值与非目的相互作用（例如已知不结合 IL-2 的对照抗体）的 K_D 值进行评价。在一些实施方案中，本披露的抗 IL-2 抗体能够与其靶结合的亲合力比它与另一种非 IL-2 分子结合的亲合力大至少 2 倍、10 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍、1,000 倍或 10,000 倍，这里不属于限制性定义。

“抑制”或“阻断”可互换使用，并涵盖部分和完全抑制/阻断这两者。抑制和阻断也旨在包括与抗 IL-2 抗体接触时，与未与抗 IL-2 抗体接触的 IL-2 相比，任何可测量的 IL-2 结合亲合力、促细胞增殖（例如 T 细胞）活性降低。

“同源性”或“同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100%的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源。一般而言，当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述融合蛋白，以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。本披露中，“药物组合物”和“制剂”并不互相排斥。

“有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定受试者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

“药学可接受的载体”或“药学可接受的赋形剂”包括当与活性成分组合时，允许该成分保留生物学活性并且不与受试者的免疫系统反应的任何材料。例子包

包括但不限于任何标准药物载体，例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳剂如油/水乳剂、和各种类型的润湿剂。在一些实施例中，用于气雾剂或肠胃外施用的稀释剂是磷酸盐缓冲盐水（PBS）或生理（0.9%）盐水。包含此类载体的组合物通过众所周知的常规方法配制。

“缓冲剂”指通过其酸-碱共轭组分的作用而耐受 pH 变化的缓冲剂。将 pH 控制在适当范围中的缓冲剂的例子包括醋酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸、草酸盐、乳酸盐、磷酸盐、枸橼酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。

“组氨酸缓冲剂”是包含组氨酸的缓冲剂。组氨酸缓冲剂的实例包括组氨酸-盐酸组氨酸，组氨酸-醋酸组氨酸，组氨酸-磷酸组氨酸，组氨酸-硫酸组氨酸等缓冲剂，优选组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂。组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂可由组氨酸与盐酸配制而成，或者由组氨酸与盐酸组氨酸配制而成。

“枸橼酸盐缓冲剂”是包括枸橼酸根离子的缓冲剂。枸橼酸盐缓冲剂的实例包括枸橼酸-枸橼酸钠、枸橼酸-枸橼酸钾、枸橼酸-枸橼酸钙、枸橼酸-枸橼酸镁等。优选的枸橼酸盐缓冲剂是枸橼酸-枸橼酸钠。

“琥珀酸盐缓冲剂”是包括琥珀酸根离子的缓冲剂。琥珀酸盐缓冲剂的实例包括琥珀酸-琥珀酸钠盐、琥珀酸-琥珀酸钾、琥珀酸-琥珀酸钙盐等。优选的琥珀酸盐缓冲剂是琥珀酸-琥珀酸钠盐。示例性的，所述的琥珀酸-琥珀酸钠可由琥珀酸与氢氧化钠配制而成，或由琥珀酸与琥珀酸钠盐配制而成。

“磷酸盐缓冲剂”是包括磷酸根离子的缓冲剂。磷酸盐缓冲剂的实例包括磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾、磷酸氢二钠-枸橼酸等。优选的磷酸盐缓冲剂是磷酸氢二钠-磷酸二氢钠。

“醋酸盐缓冲剂”是包括醋酸根离子的缓冲剂。醋酸盐缓冲剂的实例包括醋酸-醋酸钠、组氨酸-醋酸组氨酸、醋酸-醋酸钾、醋酸-醋酸钙、醋酸-醋酸镁等。优选的醋酸盐缓冲剂是醋酸-醋酸钠。

“冻干制剂”表示液体或溶液形式的药物组合物或液体或溶液制剂经真空冷冻干燥步骤之后获得的制剂或药物组合物。

本披露所述的药物组合物能够达到一种稳定的效果：其中的融合蛋白在贮藏后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性的药物组合物，优选地，药物组合物在贮藏后基本上保留其物理和化学稳定性以及其生物学活性。贮藏期一般基于药物组合物的预定保存期来选择。目前有多种测量蛋白质稳定性的分析技术，可测量在选定温度贮藏选定时间段后的稳定性。

稳定的制剂是在下述情况下没有观察到显著变化的制剂：在冷藏温度（2-8°C）保存至少 3 个月、优选 6 个月、更优选 1 年，且甚至更优选地多达 2 年。另外，稳定的液体制剂包括这样的液体制剂：其在包括 25°C 的温度保存包括 1 个月、3 个月或 6 个月在内的时段后表现出期望的特征。稳定性的典型的例子：通过

SEC-HPLC 测得，通常不超过约 10%、优选不超过约 5% 的融合蛋白发生聚集或降解。通过视觉分析，制剂是淡黄色近无色澄明液体或者无色澄明液体，或澄清至稍微乳白色。所述制剂的浓度、pH 和重量克分子渗透压浓度具有不超过 $\pm 10\%$ 变化，优选不超过 $\pm 5\%$ 的变化。所述制剂通常形成不超过约 10%、优选不超过约 5% 的聚集。

如果在目检颜色和/或澄清度后，或者通过 UV 光散射、尺寸排阻色谱法(SEC) 和动态光散射 (DLS) 测得，融合蛋白没有显示出显著的聚集增加、沉淀和/或变性，那么所述融合蛋白在药物制剂中“保留它的物理稳定性”。蛋白构象的变化可以通过荧光光谱法（其确定蛋白三级结构）和通过 FTIR 光谱法（其确定蛋白二级结构）来评价。

如果融合蛋白没有显示出显著的化学改变，那么所述融合蛋白在药物制剂中“保留它的化学稳定性”。通过检测和定量化学上改变的形式蛋白，可以评估化学稳定性。经常改变蛋白化学结构的降解过程包括水解或截短（通过诸如尺寸排阻色谱法和 CE-SDS 等方法来评价）、氧化（通过诸如与质谱法或 MALDI/TOF/MS 结合的肽谱法等方法来评价）、脱酰胺作用（通过诸如离子交换色谱法、毛细管等电聚焦、肽谱法、异天冬氨酸测量等方法来评价）和异构化（通过测量异天冬氨酸含量、肽谱法等来评价）。

如果融合蛋白在给定时间的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生物活性的预定范围内，那么所述融合蛋白在药物制剂中“保留它的生物活性”。

“施用”、“给予”和“处理”，当其应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“施用”、“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“施用”、“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当其应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂，例如包含本披露的任一种的药物组合物，所述患者具有一种或多种疾病症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如患者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本披露的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解每个目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域

域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验 (H 检验)、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定, 其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

在以上说明书中提出了本披露一种或多种实施方式的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本披露, 但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书, 本披露的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中, 除非上下文中有清楚的另外指明, 单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义, 本文使用的所有技术和科学术语都具有本披露所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本披露的优选实施方式。这些实施例不应以任何方式理解为限制本披露的范围, 本披露的范围由权利要求书限定。

实施例-融合蛋白

以下结合实施例用于进一步描述, 但这些实施例并非限制的范围。PCT/CN2021/076806 (优先权: CN202010107662.4) 通过援引完整收入本披露。

实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等, 分子克隆, 实验室手册, 冷泉港实验室; 当代分子生物学方法, Ausubel 等著, Greene 出版协会, Wiley Interscience, NY。未注明具体来源的试剂, 为市场购买的常规试剂。

实施例 1. 抗 IL-2 抗体的筛选

A) 人源天然噬菌体 Fab 库的筛选

将保存的天然库噬菌体悬液用 BSA 稀释封闭, 与磁珠 Dynabeads (M-280, invitrogen) 共孵育, 收集负筛孵育后的噬菌体。按照 Kingfisher 磁珠筛选系统方法 (Thermo Scientific) 对磁珠进行结合和清洗, 将 5% BSA 与磁珠孵育。用生物素标记的带有人 Fc 标签的 IL-2 (Sanyou Biopharmaceutical, GenBank Accession No: P60568-1) 包被封闭 Dynabeads, 将负筛后收集的噬菌体悬液与所述 Dynabeads 孵育, 并按照 Kingfisher 磁珠筛选系统方法进行结合和清洗。用胰酶洗脱噬菌体。洗脱后噬菌体溶液与生长对数期的大肠杆菌 SS320 细胞 (Sanyou Biopharmaceutical) 充分混合后, 37°C 静置孵育 30 min。将大肠杆菌 SS320 涂布在 2YT-Car⁺-Tet⁺平板上, 37°C 培养箱过夜培养。计算噬菌体输入、输出等, 刮板制备输入的噬菌体并进行 3 轮筛选。

B) ELISA 初筛能结合 IL-2 的表达了抗 IL-2 的 Fab 的单克隆噬菌体

挑选第 3 轮筛选获得的 2000 个克隆在 96 孔深孔板中培养过夜。离心取上清。将抗人 IgG (STAR161, Bio-rad) 用 PBS 稀释到 2 µg/mL, 包被 ELISA 板, 每孔加入 30 µL, 4°C 过夜。PBST (PBS, pH 7.4 + 0.1% Tween 20) 洗板 3 次。1% BSA

室温封闭 1 小时, PBST 洗板 3 次。加入离心后的上清 30 μ L, 室温 2 小时, PBST 洗板 3 次。将用生物素标记的带有人 Fc 标签的 IL-2 用 PBS 稀释到 2 μ g/mL 每孔加入 30 μ L, 室温 1 小时, PBST 洗板 3 次。加入 1:8000 稀释的二抗 NeutrAvidin-HRP 30 μ L, 室温 1 小时, PBST 洗板 9 次加入 30 μ L TMB 室温显色 5-10 分钟, 之后加入 30 μ L 2 M HCl 或者 H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪 OD 450 读取数据。最终获得 364 株具有特异序列的克隆。

C) ELISA 初筛能够阻断 IL-2 与 IL-2R β 结合的抗 IL-2 的 Fab

将上述 364 株克隆按照 1:1000 的比例接种到 50 mL 体积的 2YT-Car⁺-Tet⁺培养基中, 37°C 培养过夜。将菌液转移至 50 mL 离心管。常温条件下离心处理, 弃掉上清, 向其中加入 4°C 预冷的蛋白裂解液 (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 25 U/mL Bezonase 核酸酶 (Merck)) 0.5 mL, 冰上静置孵育 1 小时。4°C 条件下离心处理收集上清备用。

将 IL-2R β -Fc (CJ82, Novoprotein) (GenBank 登录 No: NP_000869.1) 用 PBS 稀释到 8 μ g/mL, 包被 ELISA 板, 每孔加入 30 μ L, 4°C 过夜。PBST 洗板 3 次。1% BSA 室温封闭 1 小时, PBST 洗板 3 次。将获得的 Fab 裂解液与用生物素标记的带有人 Fc 标签的 IL-2 (2.5 μ g/mL) 室温温育 1 小时后, 每孔加入 30 μ L, 室温 1 小时, PBST 洗板 3 次。加入 1:8000 稀释的二抗 NeutrAvidin-HRP 30 μ L, 室温 1 小时, PBST 洗板 9 次加入 30 μ L TMB 室温显色 5-10 分钟, 之后加入 30 μ L 2 M HCl 或者 H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪 OD 450 读取数据。

获得具有较强的阻断 IL-2 与 IL-2R β 结合能力的 6 个 Fab。这 6 个全人源抗体的重链和轻链可变区序列如表 1 所示, 不同编号系统的互补决定区 (CDR) 如表 2 所示。

表 1. 全人源抗 IL-2 抗体重链 (HCVR) 和轻链 (LCVR) 可变区序列

抗体编号	重链可变区 (VH)、轻链可变区 (VL) 氨基酸序列	序列编号
A2-22	VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHV VRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTTRDT STSTVYMESSLRSEDVAVYYCAREDWMEYEEYYGMD VWGQGTLLTVSS	SEQ ID No: 1
	VL EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVSNLYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYSCQYGGSPITFGQGRLEIK	SEQ ID No: 2
A3-21	VH EVQLLESGLGGLAQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSGITGTGYRTYYADSVKGRFTVSRDNR NTVYLQMNSLRADTAVYYCVRESGHYYGWFDWVGQ GTLTVSS	SEQ ID No: 3
	VL QSALTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQ QVPGTVPKLLIDGKGNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIT GLQAEDADYYCQSYDYMLSGSVVFGRTKLTVL	SEQ ID No: 4
B2-15	VH EVQLLESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHV VRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTTRDT TSTVYMESSLRSEDVAVYYCAREGNSSGYNAFDIWG QGTMTVTVSS	SEQ ID No: 5
	VL EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ	SEQ ID No: 6

		KPGQAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIK	
C2-53	VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLILSCAASGFTFDDYAMHWVR QAPGKGLEWVSGISWNSGSGISYADSVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDQLRWGTYYYGMD VWGQGTTVTVSS	SEQ ID No: 7
	VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSVSIWVAWYQQK PGKAPKLLIYKASSLERGVPTFRSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYHCQQYDTGATFGQGTKVEMK	SEQ ID No: 8
D2-60	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWV RQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTD TSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREYSSWYSGGMDV WGQGTTVTVSS	SEQ ID No: 9
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQK PGKVPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDVATYYCQKYDSAPFTFGQGRLEIK	SEQ ID No: 10
D3-68	VH	QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVR RAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLQSPYTYGSGVID YWGQGTTLVTVSS	SEQ ID No: 11
	VL	DIQLTQSPSTLSASVGDRTITCRASRAVSPWLAWYQHR PGQAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQQYRSYPFTFGPGTTVDIR	SEQ ID No: 12

表 2. 全人源抗 IL-2 抗体的重链和轻链互补决定区 (CDR) 序列

抗体 编号	CDR	Kabat 编号系统	Chothia 编号系 统	IMGT 编号系统	AbM 编号系统
A2-22	HCDR1	SYMH (SEQ ID No: 13)	GYTFTSY (SEQ ID No: 49)	GYTFTSYY (SEQ ID No: 85)	GYTFTSYMH (SEQ ID No: 121)
	HCDR2	IINPSGGSTSYA QKFQG (SEQ ID No: 14)	NPSGGS (SEQ ID No: 50)	INPSGGST (SEQ ID No: 86)	IINPSGGSTS (SEQ ID No: 122)
	HCDR3	EDWMEYEYY YGMDV (SEQ ID No: 15)	EDWMEYEYY YGMDV (SEQ ID No: 51)	AREDWMEYEY YYGMDV (SEQ ID No: 87)	EDWMEYEYY YGMDV (SEQ ID No: 123)
	LCDR1	RASQSVSNYY LA (SEQ ID No: 16)	RASQSVSNYY LA (SEQ ID No: 52)	QSVSNYY (SEQ ID No: 88)	RASQSVSNYY LA (SEQ ID No: 124)
	LCDR2	GASSRAT (SEQ ID No: 17)	GASSRAT (SEQ ID No: 53)	GA (SEQ ID No: 89)	GASSRAT (SEQ ID No: 125)
	LCDR3	QQYGSSPLT (SEQ ID No: 18)	QQYGSSPLT (SEQ ID No: 54)	QQYGSSPLT (SEQ ID No: 90)	QQYGSSPLT (SEQ ID No: 126)
A3-21	HCDR1	SYAMS (SEQ ID No: 19)	GFTFSSY (SEQ ID No: 55)	GFTFSSYA (SEQ ID No: 91)	GFTFSSYAMS (SEQ ID No: 127)

	HCDR2	GITGTGYRTYY ADSVKG (SEQ ID No: 20)	TGTGYR (SEQ ID No: 56)	ITGTGYRT (SEQ ID No: 92)	GITGTGYRTY (SEQ ID No: 128)
	HCDR3	ESGHYYGWFD S (SEQ ID No: 21)	ESGHYYGWFD S (SEQ ID No: 57)	VRESGHYYGW FDS (SEQ ID No: 93)	ESGHYYGWFD S (SEQ ID No: 129)
	LCDR1	TGSSSNIGAGY NVH (SEQ ID No: 22)	TGSSSNIGAGY NVH (SEQ ID No: 58)	SSNIGAGYN (SEQ ID No: 94)	TGSSSNIGAGY NVH (SEQ ID No: 130)
	LCDR2	GKGNRPS (SEQ ID No: 23)	GKGNRPS (SEQ ID No: 59)	GK (SEQ ID No: 95)	GKGNRPS (SEQ ID No: 131)
	LCDR3	QSYDYMLSGS VV (SEQ ID No: 24)	QSYDYMLSGS VV (SEQ ID No: 60)	QSYDYMLSGS VV (SEQ ID No: 96)	QSYDYMLSGS VV (SEQ ID No: 132)
B2-15	HCDR1	SYMH (SEQ ID No: 25)	GYTFTSY (SEQ ID No: 61)	GYTFTSYY (SEQ ID No: 97)	GYTFTSYMH (SEQ ID No: 133)
	HCDR2	IINPSGGSTSYA QKFQG (SEQ ID No: 26)	NPSGGS (SEQ ID No: 62)	INPSGGST (SEQ ID No: 98)	IINPSGGSTS (SEQ ID No: 134)
	HCDR3	EGNSSGYNA FDI (SEQ ID No: 27)	EGNSSGYNA FDI (SEQ ID No: 63)	AREGNSSGY NAFDI (SEQ ID No: 99)	EGNSSGYNA FDI (SEQ ID No: 135)
	LCDR1	RASQSVSSSYL A (SEQ ID No: 28)	RASQSVSSSYL A (SEQ ID No: 64)	QSVSSSY (SEQ ID No: 100)	RASQSVSSSYL A (SEQ ID No: 136)
	LCDR2	GASNRAT (SEQ ID No: 29)	GASNRAT (SEQ ID No: 65)	GA (SEQ ID No: 101)	GASNRAT (SEQ ID No: 137)
	LCDR3	QQYGSSPLT (SEQ ID No: 30)	QQYGSSPLT (SEQ ID No: 66)	QQYGSSPLT (SEQ ID No: 102)	QQYGSSPLT (SEQ ID No: 138)
C2-53	HCDR1	DYAMH (SEQ ID No: 31)	GFTFDDY (SEQ ID No: 67)	GFTFDDYA (SEQ ID No: 103)	GFTFDDYAMH (SEQ ID No: 139)
	HCDR2	GISWNSGSIGY ADSVKG (SEQ ID No: 32)	SWNSGS (SEQ ID No: 68)	ISWNSGSI (SEQ ID No: 104)	GISWNSGSIG (SEQ ID No: 140)
	HCDR3	DQLRWGTYYY YGMDV (SEQ ID No: 33)	DQLRWGTYYY YGMDV (SEQ ID No: 69)	AKDQLRWGTY YYYGMDV (SEQ ID No: 105)	DQLRWGTYYY YGMDV (SEQ ID No: 141)

	LCDR1	RASQSVSIWVA (SEQ ID No: 34)	RASQSVSIWVA (SEQ ID No: 70)	QSVSIW (SEQ ID No: 106)	RASQSVSIWVA (SEQ ID No: 142)
	LCDR2	KASSLER (SEQ ID No: 35)	KASSLER (SEQ ID No: 71)	KA (SEQ ID No: 107)	KASSLER (SEQ ID No: 143)
	LCDR3	QQYDTGAT (SEQ ID No: 36)	QQYDTGAT (SEQ ID No: 72)	QQYDTGAT (SEQ ID No: 108)	QQYDTGAT (SEQ ID No: 144)
D2-60	HCDR1	SYGIS (SEQ ID No: 37)	GYTFTSY (SEQ ID No: 73)	GYTFTSYG (SEQ ID No: 109)	GYTFTSYGIS (SEQ ID No: 145)
	HCDR2	WISAYNGNTN YAQKLQG (SEQ ID No: 38)	SAYNGN (SEQ ID No: 74)	ISAYNGNT (SEQ ID No: 110)	WISAYNGNTN (SEQ ID No: 146)
	HCDR3	EYSSWYSGGM DV (SEQ ID No: 39)	EYSSWYSGGM DV (SEQ ID No: 75)	AREYSSWYSG GMDV (SEQ ID No: 111)	EYSSWYSGGM DV (SEQ ID No: 147)
	LCDR1	RASQGISNYLA (SEQ ID No: 40)	RASQGISNYLA (SEQ ID No: 76)	QGISNY (SEQ ID No: 112)	RASQGISNYLA (SEQ ID No: 148)
	LCDR2	AASTLQS (SEQ ID No: 41)	AASTLQS (SEQ ID No: 77)	AA (SEQ ID No: 113)	AASTLQS (SEQ ID No: 149)
	LCDR3	QKYDSAPFT (SEQ ID No: 42)	QKYDSAPFT (SEQ ID No: 78)	QKYDSAPFT (SEQ ID No: 114)	QKYDSAPFT (SEQ ID No: 150)
D3-68	HCDR1	SYGIS (SEQ ID No: 43)	GYTFTSY (SEQ ID No: 79)	GYTFTSYG (SEQ ID No: 115)	GYTFTSYGIS (SEQ ID No: 151)
	HCDR2	WISAYNGNTN YAQKLQG (SEQ ID No: 44)	SAYNGN (SEQ ID No: 80)	ISAYNGNT (SEQ ID No: 116)	WISAYNGNTN (SEQ ID No: 152)
	HCDR3	DLQSPTYYYGS GVIDY (SEQ ID No: 45)	DLQSPTYYYGS GVIDY (SEQ ID No: 81)	ARDLQSPTYYY YGSGVIDY (SEQ ID No: 117)	DLQSPTYYYGS GVIDY (SEQ ID No: 153)
	LCDR1	RASRAVSPWL A (SEQ ID No: 46)	RASRAVSPWL A (SEQ ID No: 82)	RAVSPW (SEQ ID No: 118)	RASRAVSPWL A (SEQ ID No: 153)
	LCDR2	AASSLQS (SEQ ID No: 47)	AASSLQS (SEQ ID No: 83)	AA (SEQ ID No: 119)	AASSLQS (SEQ ID No: 155)
	LCDR3	QQYRSYPFT (SEQ ID No: 48)	QQYRSYPFT (SEQ ID No: 84)	QQYRSYPFT (SEQ ID No: 120)	QQYRSYPFT (SEQ ID No: 156)

实施例 2: 全长全人源抗 IL-2 抗体的制备

将实施例 1 中 6 个抗体的重链和轻链可变区与人 IgG1 重链恒定区和 kappa 或 lamda 链恒定区连接，构造形成全长全人源抗 IL-2 抗体。其中重链恒定区带有 L234A 和 L235A 突变（LALA 突变），用以去除抗体可能的 ADCC 功能。6 个抗体的全长序列如表 3 所示。

表 3. 全人源抗 IL-2 抗体的重轻链全长序列

抗体编号	重链全长（HC）和轻链全长（LC）氨基酸序列	序列编号
A2-22	HC <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTTRDTSTST</u> <u>VYMESSLRSEDVAVYYCAREDWMEYEEYYYGMDVWGQG</u> <u>TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE</u> <u>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL</u> <u>GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE</u> <u>AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK</u> <u>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD</u> <u>WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP</u> <u>SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT</u> <u>PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN</u> <u>HYTQKSLSLSPGK</u>	SEQ ID No: 157
	LC <u>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSNLYAWYQQK</u> <u>GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPDF</u> <u>AVYSCQQYGSSPLTFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL</u> <u>KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT</u> <u>EODSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPV</u> <u>TKSFNRGEC</u>	SEQ ID No: 158
A3-21	HC <u>EVQLLES GGGLAQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMSWVRQA</u> <u>PGKGLEWVSGITGTGYRTYYADSVKGRFTVSRDNSRNTVY</u> <u>LQMNSLRAEDTAVYYCVRESGHYYGWFDWSWGQGLTVTS</u> <u>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS</u> <u>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYI</u> <u>CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS</u> <u>VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV</u> <u>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE</u> <u>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL</u> <u>TNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD</u> <u>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK</u> <u>SLSLSPGK</u>	SEQ ID No: 159
	LC <u>QSALTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQ</u> <u>VPGTVPKLLIDGKGNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQ</u> <u>AEDEADYYCQSYDYM LSGSVVFGRGKLTVLGQPKANPT</u> <u>VTLPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV</u> <u>KAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV</u> <u>THEGSTVEKTVAPTECS</u>	SEQ ID No: 160
B2-15	HC <u>EVQLLES GA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQ</u> <u>APGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTV</u> <u>YMESSLRSEDVAVYYCAREGNSSGYNAFDIWGQGTMTV</u> <u>TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT</u> <u>VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ</u> <u>TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG</u> <u>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE</u> <u>LTNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL</u> <u>DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT</u> <u>QKSLSLSPGK</u>	SEQ ID No: 161

	LC	<u>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG</u> <u>QAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFA</u> <u>VYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK</u> <u>SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE</u> <u>QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT</u> <u>KSFNRGEC</u>	SEQ ID No: 162
C2-53	HC	<u>EVQLVESGGGLVQPGRSLILSCAASGFTFDDYAMHWVRQA</u> <u>PGKGLEWVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYL</u> <u>QMNSLRAEDTALYYCAKDQLRWGTYYYYGMDVWGQGT</u> <u>TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG</u> <u>TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA</u> <u>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF</u> <u>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW</u> <u>LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS</u> <u>RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTT</u> <u>PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH</u> <u>YTQKSLSLSPGK</u>	SEQ ID No: 163
	LC	<u>DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSVSIWVAWYQQKPG</u> <u>KAPKLLIYKASSLERGVPTFRSGSGSGTEFTLTISLQPEDFA</u> <u>TYHCQQYDTGATFGQGTKEVMKRTVAAPSVFIFPPSDEQL</u> <u>KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT</u> <u>EQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV</u> <u>TKSFNRGEC</u>	SEQ ID No: 164
D2-60	HC	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQ</u> <u>APQGQLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTST</u> <u>AYMELRSLRSDDTAVYYCAREYSSWYSGGMDVWGQGT</u> <u>TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG</u> <u>TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA</u> <u>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF</u> <u>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW</u> <u>LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS</u> <u>RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTT</u> <u>PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH</u> <u>YTQKSLSLSPGK</u>	SEQ ID No: 165
	LC	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPG</u> <u>KVPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVA</u> <u>TYYCQKYDSAPFTFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK</u> <u>SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE</u> <u>QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT</u> <u>KSFNRGEC</u>	SEQ ID No: 166
D3-68	HC	<u>QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRR</u> <u>APQGQLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTA</u> <u>YMELRSLRSDDTAVYYCARDLQSTYYYGSGVIDYWGGQ</u> <u>TLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE</u> <u>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL</u> <u>GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE</u> <u>AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK</u> <u>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD</u> <u>WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP</u> <u>SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTT</u> <u>PPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN</u> <u>HYTQKSLSLSPGK</u>	SEQ ID No: 167

	LC	DIQLTQSPSTLSASVGDRVITISCRASRAVSPWLAWYQHRPG QAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQYRSYPFTFGPGTTVDIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLK <u>SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE</u> <u>QDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT</u> <u>KSFNRGEC</u>	SEQ ID No: 168
--	----	---	-------------------

(注：HC 的下划线部分为人 IgG1 重链恒定区，LC 的下划线部分为 kappa 链恒定区)

合成上述序列，用 BamHI 和 XhoI 消化后，通过 BamHI/XhoI 酶切位点插入到 pcDNA3.1 表达载体 (Life Technologies Cat. No. V790-20) 中。将表达载体和转染试剂 PEI (Polysciences, Inc. Cat. No. 23966) 以 1:2 的比例转染 HEK293 细胞 (Life Technologies Cat. No. 11625019)，并置于 CO₂ 孵育箱中孵育 4-5 天。表达的抗体通过离心回收后，按常规方法进行抗体纯化，经鉴定，得到本披露的全长全人源抗体。

实施例 3: 抗 IL-2 抗体能阻断或降低 IL-2 与 IL-2R α 结合，能阻断 IL-2 和 IL-2R β 结合的 ELISA 实验

A) 抗体阻断或降低 IL-2 与 IL-2R α 结合的 ELISA 实验

将 IL-2R α -Fc (CJ78, Novoprotein) (Accession # NP_000408) 用 PBS 稀释到 0.5 μ g/ mL，包被 ELISA 板，每孔加入 30 μ L，4 $^{\circ}$ C 过夜。PBST 洗板 3 次。1% BSA 室温封闭 1 小时，PBST 洗板 3 次。将抗 IL-2 抗体用 PBS，pH7.4 做浓度梯度稀释至 10 μ g/mL，5 μ g/mL，2.5 μ g/mL，1.25 μ g/mL，0.63 μ g/mL，0.31 μ g/mL，0.16 μ g/mL，0.08 μ g/mL，分别与用生物素标记的带有人 Fc 标签的 IL-2 (终浓度 1 μ g/mL) 室温温育 15 分钟后，每孔加入 30 μ L，室温 1 小时，PBST 洗板 3 次。加入 1:6000 稀释的二抗 NeutrAvidin-HRP 30 μ L，室温 1 小时，PBST 洗板 9 次。加入 30 μ L TMB 室温显色 5-10 分钟，之后加入 30 μ L 2 M HCl 或者 H₂SO₄ 终止反应，酶标仪 OD 450 读取数据。

结果如图 1A 所示。结果显示，C2-53、D3-68 和 A3-21 可以完全阻断 IL-2 与 IL-2R α 的结合，其余克隆在 10 μ g/mL 高浓度下可能仅有微弱的阻断 (即降低) IL-2 与 IL-2R α 结合的能力。各个抗体的 IC₅₀ 如表 4。

表 4. 抗 IL-2 抗体阻断 IL-2 与 IL-2R α 的结合的 IC₅₀

抗体编号	IC ₅₀ (μ g/mL)
A2-22	N.A.
A3-21	1.456
B2-15	N.A.
C2-53	0.6591
D2-60	N.A.
D3-68	1.196

(注：N.A.：由于阻断效果较弱，无法拟合曲线获得有意义的 IC₅₀。)

B) 抗体阻断 IL-2 与 IL-2R β 结合的 ELISA 实验

将 IL-2R β -Fc (CJ82, Novoprotein) 用 PBS 稀释到 8 μ g/mL, 包被 ELISA 板, 每孔加入 30 μ L, 4°C 过夜。PBST 洗板 3 次。1% BSA 室温封闭 1 小时, PBST 洗板 3 次。将抗 IL-2 抗体用 PBS, pH7.4 做浓度梯度稀释至 10 μ g/mL, 5 μ g/mL, 2.5 μ g/mL, 1.25 μ g/mL, 0.63 μ g/mL, 0.31 μ g/mL, 0.16 μ g/mL, 0.08 μ g/mL, 分别与用生物素标记的带有人 Fc 标签的 IL-2 (终浓度 5 μ g/mL) 室温温育 15 分钟后, 每孔加入 30 μ L, 室温 1 小时, PBST 洗板 3 次。加入 1:6000 稀释的二抗 NeutrAvidin-HRP 30 μ L, 室温 1 小时, PBST 洗板 9 次。加入 30 μ L TMB 室温显色 5-10 分钟, 之后加入 30 μ L 2 M HCl 或者 H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪 OD 450 读取数据。

结果如图 1B 所示。其中, 所有抗体都可以完全阻断 IL-2 与 IL-2R β 的结合。各个抗体的 IC₅₀ 如表 5。

表 5. 抗 IL-2 抗体阻断 IL-2 与 IL-2R β 的结合的 IC₅₀

抗体编号	IC ₅₀ (μ g/mL)
A2-22	2.728
A3-21	3.475
B2-15	3.045
C2-53	1.441
D2-60	8.272
D3-68	2.134

实施例 4: 抗 IL-2 抗体阻断或降低 IL-2 与 IL-2R α 的结合, 阻断 IL-2 和 IL-2R β 结合的 Octet 实验

A) 抗体阻断或降低 IL-2 与 IL-2R α 结合的 Octet 实验

将 Streptavidin 生物传感器 (Fortebio, #18-5020) 浸泡在 200 μ L 的 KB 缓冲液 (PBS, pH 7.4, 0.05% tween-20, 0.1% BSA) 中 60 秒, 进行湿润处理。然后, 用 KB 缓冲液将生物素化的 IL-2R α -Fc (CJ78, Novoprotein) 稀释到 10 μ g/mL, 将传感器置于 200 μ L 该溶液中 150 秒。将传感器浸泡于 KB 缓冲液中 60 秒, 以洗脱多余的 IL-2R α 。将 IL-2-His (CX66, Novoprotein) 与抗 IL-2 抗体混合, 并以 KB 缓冲液稀释至终浓度分别为 100 nM 和 500 nM, 室温温育 30 分钟。将传感器置于该混合溶液中结合 300 秒。抗 IL-2 抗体阻断或降低 IL-2 与 IL-2R α 结合的能力越强, 则读数越低。读取开始结合 230 秒时的数值, 如表 6 所示。

表 6. 抗 IL-2 抗体在 Octet 实验中阻断或降低 IL-2 与 IL-2R α 的结合

抗体编号	Octet 水平对 IL-2R α 阻断数值
C2-53	0.410
A3-21	0.428

D3-68	0.473
B2-15	0.700
D2-60	0.754
A2-22	0.848

B) 抗体阻断 IL-2 与 IL-2R β 结合的 Octet 实验

将 Streptavidin 生物传感器 (Fortebio, #18-5020) 浸泡在 200 μ L 的 KB 缓冲液 (PBS, pH 7.4, 0.05% tween-20, 0.1% BSA) 中 60 秒, 进行湿润处理。然后, 用 KB 缓冲液将生物素化的 IL-2-Fc (Sanyou Biopharmaceutical) 稀释到 10 μ g/mL, 将传感器置于 200 μ L 该溶液中 300 秒。将传感器浸泡于 KB 缓冲液中 60 秒, 以洗脱多余的 IL-2。将抗 IL-2 抗体以 KB 缓冲液稀释至终浓度 500 nM, 将传感器置于抗体溶液中结合 300 秒。将传感器浸泡于 KB 缓冲液中 60 秒, 以洗脱多余的抗 IL-2 抗体。将 IL-2R β -Fc (CJ82, Novoprotein) 以 KB 缓冲液稀释至终浓度 8000 nM, 将传感器置于抗体溶液中结合 300 秒。抗 IL-2 抗体阻断 IL-2 与 IL-2R β 结合的能力越强, 则读数越低。读取在 IL-2R β -Fc 开始结合 230 秒时的数值, 如表 7 所示。

表 7. 抗 IL-2 抗体在 Octet 实验中阻断 IL-2 与 IL-2R β 的结合

抗体编号	Octet 水平对 IL-2R β 阻断数值
A3-21	0.003
C2-53	0.017
D3-68	0.027
A2-22	0.042
B2-15	0.056
D2-60	0.086

实施例 5: 抗 IL-2 抗体与 IL-2 的结合 ELISA 实验

将抗人-IgG (STAR161, Bio-rad) 用 PBS 稀释到 2 μ g/mL, 包被 ELISA 板, 每孔加入 30 μ L, 4°C 过夜。PBST 洗板 3 次。1% BSA 室温封闭 1 小时, PBST 洗板 3 次。将抗 IL-2 抗体用 PBS 梯度稀释到 20 μ g/mL, 10 μ g/mL, 5 μ g/mL, 2.5 μ g/mL, 1.25 μ g/mL, 0.625 μ g/mL, 0.3125 μ g/mL, 0.15625 μ g/mL, 加 30 μ L 抗体到 ELISA 板中, 室温 1 小时, PBST 洗板 3 次。将用生物素标记的带有人 Fc 标签的 IL-2 (Sanyou Biopharmaceutical) 用 PBS 稀释到 2 μ g/mL 每孔加入 30 μ L, 室温 1 小时, PBST 洗板 3 次。加入 1:6000 稀释的二抗 NeutrAvidin-HRP 30 μ L, 室温 1 小时, PBST 洗板 9 次加入 30 μ L TMB 室温显色 5-10 分钟, 之后加入 30 μ L 2 M HCl 或者 H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪 OD 450 读取数据。结果如图 2 和表 8 所示。结果显示, 在该实验方法下, 所有抗体均与 IL-2 有结合, 其中 C2-53 结合较强。

表 8. 抗 IL-2 抗体与 IL-2 结合的 EC₅₀

抗体编号	EC ₅₀ (μ g/mL)
A2-22	1.289
A3-21	1.350

B2-15	2.117
C2-53	0.7301
D2-60	1.428
D3-68	1.205

实施例 6: 抗 IL-2 抗体与 IL-2 的亲合力和动力学 Biacore 实验

用 Biacore 仪器(Biacore T200, GE)的 Protein A 传感芯片(GE, Cat# 29127556)捕获抗体, 其中抗 IL-2 抗体用 1×HBS-EP 稀释至 1 $\mu\text{g/mL}$, 以 10 $\mu\text{L/min}$ 的流速持续 30 秒。然后, 在芯片表面以 30 $\mu\text{L/min}$ 的流速流经一系列浓度梯度的 IL-2 (C013, Novoprotein), 结合持续 120 秒。解离流速 30 $\mu\text{L/min}$, 持续 300 秒, 实时检测反应信号, 获得结合和解离曲线。在每个循环解离完成后, 用 10 mM Gly-HCl pH 2.0 将芯片洗净再生。实验得到的数据以 1:1 结合模型进行拟合, 得出抗 IL-2 抗体与 IL-2 的结合力数值, 见表 9。结果显示, 所有抗体均与 IL-2 有结合, 亲合力跨度从 C2-53 的 0.267 nM 到 A2-22 的 39.8 nM 不等。

表 9. 抗 IL-2 抗体与 IL-2 的亲合力

抗体编号	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
C2-53	1.64E+07	4.37E-03	2.67E-10
D3-68	1.16E+07	5.46E-02	4.72E-09
D2-60	5.09E+05	6.51E-03	1.28E-08
B2-15	1.46E+06	4.48E-02	3.06E-08
A2-22	1.33E+06	5.27E-02	3.98E-08

实施例 7: 抗 IL-2 抗体与 IL-2 的非共价复合体对人外周血 PBMC 中 STAT5 磷酸化活性的测定

依据在不同浓度的抗 IL-2 抗体与 IL-2 非共价复合体处理下, 人外周血中各细胞群体(包括 Treg, CD4⁺T 细胞, CD8⁺T 细胞)中 STAT5 磷酸化水平, 检测抗体对 IL-2 活性的调节能力。

基础培养基: RPMI 1640 + 10% 胎牛血清。

抗体混合物: CD3 APC-Cy7 (BD 557832), CD4 BB515 (BD 564419), CD8 BB700 (BD 566452), CD25 BV421 (BD 564033), pSTAT5 AF647 (BD 562076)。

人 PBMC STAT5 磷酸化实验: 将新鲜分离的人 PBMC 细胞用基础培养基调整至 6.5×10^6 个细胞/mL 的密度, 取 80 μL 置于 96 孔板中。将不同浓度的抗 IL-2 抗体与不同浓度的 IL-2 室温预混 30 分钟, 取 20 μL 加入 90 μL PBMC 中, 37°C 刺激 20 分钟。之后立即用预热的 BD Cytotfix 缓冲液 (BD, Cat No. 554655) 在 37°C 固定细胞 15 分钟, 然后在冰上继续固定 15 分钟。400 g 4°C 离心 7 分钟。去除上清液, 用 150 μL PBS 洗涤一次。加入 150 μL 在 -20°C 预冷的 BD Phosflow Perm Buffer III (BD, Cat No. 558050) -20°C 破膜过夜。500 g 4°C 离心 7 分钟。去除上清液,

加入 150 μ L PBS, pH 7.4 洗涤两次。加入 100 μ L 按 1:200 稀释的 FcR 封闭剂, 在 4 $^{\circ}$ C 下温育 20 分钟。500 g 4 $^{\circ}$ C 离心 7 分钟。去除上清液, 加入 50 μ L 抗体混合物, 对细胞在 4 $^{\circ}$ C 染色 1 小时。500 g 4 $^{\circ}$ C 离心 7 分钟。去除上清液, 加入 200 μ L PBS, pH 7.4 洗涤一次, 用 150 μ L PBS, pH 7.4 重悬细胞, 用流式细胞仪(BD FACSCelesta)检测。CD8 $^{+}$ T 细胞定义为 CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ 的细胞, Treg 定义为 CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ CD8 $^{+}$ CD25 $^{+}$ 的细胞。

对上述两个细胞群的 pSTAT5 荧光数值 (MFI) 进行统计, 计算每个浓度下的数值与完全激活状态下的最大 pSTAT5 MFI 数值的百分比, 采用计算机程序或四参数回归算法进行拟合。结果如图 3A 至图 3H 所示。

结果表明, 随着抗体浓度增加, IgG1 同种型并不会对 IL-2 激活 Treg 和 CD8 $^{+}$ T 细胞的 pSTAT5 产生任何影响。相反, A3-21, C2-53 在很大的浓度范围内, 基本不影响 IL-2 对 Treg 的活性, 却在很大程度上降低了 IL-2 对 CD8 $^{+}$ T 细胞的活性。只有在高浓度下, 比如 100 nM A3-21 和 33.3 nM C2-53, IL-2 对 Treg 的活性有一定下降, 而在该条件下, IL-2 对 CD8 $^{+}$ T 细胞完全没有活性。也即, A3-21 和 C2-53 可以在不影响或较少的降低 IL-2 对 Treg 的活性的同时, 抑制或更多的降低 IL-2 对 CD8 $^{+}$ T 细胞等免疫效应细胞的活性。类似的, D3-68 也可以相对于 Treg 更多的降低 IL-2 对 CD8 $^{+}$ T 细胞的活性, 虽然这种能力可能不如 A3-21 和 C2-53 显著。

实施例 8: 融合蛋白的制备

抗 IL-2 抗体与 IL-2 的非共价复合体体内可能容易解离, 生成游离的 IL-2, 造成毒性。我们通过 (G₄S)₅ 连接臂 (即, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, SEQ ID No: 190) 将人 IL-2 偶联至抗 IL-2 抗体重链或轻链的 N 端, 得到 12 个抗 IL-2 抗体与 IL-2 的融合蛋白。

对于抗体编号, 若 IL-2 在抗体重链的 N 端, 则该融合蛋白带有后缀 a; 若 IL-2 在抗体轻链的 N 端, 则该融合蛋白带有后缀 b。

对于所融合的 IL-2, 其带有 T3A (即第 3 位氨基酸由 Thr 突变为 Ala) 的突变, 以去除可能的糖基化。人 IL-2 成熟蛋白不含有第 1 位的氨基酸 M, 因此编号从第 2 位的氨基酸 A 开始计数。12 个融合蛋白氨基酸序列如下:

表 10. 融合蛋白的全长序列

抗体编号	全长重链 (HC) 和全长轻链 (HL) 的氨基酸序列		序列编号
A2-22-a	HC	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQ SGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHVWRQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCAREDWMEYEEYGMVDVWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV	SEQ ID No: 169

		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	
	LC	SEQ ID No: 158	SEQ ID No: 158
A2-22-b	HC	SEQ ID No: 157	SEQ ID No: 157
	LC	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS PGTSLSPGERATLSCRASQSVSNNYLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYSCQ QYGSSPLTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	SEQ ID No: 170
A3-21-a	HC	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLAQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSGITGTGYRTYYADSVKGRFTVSRDNSRNTVYLQMNS LRAEDTAVYYCVRESGHYYGWFDSWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	SEQ ID No: 171
	LC	SEQ ID No: 160	SEQ ID No: 160
A3-21-b	HC	SEQ ID No: 159	SEQ ID No: 159
	LC	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSALTQP PSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYNVHWYQQVPGTVPK LLIDGKGNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADY YCQSYDYMLSGSVVFGRTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETT KPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS	SEQ ID No: 172
B2-15-a	HC	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYMHWRQAPGQGL EWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSL RSED TAVYYCAREGNSSGYNAFDIWGQGTMTVTVSSAST	SEQ ID No: 173

		KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	
	LC	SEQ ID No: 162	SEQ ID No: 162
B2-15-b	HC	SEQ ID No: 161	SEQ ID No: 161
	LC	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS PGTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IYGASNRATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	SEQ ID No: 174
C2-53-a	HC	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGRSLILSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSGYADSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNLSL RAEDTALYYCAKDQLRWGTYYYYGMDVWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	SEQ ID No: 175
	LC	SEQ ID No: 164	SEQ ID No: 164
C2-53-b	HC	SEQ ID No: 163	SEQ ID No: 163
	LC	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSTLSASVGDRTITCRASQSVSIWVAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLERGVPTFRSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYHCQQ YDTGATFGQGTKEVEMKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	SEQ ID No: 176
D2-60-a	HC	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQ	SEQ ID No: 177

		SGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLE WMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCAREYSSWYSGGMDVWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	
	LC	SEQ ID No: 166	SEQ ID No: 166
D2-60-b	HC	SEQ ID No: 165	SEQ ID No: 165
	LC	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQKPGKVPKLL IYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQ KYDSAPFTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	SEQ ID No: 178
D3-68-a	HC	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQ SGPEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRRAPGQGLE WMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCARDLQSPTYYYGSGVIDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	SEQ ID No: 179
	LC	SEQ ID No: 168	SEQ ID No: 168
D3-68-b	HC	SEQ ID No: 167	SEQ ID No: 167
	LC	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQS PSTLSASVGDRTISCRASRAVSPWLAWYQHRPGQAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YRSYPFTFGPGTTVDIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	SEQ ID No: 180

依照实施例 2 中的方法对上述 12 个融合蛋白进行表达和纯化, 表达量和在

SEC-HPLC 中的纯度如下表 11。

表 11. 融合蛋白的表达量和纯度

抗体编号	表达量 (mg/L)	纯度 (%)
A2-22-a	39	90.780
A2-22-b	104	96.308
A3-21-a	82	89.358
A3-21-b	2	82.095
B2-15-a	89	53.821
B2-15-b	70	99.839
C2-53-a	N.A.	54.940
C2-53-b	6	26.598
D2-60-a	2.4	40.248
D2-60-b	129	97.540
D3-68-a	0.3	N.A.
D3-68-b	106	100

结果显示, 对于不同抗 IL-2 抗体, IL-2 偶联在重链或轻链的 N 端, 会极大的影响融合蛋白的表达量和纯度。表达量或纯度低, 提示在融合蛋白中 IL-2 与抗体可能无法形成正常的分子内结合, 而是形成分子间结合, 从而引起蛋白质的聚集。挑选表达量 (至少 20 mg/L) 和纯度 (至少 90%) 较高的融合蛋白进行后续鉴定。

实施例 9: 融合蛋白与 IL-2R α 和 IL-2R β 结合的 Octet 实验

将 Protein A 生物传感器(Fortebio, #18-5010)浸泡在 200 μ L 的 KB 缓冲液(PBS, pH 7.4, 0.02% tween-20, 0.1% BSA)中 60 秒, 进行湿润处理。然后, 用 KB 缓冲液将融合蛋白稀释到 10 μ g/mL, 将传感器置于 200 μ L 该溶液中, 待读数为 1.2 nm 时停止。将传感器浸泡于 KB 缓冲液中 100 秒, 以洗脱多余的抗体-IL-2 融合蛋白。将 IL-2R α (ILA-H52H9, Acrobiosystem) 用 KB 缓冲液以 2 倍梯度稀释至 100 nM-3.125 nM 之间。将传感器置于该溶液中结合 60 秒。将传感器置于 KB 缓冲液中解离 60 秒。采用动态 1: 1 结合方式拟合, 则融合蛋白与 IL-2R α 的亲合力如表 12 所示。结果显示, 与 IL-2 相比, 偶联了抗 IL-2 抗体的 IL-2 与 IL-2R α 的结合均有减弱, 其中 A3-21-a, D3-68-b 完全不结合 IL-2R α 。

表 12. 融合蛋白与 IL-2R α 的亲合力

待测物	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	K _D (M)
IL-2	1.40E+06	2.51E-02	1.80E-08
A2-22-a	9.22E+05	3.75E-02	4.06E-08
A2-22-b	1.63E+06	4.13E-02	2.53E-08
A3-21-a	N.A.	N.A.	不结合
B2-15-b	1.23E+06	3.30E-02	2.68E-08
D2-60-b	1.24E+06	5.61E-02	4.51E-08
D3-68-b	N.A.	N.A.	不结合

（注：N.A.：不结合，所以无法拟合得到数值。其中 IL-2 与 IL-2R α 的亲合力实验，IL-2R α 作为固定相，IL-2 作为流动相）。

与上述方法类似，用 Octet 采用稳态模式拟合数据，测得抗体-IL-2 融合蛋白与 IL-2R β （CD2-H5221，Acrobiosystem）的亲合力如表 13 所示。其中，抗体融合蛋白作为固定相，IL-2R β 作为流动相。结果显示，与 IL-2 相比，偶联了抗 IL-2 抗体的 IL-2 绝大多数完全不结合，个别抗体-IL2 融合蛋白，如 D3-68-b 与 IL-2R β 的结合减弱，但仍然有一定程度的结合。其中 IL-2 与 IL-2R β 的亲合力实验，IL-2R β 作为固定相，IL-2 作为流动相。

表 13. 抗 IL-2 抗体与 IL-2 融合蛋白与 IL-2R β 的亲合力

待测物	KD (nM)
IL-2	4.6E-07
A2-22-a	不结合
A2-22-b	不结合
A3-21-a	不结合
B2-15-b	不结合
D2-60-b	不结合
D3-68-b	1.1E-06

实施例 10：融合蛋白对人外周血（PBMC）STAT5 磷酸化活性的测定

依照实施例 7 中的方法，测定融合蛋白对人外周血（PBMC）中 Treg 和 CD8⁺ T 细胞中的 STAT5 磷酸化活性。如图 4A 至图 4D 所示，实验结果显示，相比 IL-2，所有融合蛋白对 Treg 和 CD8⁺ T 细胞的活性均有所降低。但是对于 A2-22-a，A2-22-b，B2-15-b，D2-60-b，A3-21-b，这些融合蛋白对 CD8⁺ T 细胞的活性降低相比对 Treg 的活性降低更多，提示了这些融合蛋白中的 IL-2 可以更偏向于激活 Treg。

而对于 D3-68-b，其对 Treg 的活性降低相比对 CD8⁺ T 细胞的活性降低更多（图 4C 和图 4D 所示）。融合蛋白激活 Treg 和 CD8⁺ T 细胞中 pSTAT5 的 EC₅₀ 如表 14 和表 15 所示。

表 14. 融合蛋白激活 Treg 细胞中 pSTAT5 的 EC₅₀

待测物	EC ₅₀ (nM)
IL-2	0.0003714
A2-22-a	0.04439
A2-22-b	0.05677
B2-15-b	0.01072
D2-60-b	0.1940
D3-68-b	0.1731
A3-21-a	0.1923

表 15. 融合蛋白激活 CD8⁺ T 细胞中 pSTAT5 的 EC₅₀

待测物	EC ₅₀ (nM)
IL-2	0.4343
A2-22-a	N.A.
A2-22-b	N.A.
B2-15-b	N.A.
D2-60-b	N.A.
D3-68-b	31.06
A3-21-a	N.A.

(注: N.A.: 在最高测试浓度下数值依然低, 无法拟合获得准确 EC₅₀)。

实施例 11: 融合蛋白对 Balb/c 小鼠外周血免疫细胞影响的测定

BALB/c 小鼠 (购自北京 Charles River 实验动物技术有限公司), 雌性, 6-8 周龄, 体重 18-20g, 在正式实验前, 适应性饲养 5 天。所有的 BALB/c 小鼠饲养于 SPF 级动物房 IVC 恒温恒压系统中, 其中温度 20 至 26 °C, 湿度 40 至 70 %, 光照周期 12 小时明/12 小时暗。每个笼盒内饲养不多于 6 只 BALB/c 小鼠。小鼠按照体重进行分组, 分组后开始给药, 给药种类、给药剂量和给药途径见表 16。模型分组当天为第 0 天。

表 16.小鼠给药方案

组别	N	治疗	给药剂量 (mg/kg)	给药途径	给药时间
1	3	A2-22-b	0.7	皮下	单次给药
2	3	B2-15-b	0.7	皮下	单次给药
3	3	D2-60-b	0.7	皮下	单次给药

每个时间点新鲜采集的抗凝血用红细胞裂解液裂解红细胞, PBS 洗一次。用含有 1% FBS 的 PBS 配制混合染色液。混合染色液包括 CD3 APC-Cy7 (Biolegend 100329)、CD8 PE (Biolegend 100708)、CD4 PE-Cy7 (eBioscience 25-0042-82)、CD25 PerCP-Cy5.5 (BD 561112)。每个样本加入 100 μL 混合染色液, 4 度温育 30 分钟。用含有 1% FBS 的 PBS 洗两次。用 True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set(Biolegend 424401)进行固定破膜 60 分钟, 100 μL 抗小鼠 Foxp3 抗体(Biolegend 126405)和抗小鼠 Ki67 抗体 (eBioscience, 25-5698-82) 室温孵育 60 分钟。用 PBS (pH 7.4) 洗两次, 最后用 500 μLPBS, pH 7.4 洗液重悬, 上机分析。其中, CD8⁺ T 细胞定义为 CD3⁺CD4⁺CD8⁺的细胞, Treg 定义为 CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺的细胞。

实验结果如图 5A 至图 5F 所示。对于 A2-22-b, B2-15-b, D2-60-b, 与第 0 天相比, 小鼠全血中 Treg 占 CD4⁺ T 细胞的百分比从第 2 天开始上升, Treg 中 Ki67+

的百分比也从第 2 天开始显著上升，表明 A2-22-b，B2-15-b，D2-60-b 可以强烈刺激 Treg 的增殖。相反，对于 CD4⁺CD25⁻ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞，Ki67⁺的百分比则几乎没有变化或变化较小，CD8⁺ T 细胞占 CD3⁺ T 细胞的百分比也几乎未变，说明 A2-22-b，B2-15-b，D2-60-b 几乎不活化 CD8⁺ T 细胞。

实施例 12：融合蛋白对接受鸡卵清蛋白 OVA 免疫的 Balb/c 小鼠的脾脏免疫细胞的影响的测定

鸡卵清蛋白（OVA），Sigma A5503，使用 PBS 溶解，配制成 0.5mg/mL。弗氏完全佐剂（CFA，含灭活结核分枝杆菌 1mg/mL），Sigma，F5881。雄性 C57B16/J 小鼠（购自上海实验动物中心），6-8 周龄，体重 18-20g。小鼠按照体重进行分组，实验第 1 天，取 OVA 溶液 8mL，与 8mL CFA 混匀、乳化呈油包水状态。每只动物腹腔注射 200μL 进行免疫。分别于第 3 天和第 8 天，各组小鼠皮下注射（sc）待测融合蛋白和 PBS 对照 10mL/kg。给药种类、给药剂量和给药途径见表 17。

表 17.小鼠免疫方案

组号	数量	免疫	待测物	给药方式	给药剂量（mpk）	给药时间
1	4	OVA (50μg)	PBS	皮下	NA	第 3 和 8 天
2	4	OVA (50μg)	A2-22-b	皮下	0.7	第 3 和 8 天
3	4	OVA (50μg)	B2-15-b	皮下	0.7	第 3 和 8 天
4	4	OVA (50μg)	D2-60-b	皮下	0.7	第 3 和 8 天

第 10 天时，小鼠安乐死，取脾脏处理后流式细胞仪检测相关免疫细胞。方法包括：75%乙醇浸泡 5 分钟后在无菌条件下取出小鼠脾脏，PBS 漂洗 1-2 次后，将小鼠脾脏剪碎。将过滤网置于 50 mL 离心管中，将脾脏组织碎片转移到筛网上，研磨，过程中不断加入新鲜的 PBS。1800 转/分钟离心 3 分钟，弃上清。加入 10 mL 红细胞裂解液冰上静置 5 分钟后加入 PBS 终止裂解，1800 转/分钟离心 3 分钟两次。根据 BioLegend 流式抗体染色步骤进行染色后，将细胞用 PBS 重悬离心两次，过筛，进行流式细胞检测。

检测细胞及其标记物如下：

脾脏生殖中心 B 细胞（GCB，Germinal Center B cells）（Fas+GL-7+B220+）；

卵泡辅助性 T 细胞（Tfh，follicular T helper cells）（PD1 高，CXCR5 高，FOXP3-CD4+）；

卵泡调节性 T 细胞（Tfr，follicular regulatory T cells）（PD1 高，CXCR5 高，FOXP3+CD4+）；

调节性 T 细胞 Treg 细胞（FOXP3+CD25+CD4+CXCR5 低）；

实验结果如图 6 所示。A2-22-b，B2-15-b，D2-60-b 均可以刺激脾脏中的 Treg 和 Tfr 增殖，抑制脾脏中的 Tfh 和 GCB 数量，表明 A2-22-b，B2-15-b，D2-60-b 具有通过激活 Treg 抑制免疫系统的作用。

实施例 13：融合蛋白在小鼠延迟性过敏反应模型中的药效实验

实验方法：取 2，4 二硝基氟苯（DNFB，Sigma，42085-50G），用丙酮：橄榄油=4：1 溶解，配制成 1%（1g/100mL）溶液备用，另稀释成 0.5%（0.5g/100mL）溶液备用。雄性 ICR 小鼠（购自上海实验动物中心），6 周周龄，体重 18-20g。小鼠按照体重进行分组。实验第 0 天，小鼠腹部涂抹 1%的 DNFB 溶液 50 μL 免疫，实验第 5 天时，小鼠右耳内外侧分别涂抹 0.5%的 DNFB 溶液 10 μL（共 20 μL）进行激发，分别于实验第 6 天使用 8mm 直径打孔器取下左侧和右侧耳朵组织称重，并计算左、右两侧耳朵组织重量的差值。待测药从实验开始前 2 天（第-2 天）开始，每 5 天皮下给药 1 次。

给药种类、给药剂量和给药途径见表 18。

表 18.小鼠免疫方案

组号	数量	待测物	剂量 (mpk)	给药方式	给药时间
1	5	PBS	NA	皮下	第-2 和 3 天
2	5	A2-22-b	1	皮下	第-2 和 3 天
3	5	A2-22-b	0.3	皮下	第-2 和 3 天
4	5	A2-22-b	0.1	皮下	第-2 和 3 天
5	5	B2-15-b	1	皮下	第-2 和 3 天
6	5	B2-15-b	0.3	皮下	第-2 和 3 天
7	5	B2-15-b	0.1	皮下	第-2 和 3 天
8	5	D2-60-b	1	皮下	第-2 和 3 天
9	5	D2-60-b	0.3	皮下	第-2 和 3 天
10	5	D2-60-b	0.1	皮下	第-2 和 3 天

实验结果如图 7 所示。A2-22-b，B2-15-b，D2-60-b 均可以降低耳朵肿胀程度，并呈现剂量效应，表明 A2-22-b，B2-15-b，D2-60-b 具有抑制免疫系统的作用。

实施例 14：融合蛋白在小鼠关节炎模型中的药效实验

雄性 DBA/1 纯系小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司。关节炎模型由牛 II 型胶原（Biolead，20022）免疫诱发。实验第 0 天，取 2.5 mL 牛 II 胶原/冰乙酸（2mg/mL）中，再与 2.5 mL 完全弗氏佐剂充分混悬，成油包水乳状，取 0.1 毫升在乙醚轻麻醉下于每个小鼠的尾根部皮内注射，3 周后加强注射一次。造模动物随机分为 6 组，分别为：正常对照组，造模型组，IL-2（C013，novoprotein）组、A2-22-b 组、B2-15-b 组，每组各 8 只。同时选用正常对照动物作为正常对照组，

分组见表 19。

表 19.小鼠免疫方案

组号	组别	动物数 (只)	给药剂量 (mg/kg)	给药频率	给药方式	给药体积 (mL/kg)
1	正常对照组	8	-	Q5D x 14 天	i.p.	-
2	模型对照组	8	-	Q5D x 14 天	i.p.	-
3	IL-2 组	8	100000IU	Q2D x 14 天	s.c.	5
4	A2-22-b 组	8	0.7	Q5D x 14 天	i.p.	5
5	B2-15-b 组	8	0.7	Q5D x 14 天	i.p.	5

(注：Q5D，每五天一次；Q2D，每两天一次；i.p.，腹腔给药；s.c.，皮下给药。)

关节炎症评价：小鼠从二次免疫开始，每 3 天进行称重和关节炎病情严重程度半定量计分 (clinical scores)：

- 0 分：无红肿；
- 1 分：在爪上有一处红肿炎症；
- 2 分：整爪上有轻微炎症或者有两处及以上红肿；
- 3 分：整爪上有中度红肿；
- 4 分：整个爪上有严重红肿甚至关节僵硬、畸形及活动障碍。

每只爪最高得分 4 分，每只鼠最高得分 16 分。关节炎病情观察一直持续到实验结束。

血清抗牛 II 型胶原抗体浓度检测：实验结束时，收集血，分离血清，-80℃ 保存。采用 ELISA 检测试剂盒 (Chondrex, 20322T) 检测血清中抗牛 II 型胶原抗体的水平。具体步骤按说明书进行。

实验结果如图 8A 和图 8B 所示。和正常对照组相比，模型对照组小鼠体重明显下降，关节炎评分显著升高 ($p<0.001$)；和模型对照组相比，B2-15-b 可显著抑制关节炎造模小鼠体重减轻，可显著降低关节炎评分 ($p<0.05$)。和正常对照组相比，模型对照组血清抗牛 II 型胶原 IgG2a 抗体的浓度显著增加 ($p<0.001$)；和模型对照组相比，B2-15-b 给药可显著下调关节炎小鼠血清抗牛 II 型胶原 IgG2a 抗体的分泌 ($p<0.01$)。

实施例 15：不同连接臂长度对融合蛋白表达量和纯度的影响

将 B2-15-b 中 IL-2 与抗 IL-2 抗体 B2-15 轻链之间的 (G₄S)₅ 连接臂缩短 G4S 的重复次数至 4 次，而重链保持不变，获得 B2-15-b 的变体 B2-15-b- (G₄S)₄，其

轻链序列如表 20。

表 20. 融合蛋白中抗体的全长轻链序列

融合蛋白编号	全长轻链氨基酸序列		序列编号
B2-15-b-(G ₄ S) ₄	LC	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSL SPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP LTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID No: 181

按照实施例 2 中的方法对上述 B2-15-b 的变体进行表达和纯化, 仍可以达到表达量 47 mg/L, SEC-HPLC 纯度为 99%。证明不同连接臂长度能实现融合蛋白的表达。

实施例 16: 抗 IL-2 抗体与不同 IL-2 变体之间的融合蛋白对人外周血 (PBMC) STAT5 磷酸化活性的测定

将 IL-2 进行突变, 引入 T3E, 或 T3Q, 或去除 IL-2 N 端前 3 个氨基酸 (B2-15-b-Del3), 或去除 IL-2 N 端前 7 个氨基酸 (B2-15-b-Del7), 或直接使用野生型 IL-2, 分别与抗 IL-2 抗体进行偶联。产生如下融合蛋白 (每一个抗体的重链序列保持不变), 见表 21。

表 21. 融合蛋白中抗体的轻链全长序列

融合蛋白编号	全长轻链氨基酸序列		序列编号
B2-15-b-T3E	LC	APESSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQS IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLS LSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLT FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID No: 182
B2-15-b-WT (野生型 IL-2)	LC	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQS IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLS LSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLT FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID No: 183
B2-15-b-T3Q	LC	APQSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQS	SEQ ID No: 184

		IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTL LSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLT FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
B2-15-b- Del3	LC	SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTL TGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSP GERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFG GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID No: 185
B2-15-b- Del7	LC	KKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLTG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGE RATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASN RATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID No: 186
A2-22-b- Del3	LC	SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTL TGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSP GERATLSCRASQSVSNYYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGDFTLTISRLEPEDFAVYSCQQYGSSPLTFG QGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID No: 187
D2-60-b- Del3	LC	SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTL TGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLTQSG VPSRFSGSGSGDFTLTISLQPEDVATYYCQKYDSAPFTFGQ GTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID No: 188
D2-60-b- T3E	LC	APESSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQS IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAAS LTQSGVPSRFSGSGSGDFTLTISLQPEDVATYYCQKYDSAPF TFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 189

依照实施例 7 中的方法, 测定上述抗 IL-2 抗体与 IL-2 变体的融合蛋白对人外周血 (PBMC) 中 Treg 和 CD8⁺ T 细胞中的 STAT5 磷酸化活性。如图 9A 至图 9F、表 22 所示, 实验结果显示, 这些 IL-2 变体基本不影响抗体融合蛋白对 Treg 和 CD8⁺

T 细胞的活性。这些融合蛋白依然更偏向于激活 Treg，而不是 CD8⁺ T 细胞。

表 22. 抗 IL-2 抗体与不同 IL-2 变体的融合蛋白激活 Treg 细胞中 pSTAT5 的 EC₅₀

融合蛋白编号	EC ₅₀ (nM)
A2-22-b	0.168
A2-22-b-Del3	0.144
B2-15-b	0.016
B2-15-b-T3E	0.031
B2-15-b-WT	0.041
B2-15-b-T3Q	0.029
B2-15-b-Del3	0.038
B2-15-b-Del7	0.055
D2-60-b	0.114
D2-60-b-Del3	0.229
D2-60-b-T3E	0.168

实施例 17: 融合蛋白在 MRL/lpr 自发性红斑狼疮小鼠模型中的药效实验

雌性 BALB/c 小鼠和雌性 MRL/lpr 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司 (Shanghai SLAC Laboratory Animal Co.,Ltd)。以雌性 BALB/c 小鼠为正常对照，雌性 MRL/lpr 小鼠按蛋白尿水平及体重随机分为 3 组，分别为：MRL/lpr 对照组（模型对照组），1 和 3 mg/kg 给药组。D2-60-b-T3E 经皮下注射给药，每 3 天给药一次，剂量为 1、3 mg/kg；8 周龄时开始给药，连续给药 8 周。

表 23. 实验设计与分组

小鼠	组别	给药剂量 (mg/kg)	给药频率	给药方式	动物数 (只)
正常 Balb/c	正常对照组	-	每 3 天 1 次	sc.	10
MRL/lpr	模型对照组	-	每 3 天 1 次	sc.	10
	D2-60-b-T3E 给药组	1	每 3 天 1 次	sc.	10
		3	每 3 天 1 次	sc.	10

给药期间，每两周测定各组小鼠尿蛋白含量；连续 8 周给药结束后进行如下检测：①测定各组小鼠血清中抗双链 DNA 的 IgM 和 IgG 的含量；②测定各组小鼠血清中血肌酐（CRE）和血尿素氮（BUN）含量；③测定各组小鼠血清中 IL-6、IL-10 和 IFN- γ 的含量；④对各组小鼠的肾脏组织进行病理分析和评分。

1) 小鼠尿蛋白含量的检测

本实验使用提尾反射法收集小鼠尿液，采用尿蛋白检测试剂盒（CBB 法，南京建成生物工程研究所，#C035-2-1）检测小鼠尿蛋白浓度。MRL/lpr 小鼠红斑狼疮发病的过程中，肾脏会因 dsDNA 抗体沉积而发生损伤，进而导致肾小球滤过功能和重吸收能力下降，尿蛋白浓度升高。随着 MRL/lpr 小鼠狼疮肾炎的发展，小鼠尿蛋白水平会逐渐升高。每两周进行的小鼠尿蛋白水平检测显示，最初每组小鼠尿蛋白含量无明显差异，随着实验的进行，MRL/lpr 对照组（模型对照组）小

鼠尿蛋白水平逐渐升高并明显高于正常组，说明由于自身抗体的沉积，MRL/lpr 小鼠出现严重的自发性肾损伤。1 和 3 mg/kg D2-60-b-T3E 给药组小鼠平均尿蛋白含量低于模型对照组并呈现剂量依赖性，但由于数据个体差异较大，和模型对照组相比无统计学差异。数据见图 10。

2) 血清中抗双链 DNA 的 IgM 和 IgG 的含量检测

采用 ELISA 法检测血清中抗双链 DNA (抗-dsDNA) IgG、IgM 的含量。具体方法参见 ELISA 试剂盒 (Alpha Diagnostic, #5120 和 #5130) 说明书。3 mg/kg 的 D2-60-b-T3E 给药组小鼠血清中抗-dsDNA IgG 和 IgM 含量的平均值显著低于模型对照组 ($P<0.01$)，1 mg/kg 组虽然有 IgG 和 IgM 含量低于模型对照组的趋势，但和模型对照组的差异无统计学意义。实验结果见图 11A 和图 11B。

3) D2-60-b-T3E 对 MRL/lpr 小鼠肾功能的影响

本实验使用肌酐 (CRE) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, #C011-2-1) 和尿素氮 (BUN) 测试盒 (南京建成生物工程研究所, #C013-2-1) 检测实验结束时小鼠血清中血肌酐和尿素氮的含量。

尿素氮和肌酐分别是人体蛋白质和肌肉的代谢产物，肾脏是其终排泄器官，肾功能受损后，血中尿素氮和肌酐无法有效排出，血尿素氮 (BUN) 和血肌酐 (CRE) 的浓度因滞留而逐渐升高。因此血清中 BUN 和 CRE 水平是临床上反映肾功能的主要指标。与正常小鼠相比，MRL/lpr 对照组 (模型对照组) 小鼠血清中肌酐 (CRE) 和尿素氮 (BUN) 含量均显著升高 ($P<0.0001$)，提示 MRL/lpr 模型组小鼠出现功能性肾受损。

1 和 3 mg/kg 给药组小鼠血清中肌酐的含量显著低于模型对照组 ($P<0.01$, $P<0.0001$)，可以一定程度上改善 MRL/lpr 小鼠的肾功能，并且 3 mg/kg 给药组小鼠血清中肌酐的含量显著低于 1 mg/kg 给药组。3 mg/kg 给药组小鼠血清中尿素氮的含量同样显著低于模型对照组 ($P<0.05$)，说明 3 mg/kg 的 D2-60-b-T3E 可以逆转 MRL/lpr 小鼠的自发性肾损伤。结果见图 12A 和图 12B。

4) D2-60-b-T3E 对 MRL/lpr 小鼠血清 IL-6, IL10 和 IFN- γ 含量的影响

采用 ELISA 方法检测血清中细胞因子 IFN- γ 、IL-6 和 IL-10 的含量。

与正常小鼠相比，MRL/lpr 对照组 (模型组) 小鼠血清中 IL-6 和 IFN- γ 的含量显著升高 ($P<0.0001$)。3 mg/kg 给药组小鼠血清中 IL-6 的含量显著低于模型对照组与 1 mg/kg 给药组 ($P<0.0001$)，呈现出剂量依赖关系。3 mg/kg 给药组小鼠血清中 IFN- γ 的含量显著低于模型对照组 ($P<0.01$)。结果见图 13A 和图 13B。

与正常小鼠相比，MRL/lpr 对照组 (模型对照组) 小鼠血清中 IL-10 的含量显著下降 ($P<0.0001$)。3 mg/kg D2-60-b-T3E 给药组小鼠血清中 IL-10 的含量显著高于模型对照组 ($P<0.001$)。结果见图 14。

5) D2-60-b-T3E 对 MRL/lpr 小鼠肾脏病变的影响

实验结束时，取小鼠左肾用 4% 多聚甲醛中固定，石蜡包埋切片后 H&E 染色，

在显微镜下观察切片，并进行病理评分，对肾小球、肾间质以及血管等病理损伤进行分级评分，评分标准见表 24。

表 24. 肾脏病理评分标准

评分	肾小球肾炎	间质性肾炎	血管炎症
1+	局灶性、轻度或早期增生	1-3 小灶（5-10 细胞）单核细胞	肾盂/血管周围的单核细胞
2+	多灶性增生，基质和炎症细胞增多	单发小管周围轻度单核细胞浸润；孤立的萎缩小管	单核细胞浸润大动脉周围；小叶间动脉周围单核细胞小灶 10-20 个细胞
3+	弥漫性增生	更广泛的浸润并见大的管状萎缩病灶	小动脉分支周围的单核细胞病灶更广泛
4+	广泛硬化/新月形：蛋白尿	小管间广泛的单核细胞浸润；广泛的小管萎缩坏死	单核细胞浸润至周围实质/累及大多数血管/血管炎

MRL/lpr 对照组（模型对照组）小鼠肾脏出现严重的肾小球、肾间质及血管病理损伤，肾小球硬化，部分向内凹陷，大量细胞浸润在血管周及间质区域，肾小球出现严重的肿胀与增生。与正常小鼠相比，MRL/lpr 对照组（模型对照组）小鼠肾脏病理评分显著升高（ $P<0.001$ ），提示模型对照组小鼠的肾脏出现明显的病变。

给药组小鼠的肾小球、肾间质及血管病理损伤有一定程度的减轻。1 和 3 mg/kg 给药组小鼠肾脏病理评分显著低于模型对照组（ $P<0.05$ ， $P<0.0001$ ），表明 D2-60-b-T3E 能显著减轻 MRL/lpr 自发性肾脏病变。结果见图 15。

实施例-制剂

SEC 分子排阻色谱法：

根据凝胶孔隙的孔径大小与高分子样品分子的线团尺寸间的相对关系而对溶质进行分离的分析的方法。

$SEC\%（SEC 单体含量百分比）=A 单体/A 总\times 100\%$ （A 单体为样品中主峰单体的峰面积，A 总为所有峰面积之和）。 $\Delta SEC\%=强制降解实验前制剂的 SEC\%-强制降解实验后制剂的 SEC\%$ 。

SEC 测定用仪器：安捷伦 1260；柱子：waters，XBrige BEH200Å SEC（ $300\times 7.8mm\ 3.5\mu m$ ）

NR-CE 毛细管凝胶电泳：

将凝胶移到毛细管中作为支持介质进行的一种电泳，并在一定的电压下根据样品分子量的大小进行分离的方法。

$NR-CE\% = A_{\text{主峰}} / A_{\text{总}} \times 100\%$ (A 主峰为样品中轻链主峰+重链主峰的峰面积, A 总为所有峰面积之和。 $\Delta NR-CE\%$ =强制降解实验前制剂的 NR-CE%-强制降解实验后制剂的 NR-CE%。

CE 测定用仪器: Beckman 型号 plus800

iCIEF 成像毛细管等点聚焦电泳:

根据蛋白质等电点 pI 不同进行分离的技术。

$iCIEF\% = \text{中性峰面积} / \text{总面积} \times 100\%$ (总面积为酸性峰、中性峰和碱性峰面积之和)。 $\Delta iCIEF\%$ =强制降解实验前制剂的 iCIEF%-强制降解实验后制剂的 iCIEF%。

iCIEF 测定所用仪器厂家 simple protein, 型号 muarice。

渗透压测定:

冰点法测定渗透压, 以冰点下降值与溶液的摩尔浓度成正比例关系为基础, 采用高灵敏度感温元件, 测定溶液结冰点, 通过电量转化为渗透压。仪器厂家罗泽 Loser, 型号 OM815。

融合蛋白

以下实施例所采用的融合蛋白为 D2-60-b-T3E。融合蛋白的浓度采用蛋白浓度计。蛋白浓度测定仪器: 紫外可见分光光度计, 型号: Nano Drop oneC, 光程为 1mm。

制剂实施例 1. pH 和缓冲体系筛选

制备含表 25 所示的缓冲体系、30mg/mL 融合蛋白、80mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL 聚山梨酯 80 (PS80) 的制剂。对样品进行强制降解研究 (40°C 放置 1 个月、25°C, 300rpm 振摇 6 天), 以 SEC 和 iCIEF 为评价指标, 考察不同缓冲体系对融合蛋白稳定性的影响。

结果见表 25。SEC 数据显示, 振摇 6 天后含 His-HCl 的制剂的单体纯度优于含 AA 或 SA 的制剂。iCIEF 数据显示, 振摇后组间无显著差异。40°C 放置一个月后, 含 AA (pH 5.5) 的制剂与含 His-HCl (pH 6.0-6.5) 的制剂优于其他组。综上所述, 缓冲体系优选 AA 和 His-HCl, pH 范围优选 5.5-6.5。

表 25. pH 和缓冲体系筛选结果

组别	缓冲体系	条件	$\Delta SEC\%$	$\Delta iCIEF\%$
1	10mM AA pH5.0	振摇 D6	2.3	1.6
		40°C M1	8.9	19.6
2	10mM AA pH5.5	振摇 D6	3.7	-0.5
		40°C M1	7.3	15.4
3	10mM SA pH5.5	振摇 D6	5.6	0.9
		40°C M1	8.8	21.1
4	10mM His-HCl pH5.5	振摇 D6	1.8	1.0

		40°C M1	8.8	17.3
5	10mM His-HCl pH6.0	振摇 D6	1.3	0.4
		40°C M1	7.6	14.7
6	10mM His-HCl pH6.5	振摇 D6	1.6	0.4
		40°C M1	6.6	15.7

AA 代表醋酸-醋酸钠；SA 代表琥珀酸-琥珀酸钠；His-HCl 代表组氨酸-盐酸组氨酸；
振摇 D6：25°C 300 rpm 振摇 6 天；40°C M1：40°C 放置 1 个月，下同。

制剂实施例 2. 蛋白浓度筛选

制备含 10mM AA 缓冲液(pH 5.5)、表 26 所示的蛋白浓度的融合蛋白、80 mg/mL 蔗糖、0.2 mg/mL PS80 的制剂。对样品进行强制降解研究（40°C 放置 1 个月），以 SEC、NR-CE 和 iCIEF 为评价指标，考察不同蛋白浓度对融合蛋白稳定性的影响。

结果见表 26。蛋白浓度 10-30 mg/mL 时，高温放置过程中外观及纯度项无明显差异，纯度项变化值均在可接受范围内，说明在该浓度范围内，融合蛋白样品具有良好的稳定性。

表 26. 蛋白浓度筛选结果

组别	浓度 (mg/mL)	条件	ΔSEC%	ΔNR-CE%	ΔiCIEF%
1	30	40°C M1	7.3	3.2	15.4
2	10	40°C M1	6.7	3.5	14.9

制剂实施例 3. 含不同糖的制剂

在 10mM AA pH5.5 缓冲液中，制备蛋白浓度为 10 mg/mL，含 0.2 mg/mL PS80，含不同糖种类的抗 IL-2 蛋白制剂。具体糖种类和浓度如下：

- 1) 80 mg/mL 蔗糖
- 2) 80 mg/mL 海藻糖

将每种制剂过滤，灌装，加塞，轧盖。将样品进行 25°C 300rpm 振摇稳定性考察，以 SEC 为评价指标，结果见表 27，蔗糖稳定性优于海藻糖。

表27. 糖的筛选结果

糖	条件	ΔSEC%
		单体
80 mg/mL 蔗糖	振摇 D9	2.1
80 mg/mL 海藻糖	振摇 D9	4.1

制剂实施例 4. 表面活性剂浓度筛选

制备含 30 mg/mL 的融合蛋白、80 mg/mL 蔗糖、表 28 所示的表面活性剂、和 10 mM AA 缓冲液（pH 5.5）的制剂。对样品进行强制降解实验（40°C 恒温条件下

放置 1 个月), 以 SEC 和 iCIEF 为评价指标, 考察样品稳定性。结果见表 28。结果显示, 含泊洛沙姆 188 (PF68) 的制剂的蛋白单体纯度未有明显变化。

表 28. 融合蛋白表面活性剂种类及浓度筛选结果

组别	表面活性剂	条件	ΔSEC%	ΔiCIEF%
1	0.1 mg/mL PF68	40°C M1	7.0	17.1
2	0.2 mg/mL PF68	40°C M1	7.4	20.9
3	0.4 mg/mL PF68	40°C M1	6.9	19.9
4	0.6 mg/mL PF68	40°C M1	7.0	18.9

制剂实施例 5. 表面活性剂筛选

以 10 mM pH6.0 His-HCl 为缓冲体系, 制备含 80 mg/mL 蔗糖, 含有不同种类的表面活性剂, 蛋白浓度为 30 mg/mL 的抗 IL-2 蛋白制剂。将每种制剂过滤, 灌装, 加塞, 轧盖。取样品进行 4°C 长期研究, 以外观和 SEC 为评价指标, 考察样品稳定性, 试验结果见表 29。具体表面活性剂设定如下:

- 1) 0.6 mg/mL PS80
- 2) 0.6 mg/mL PF68

实验结果显示, 4°C M13 后相同表面活性剂浓度下 PF68 组 SEC 单体纯度与 PS80 组无明显差异。外观上, 相同表面活性剂浓度下 PS80 组外观较优于 PF68 组。综合以上数据优选 PS80 作为抗 IL-2 蛋白制剂的表面活性剂。

表 29. 抗 IL-2 蛋白表面活性剂种类筛选结果

组别	条件	外观	SEC%	ΔSEC%
			单体	
1	D0	澄清透明	97.1	N/A
	4°C M13	澄明	96.3	-0.9
2	D0	澄清透明	97.2	N/A
	4°C M13	细小颗粒	96.2	-1.0

制剂实施例 6. 表面活性剂浓度筛选

以 10 mM pH6.0 His 为缓冲体系, 制备含 87 mg/mL 蔗糖, 含有不同浓度 PS80, 蛋白浓度为 30 mg/mL 的抗 IL-2 蛋白制剂。具体 PS80 浓度设定如下:

- 1) 0.4 mg/mL PS80
- 2) 0.8 mg/mL PS80
- 3) 1.5 mg/mL PS80

将每种制剂过滤，灌装，加塞，轧盖。进行冻融考察，以外观、SEC为评价指标，考察样品稳定性，试验结果见表30。冻融MFI结果显示，随着PS80浓度增大， $\geq 2\mu\text{m}$ 颗粒数减少。

表30. 表面活性剂浓度筛选结果

组别	条件	外观	MFI($\geq 2\mu\text{m}$)
1	FT5C	澄明	180
2	FT5C	澄明	129
3	FT5C	澄明	100

FT5C：冻融 5 个循环，以此类推。

制剂实施例 7. 辅料筛选

在 10mM pH6.0 His-HCl 缓冲液中，制备蛋白浓度为 10 mg/mL，含 0.8 mg/mL PS80，含不同辅料的抗 IL-2 蛋白制剂。具体如下：

- 1) 36 mg/mL 蔗糖
- 2) 36 mg/mL 蔗糖，12 mg/mL 甘氨酸

将每种制剂过滤，灌装，加塞，轧盖。将样品进行冻融考察，以外观、DLS 和 MFI 为评价指标，结果见表 31。外观 DLS 和 MFI 数据显示组间无显著差异。考虑到皮下制剂，减少注射刺激性，渗透压控制为等渗最佳，因此对辅料浓度进行筛选，确定等渗浓度。只有 36 mg/mL 蔗糖渗透压偏低，36 mg/mL 蔗糖加 12 mg/mL 甘氨酸或 40 mg/mL 蔗糖加 10 mg/mL 甘氨酸或 45 mg/mL 蔗糖加 10 mg/mL 甘氨酸或 50 mg/mL 蔗糖加 9 mg/mL 甘氨酸可控制在等渗范围内。

表31. 辅料筛选结果

组别	条件	外观	DLS(nm)	MFI($\geq 2\mu\text{m}$)
1	D0	澄明	13.2	124
	FT1C	澄明	14.8	301
2	D0	澄明	13.0	126
	FT1C	澄明	13.1	369

制剂实施例 8. 不同离子强度筛选

以pH6.0 His-HCl为缓冲体系，制备含36 mg/mL蔗糖、12mg/mL甘氨酸，含0.8 mg/mLPS80蛋白浓度为10 mg/mL的抗IL-2蛋白制剂。具体不同离子强度设定如下：

- 1) 10mM
- 2) 5mM

将每种制剂过滤，灌装，加塞，轧盖。进行冻融考察，以外观和SEC为评价指标，考察样品稳定性，试验结果见表32。结果显示组间外观、SEC无显著差异。

表32. 不同离子强度筛选结果

组别	条件	外观	Δ SEC%
1	D0	澄明	96.4
	FT1C	澄明	96.5
2	D0	澄明	96.4
	FT1C	澄明	96.5

制剂实施例 9. 冻干制剂

以10mM pH6.0 His-HCl为缓冲体系，制备含50 mg/mL蔗糖加9mg/mL甘氨酸（组别1）或40 mg/mL蔗糖加10mg/mL甘氨酸（组别2），含0.8 mg/mL PS80蛋白浓度为10 mg/mL的抗IL-2蛋白制剂。

将制剂过滤，灌装，加塞，轧盖。将制剂样品进行冻干，冻干程序为预冻、一次干燥和二次干燥（参数见表 33）。冻干程序结束后，真空加塞。然后，用注射用水复溶冻干制剂，获得蛋白浓度 10 mg/mL 的抗 IL-2 抗体复溶溶液，考察冻干前制剂及冻干后复溶溶液的外观、NR-CE 和 SEC 纯度等指标的变化。实验结果见表 34，结果表明，抗 IL-2 抗体制剂冻干前后均保持良好的稳定性。

表 33. 抗 IL-2 抗体制剂冻干程序

冻干工艺参数	设定温度 (°C)	设定时间 (min)	保持时间 (min)	真空度 (Pa)
预冻	5	10	60	N/A
预冻	-45	50	60	N/A
一次干燥	-25	120	3000	10
二次干燥	25	60	1	10
	25	1	480	10

表 34. 抗 IL-2 抗体制剂冻干前后制剂对比实验结果

组别	放置条件	外观	SEC%	NR-CE%
			单体	单体
1	冻干前制剂	澄明	96.8	97.2
	冻干后复溶溶液	澄明	96.7	97.2
2	冻干前制剂	澄明	N/A	N/A
	冻干后复溶溶液	澄明	N/A	N/A

制剂实施例 10. 冻干制剂

分别以10mM pH6.0 His-HCl 或5mM pH6.0 His-HCl 为缓冲体系，制备含45mg/mL蔗糖、10mg/mL甘氨酸，含0.8 mg/mL PS80蛋白浓度为10 mg/mL的抗IL-2蛋白制剂。

将制剂过滤，灌装，加塞，轧盖。将制剂样品进行冻干，冻干程序为预冻、一次干燥和二次干燥（参数见表 35）。冻干程序结束后，真空加塞。然后，用注射用水复溶冻干制剂，获得蛋白浓度 10 mg/mL 的抗 IL-2 抗体复溶溶液，考察冻干

前制剂及冻干后复溶溶液的外观和 SEC 纯度等指标的变化。实验结果见表 36，结果表明，抗 IL-2 抗体制剂冻干前后均保持良好的稳定性。

表 35. 抗 IL-2 抗体制剂冻干程序

冻干工艺参数	设定温度 (°C)	设定时间 (min)	保持时间 (min)	真空度 (Pa)
预冻	5	10	60	N/A
预冻	-45	50	60	N/A
一次干燥	-25	120	3000	10
二次干燥	25	60	1	10
	25	1	480	10

表 36. 抗 IL-2 抗体制剂冻干前后制剂对比实验结果

组别	放置条件	外观	SEC%
			单体
1 (10mM pH6.0)	冻干前制剂	澄明	96.7
	冻干后复溶溶液	澄明	96.6
2 (5mM pH6.0)	冻干前制剂	澄明	96.4
	冻干后复溶溶液	澄明	96.5

权利要求书：

1. 一种药物组合物，包含融合蛋白和缓冲剂，其中所述融合蛋白包含共价结合的 IL-2 与抗 IL-2 抗体，所述缓冲剂为组氨酸缓冲剂、醋酸盐缓冲剂或琥珀酸盐缓冲剂；

优选地，所述缓冲剂为组氨酸缓冲剂或醋酸盐缓冲剂；

更优选地，所述缓冲剂为组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂或醋酸-醋酸钠缓冲剂。

2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其中所述融合蛋白的浓度为 5 mg/mL 至 50 mg/mL；

优选地，所述融合蛋白的浓度为 10 mg/mL 至 30 mg/mL。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含表面活性剂；

优选地，所述表面活性剂为聚山梨酯或泊洛沙姆；

更优选地，所述表面活性剂为聚山梨酯 80、聚山梨酯 20 或泊洛沙姆 188。

4. 根据权利要求 3 所述的药物组合物，其中所述表面活性剂的浓度为 0.05 mg/mL 至 2 mg/mL；

优选地，所述表面活性剂的浓度为 0.1 mg/mL 至 0.8 mg/mL。

5. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物含糖；

优选地，所述糖为蔗糖、甘露醇和海藻糖中的一种或多种；

更优选地，所述糖为蔗糖。

6. 根据权利要求 5 所述的药物组合物，其中所述糖的浓度为 20 mg/mL 至 100 mg/mL；

优选地，所述糖的浓度为 30 mg/mL 至 80 mg/mL；

更优选地，所述糖的浓度为 30 mg/mL 至 50 mg/mL。

7. 根据权利要求 6 所述的药物组合物，其中所述药物组合物还包含辅料；优选地，所述辅料为甘氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、盐酸精氨酸、谷氨酸、天冬氨酸或乙二胺四乙酸二钠；更优选地，所述辅料为甘氨酸。

8. 根据权利要求 7 所述的药物组合物，其中所述辅料的浓度为 1 mg/mL 至 30

mg/mL; 优选地, 辅料的浓度为 5 mg/mL 至 15 mg/mL。

9. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的药物组合物, 其中所述缓冲剂的浓度为 5 mM 至 100 mM;

- 5 优选地, 所述缓冲剂的浓度为 5 mM 至 30 mM;
更优选地, 所述缓冲剂的浓度为 5 mM 至 10 mM。

10. 根据权利要求 1 至 9 任一项所述的药物组合物, 其中所述缓冲剂的 pH 为 5.0 至 6.5;

- 10 优选地, 所述缓冲剂的 pH 为 5.5 至 6.0;
更优选地, 所述缓冲剂的 pH 为 6.0。

11. 根据权利要求 1 至 10 任一项所述的药物组合物, 所述抗 IL-2 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区具有: 包含 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列的 HCDR1、包含 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列的 HCDR2 和包含 SEQ ID NO: 39 的氨基酸序列的 HCDR3, 所述轻链可变区具有: 包含 SEQ ID NO: 40 的氨基酸序列的 LCDR1、包含 SEQ ID NO: 41 的氨基酸序列的 LCDR2 和包含 SEQ ID NO: 42 的氨基酸序列的 LCDR3;

- 20 优选地, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列;

更优选地, 所述抗 IL-2 抗体包含 SEQ ID NO: 165 的氨基酸序列的重链和 SEQ ID NO: 166 的氨基酸序列的轻链。

12. 根据权利要求 1 至 11 任一项所述的药物组合物, 所述 IL-2 直接或通过连接子融合至抗 IL-2 抗体的轻链的 N 端;

优选地, 所述 IL-2 的第 3 位氨基酸残基为 E;

更优选地, 所述融合蛋白包含 SEQ ID NO: 165 的氨基酸序列的重链和 SEQ ID NO: 189 的氨基酸序列的轻链。

13. 根据权利要求 1 至 12 任一项所述的药物组合物, 其包含如下组分:

- 30 a) 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述融合蛋白,
b) 0.1 mg/mL 至 0.8 mg/mL 的聚山梨酯或泊洛沙姆,
c) 30 mg/mL 至 80 mg/mL 的蔗糖,
d) 1 mg/mL 至 30 mg/mL 的甘氨酸, 和
35 e) 5 mM 至 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, 所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0;

优选地, 所述药物组合物包含如下组分:

- a) 10 mg/mL 至 30 mg/mL 的所述融合蛋白，
b) 0.1 mg/mL 至 0.8 mg/mL 的聚山梨酯 80，
c) 30 mg/mL 至 50 mg/mL 的蔗糖，
d) 5 mg/mL 至 15 mg/mL 的甘氨酸，和
5 e) 5 mM 至 10 mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，所述组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂的 pH 为 6.0。

14. 根据权利要求 1 至 13 任一项所述的药物组合物，其中所述组合物是液体制剂；
10 优选地，所述组合物的施用途为皮下注射、皮内注射、静脉注射或肌肉注射；
更优选地，所述组合物的施用途为皮下注射。

15. 一种冻干制剂，所述冻干制剂复溶后可形成权利要求 1 至 14 任一项所述的药物组合物。
15

16. 一种制备冻干制剂的方法，其中包括将权利要求 1 至 14 中任一项所述的药物组合物进行冷冻干燥的步骤。

17. 一种冻干制剂，所述制剂通过将权利要求 1 至 14 中任一项所述的药物组合物经冷冻干燥获得。
20

18. 一种复溶溶液，所述复溶溶液是通过将权利要求 15 或 17 所述的冻干制剂复溶制备的。
25

19. 一种制品，其包括容器，该容器中装有如权利要求 1 至 14 任一项所述的药物组合物、权利要求 15 或 17 所述的冻干制剂或权利要求 18 所述的复溶溶液。

20. 一种治疗自身免疫疾病或延缓自身免疫疾病进展的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求 1 至 14 任一项所述的药物组合物、权利要求 15 或 17 所述的冻干制剂、权利要求 18 所述的复溶溶液或权利要求 19 所述制品；
30

- 优选地，所述自身免疫疾病选自以下的任一项或组合：狼疮、移植物抗宿主病、丙型肝炎诱导的脉管炎、I 型糖尿病、多发性硬化、炎性肠病、慢性 GvHD、哮喘、皮炎、斑秃、急性肺损伤、败血症、反应性关节炎和类风湿性关节炎。
35

说明书附图:

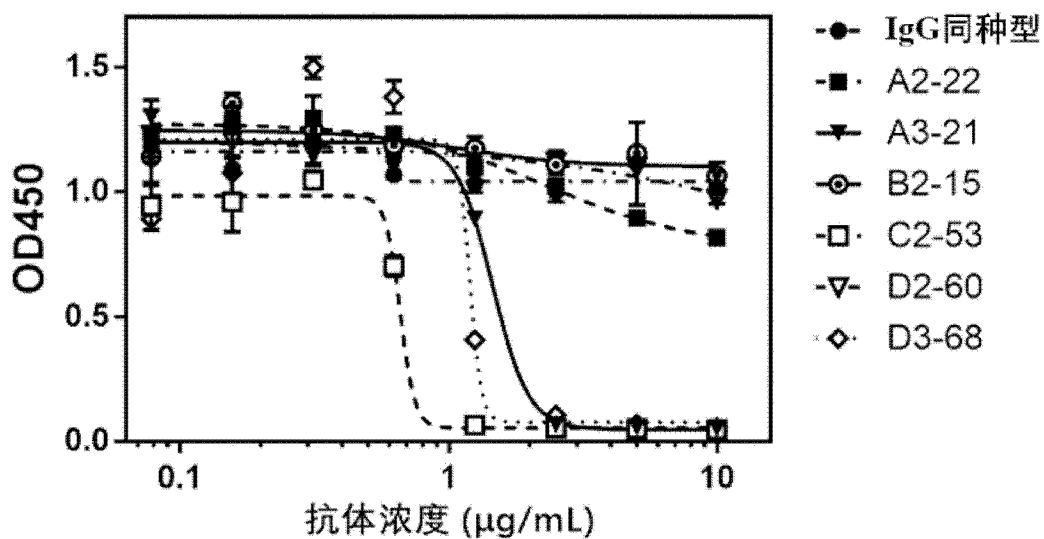


图 1A

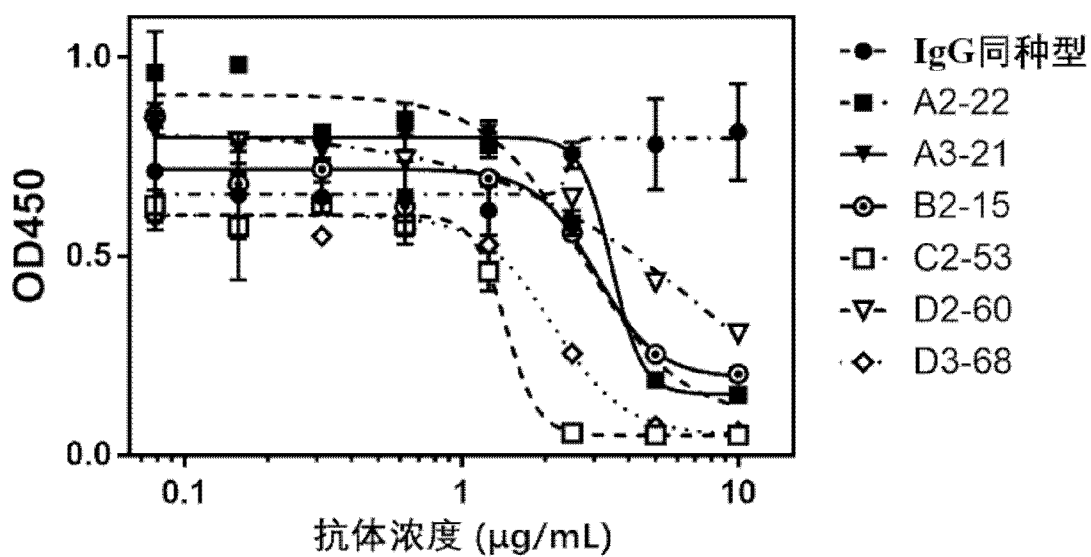


图 1B

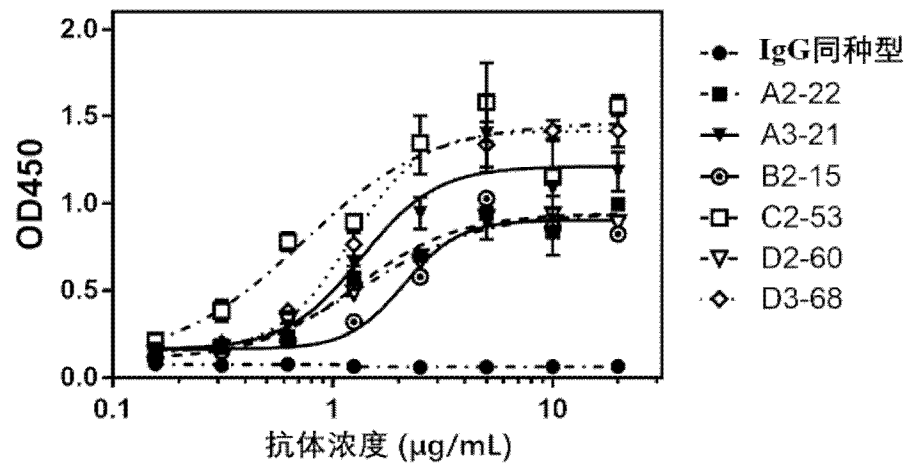


图 2

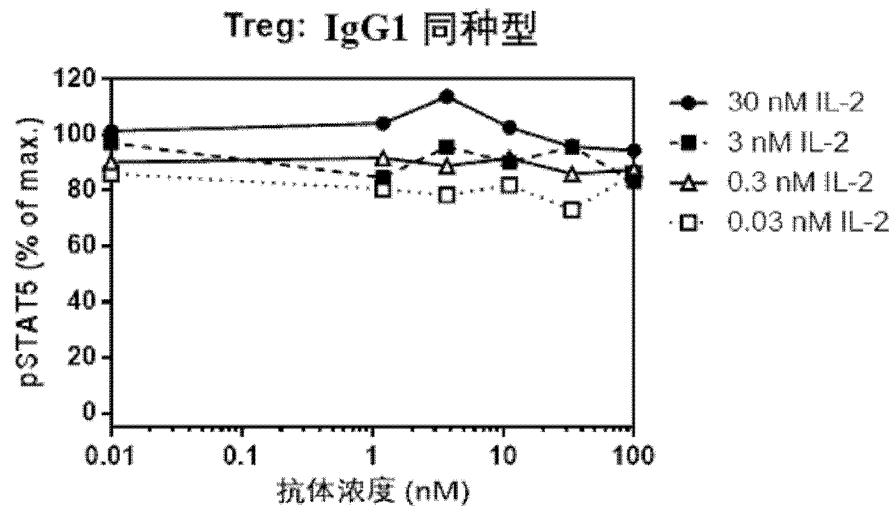


图 3A

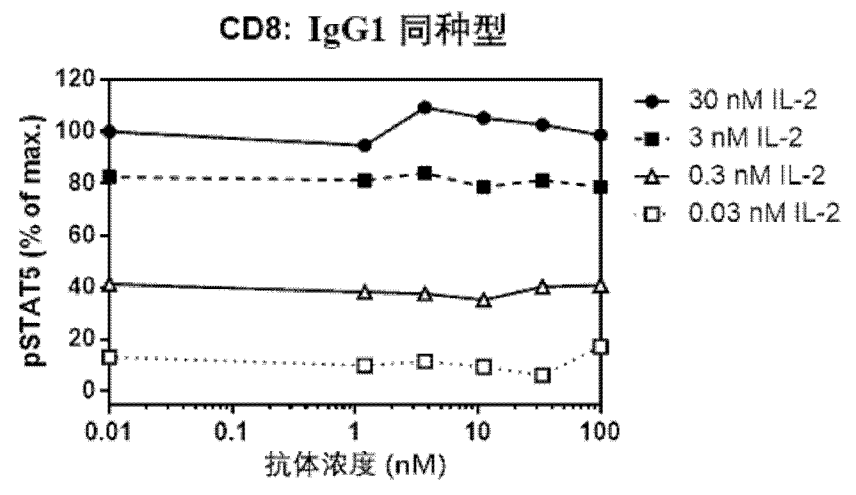


图 3B

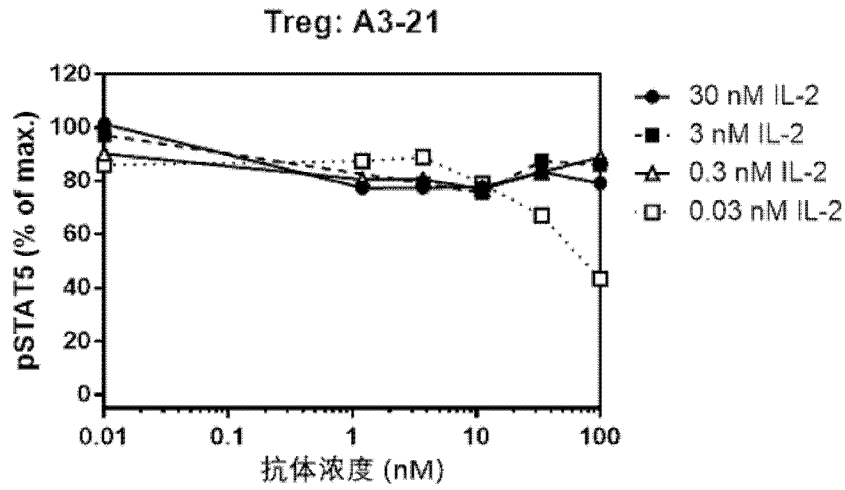


图 3C

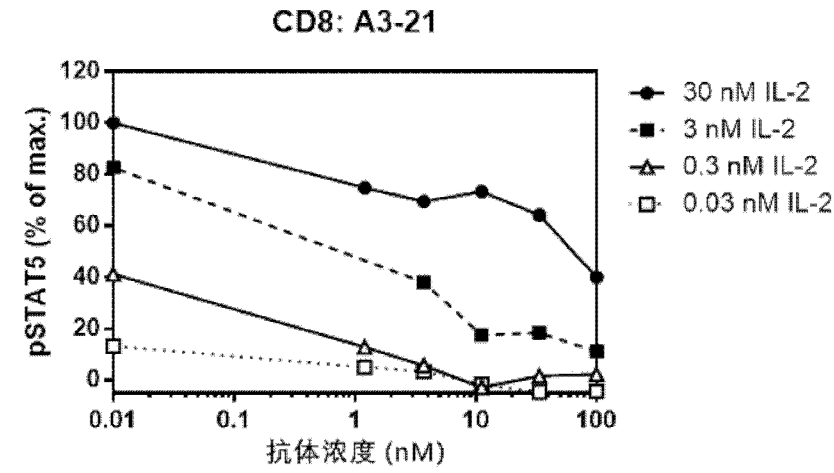


图 3D

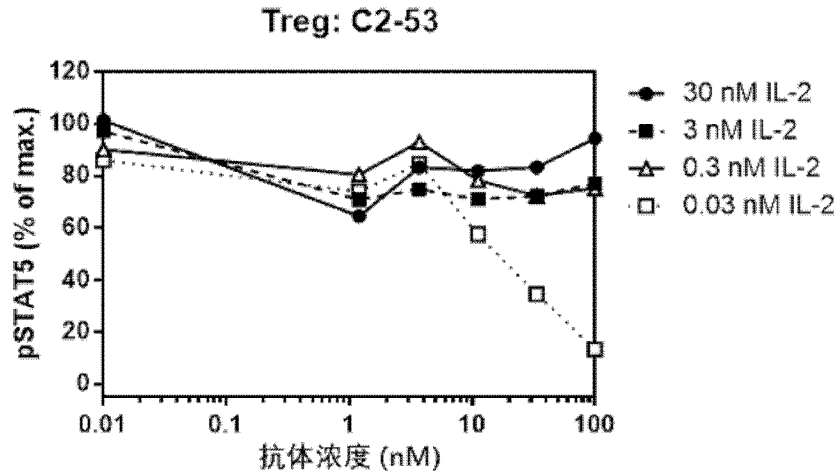


图 3E

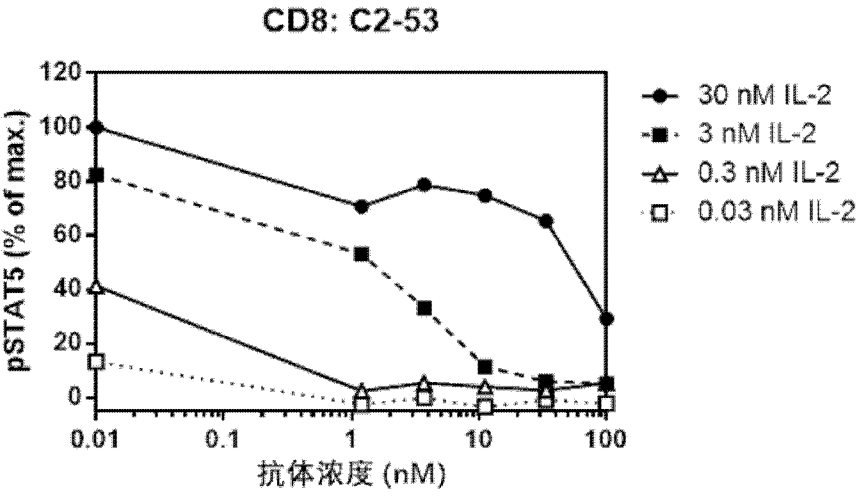


图 3F

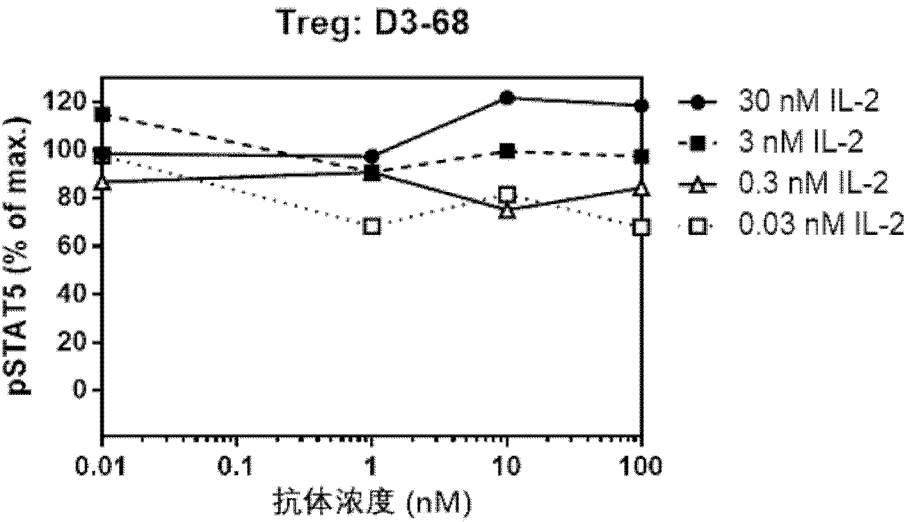


图 3G

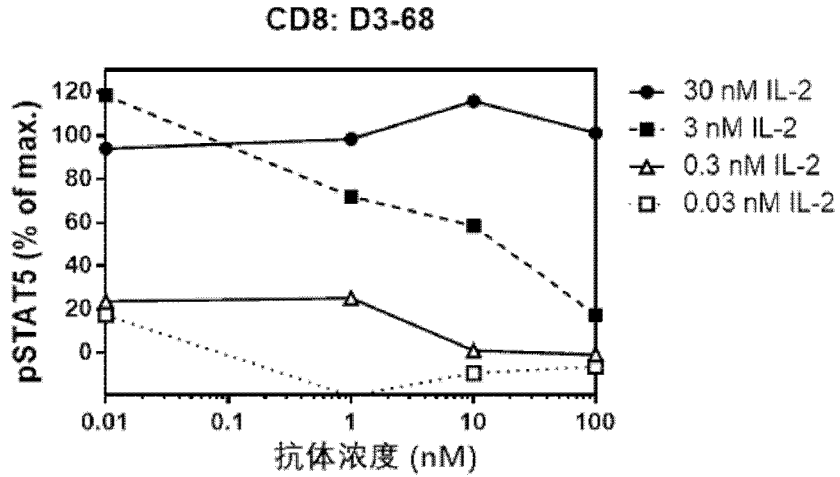


图 3H

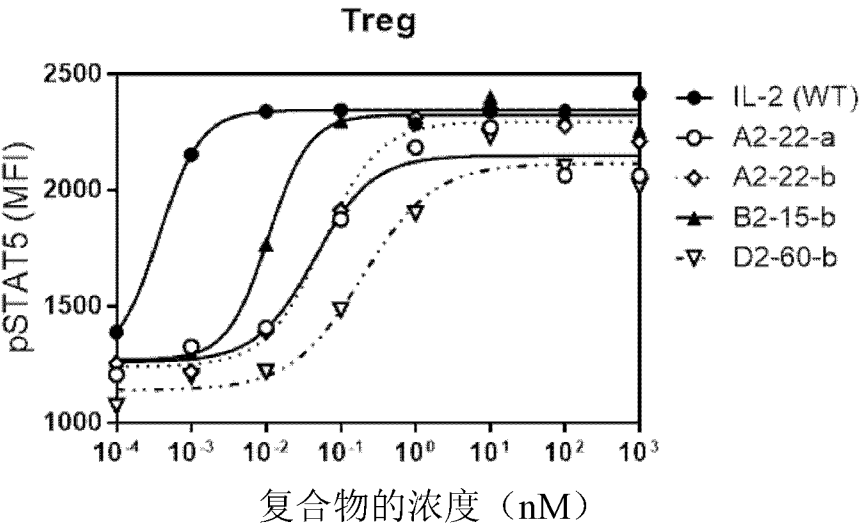


图 4A

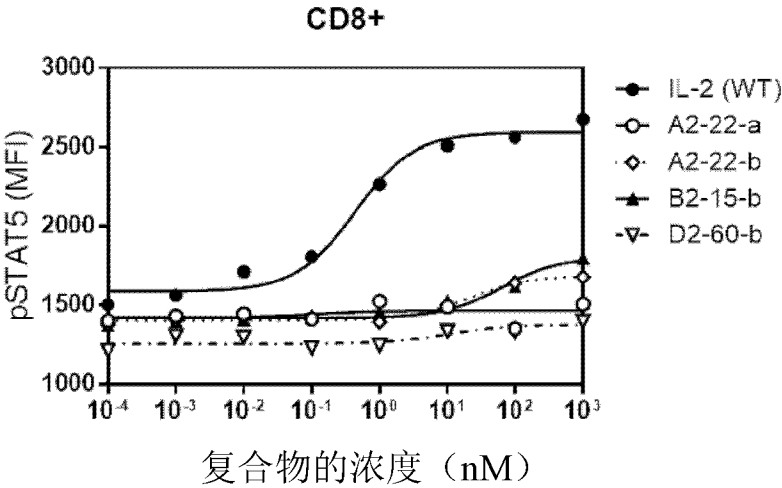


图 4B

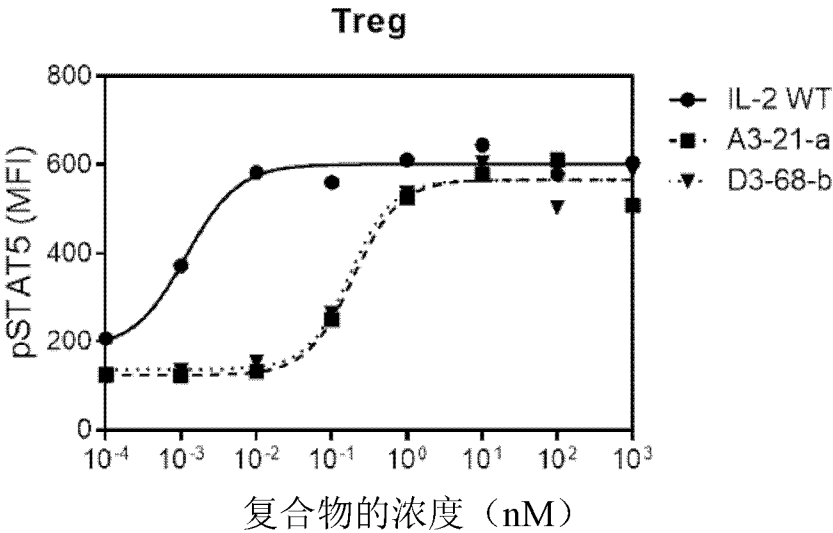


图 4C

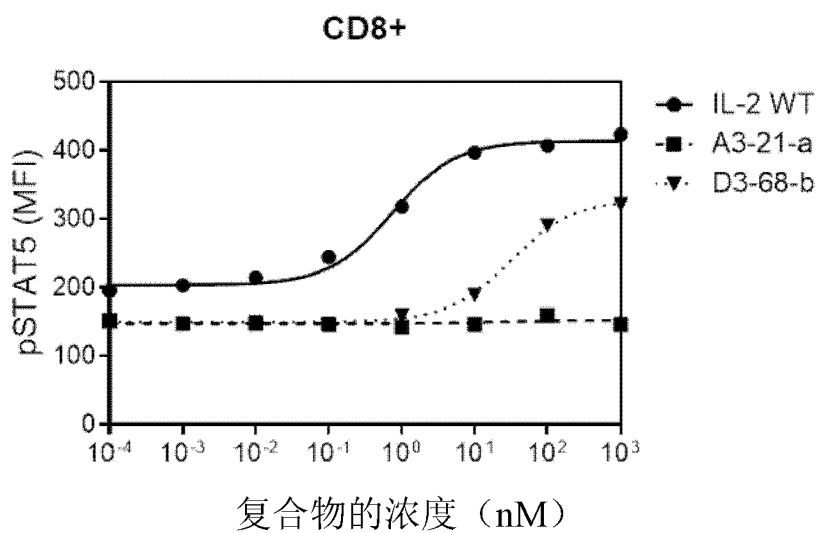


图 4D

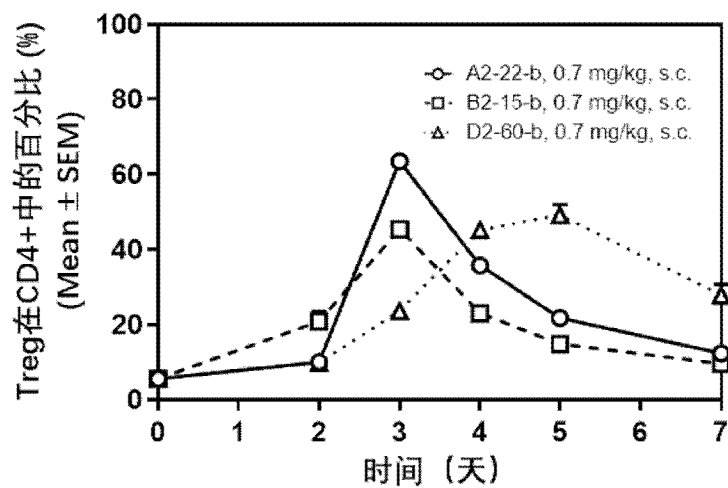


图 5A

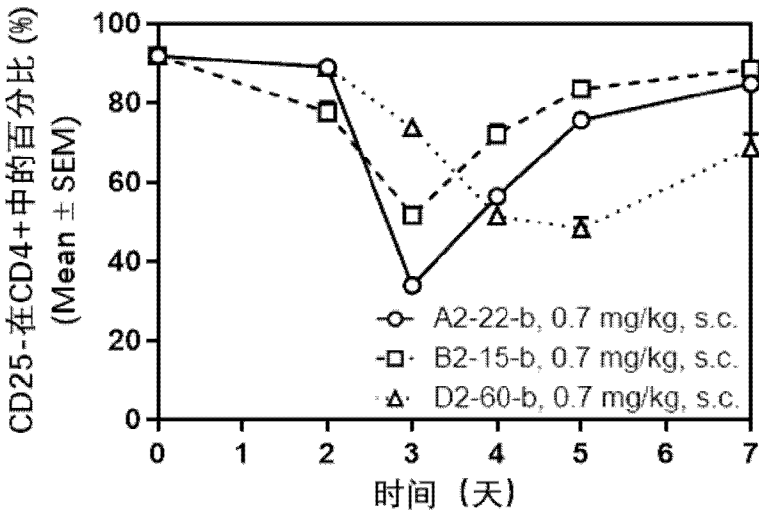


图 5B

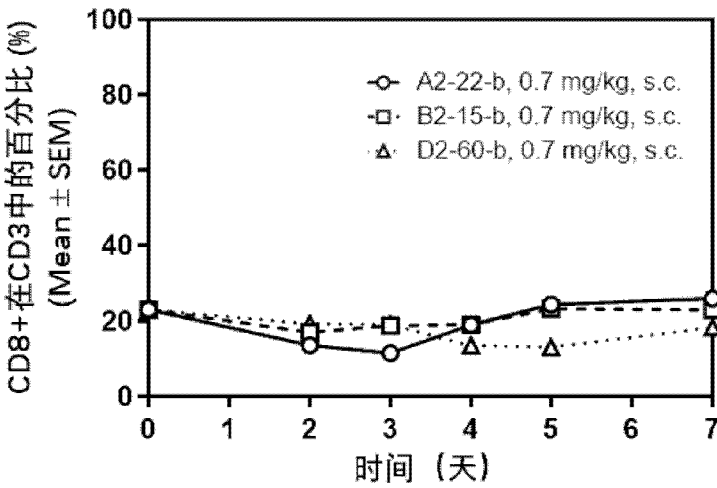


图 5C

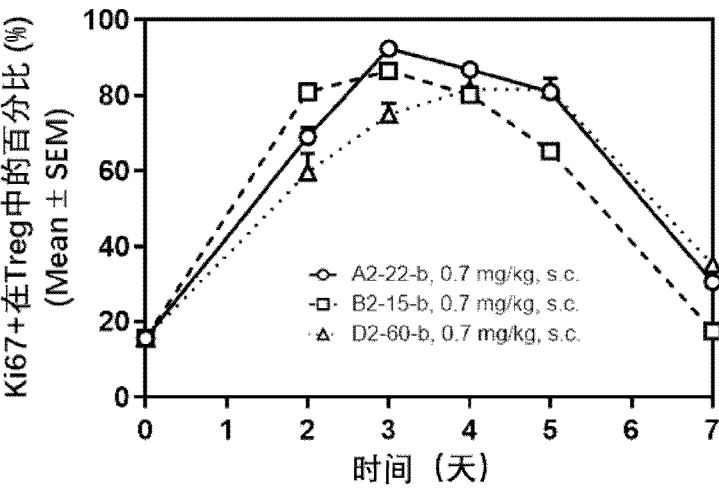


图 5D

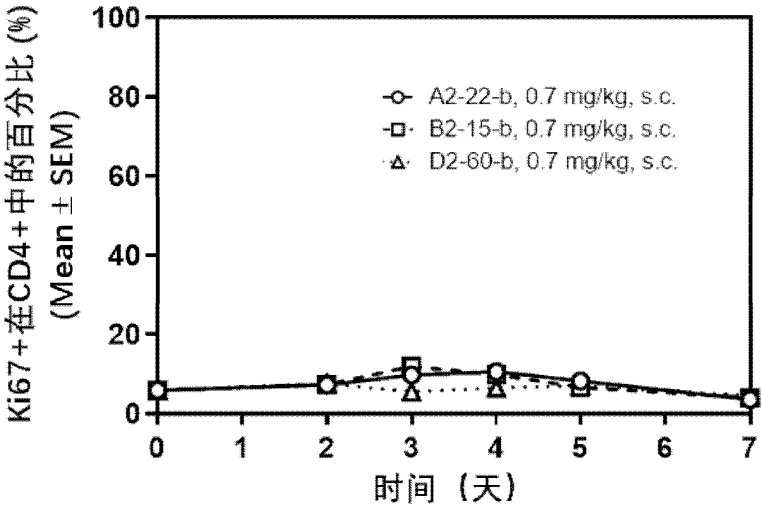


图 5E

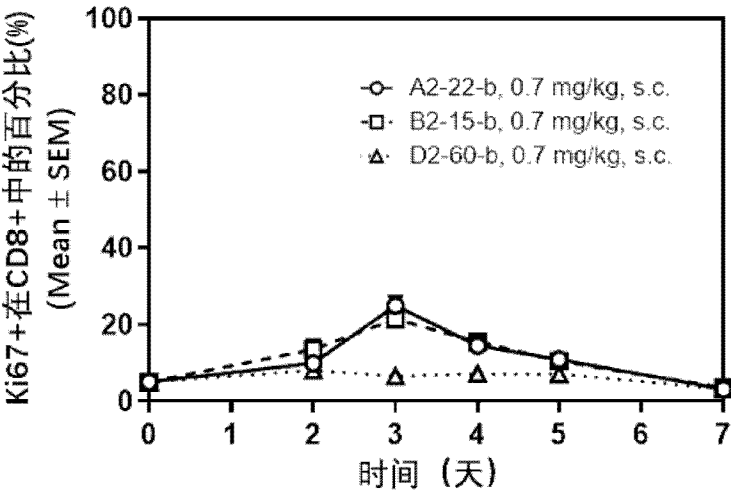


图 5F

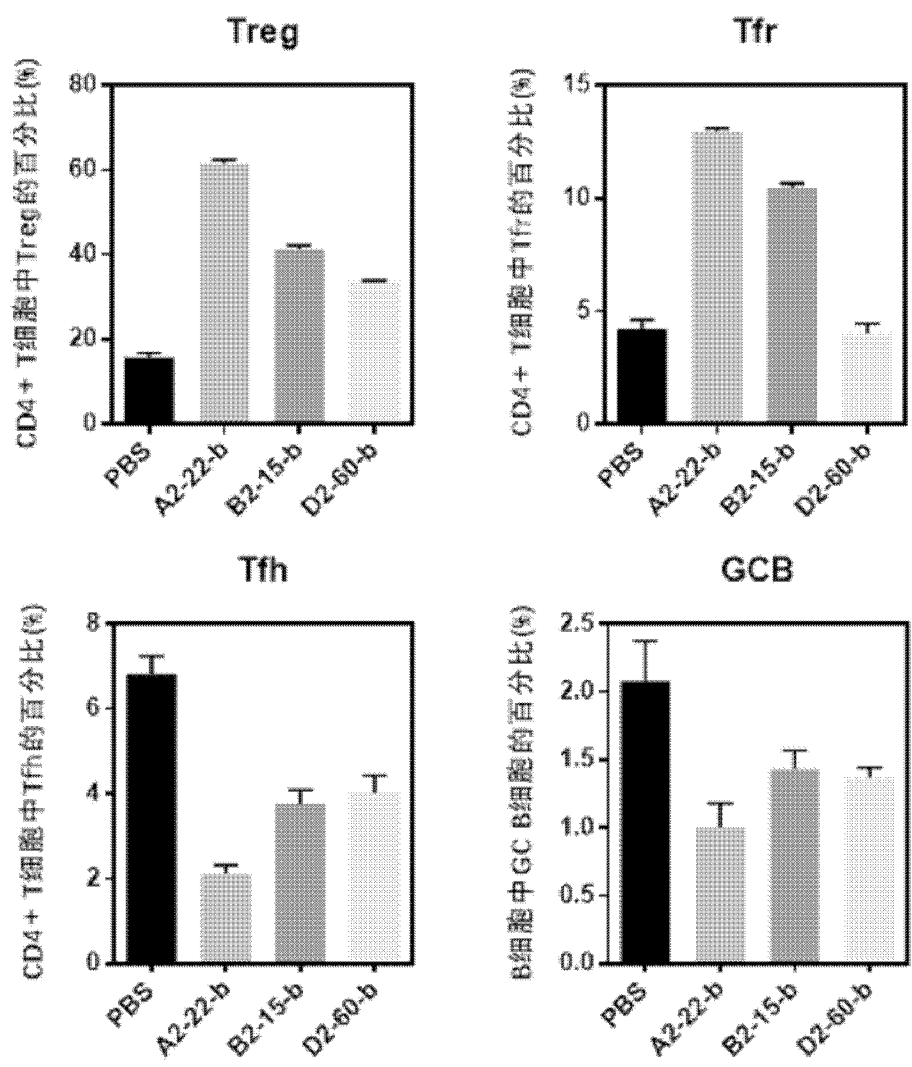


图 6

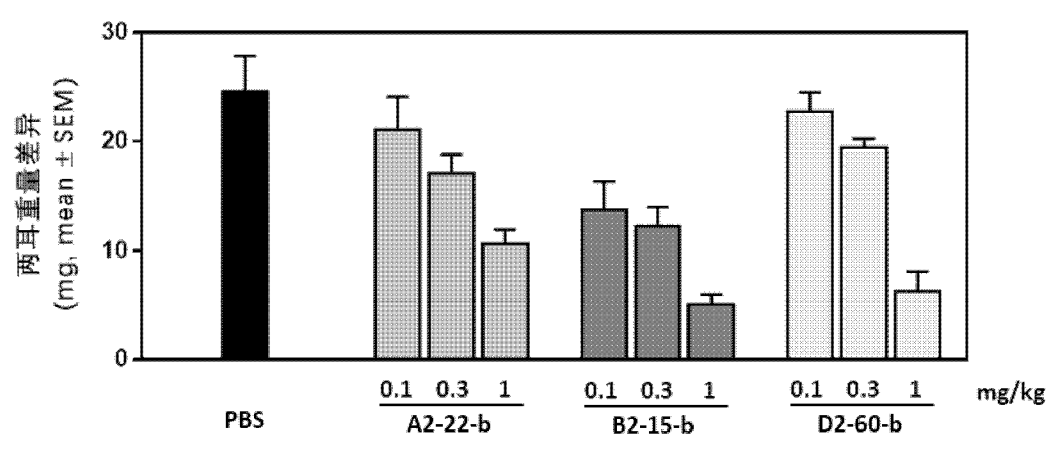


图 7

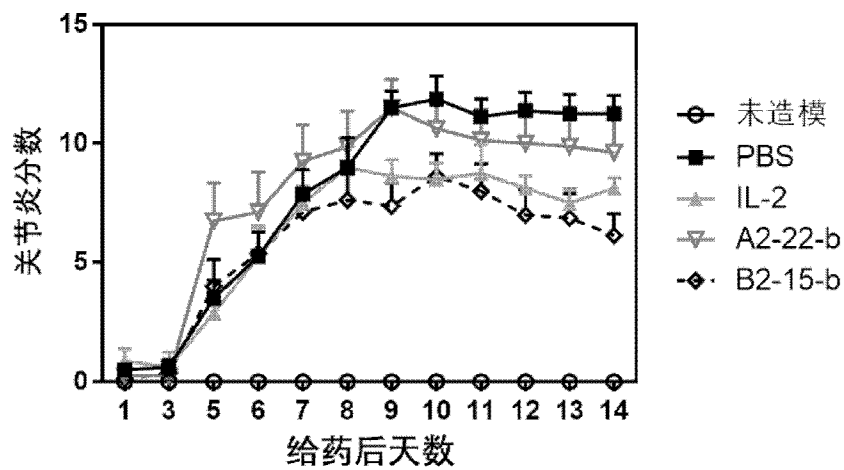


图 8A

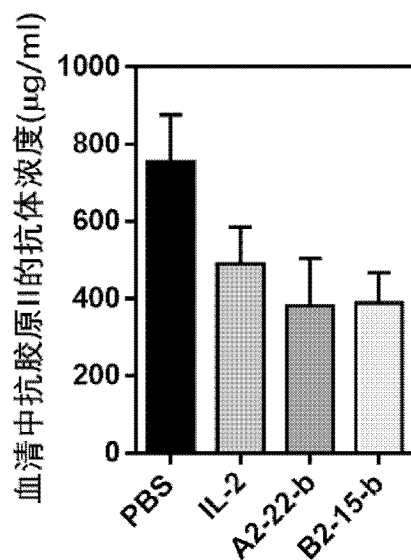


图 8B

Treg

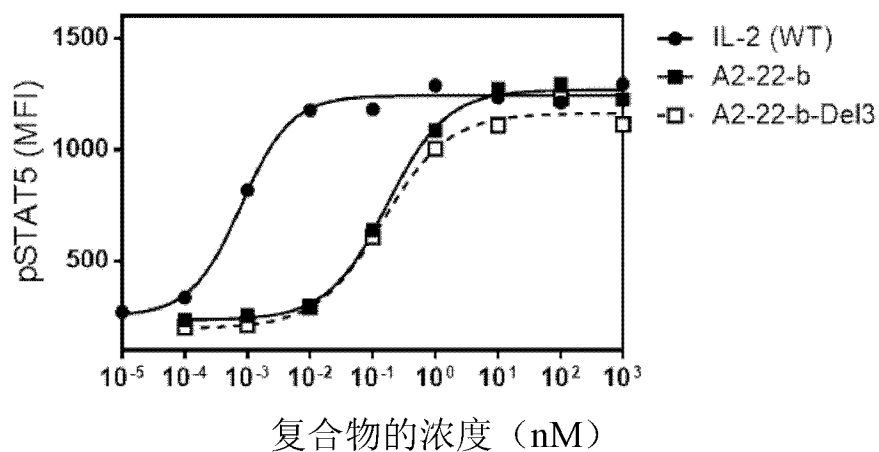


图 9A

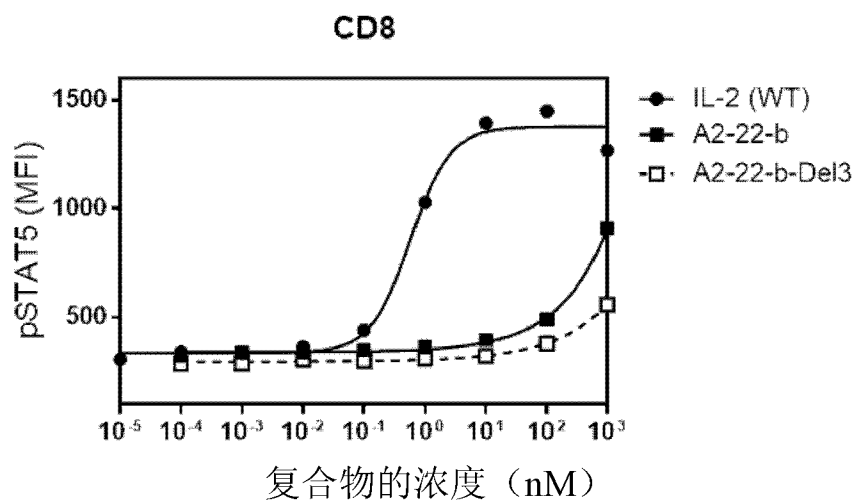


图 9B

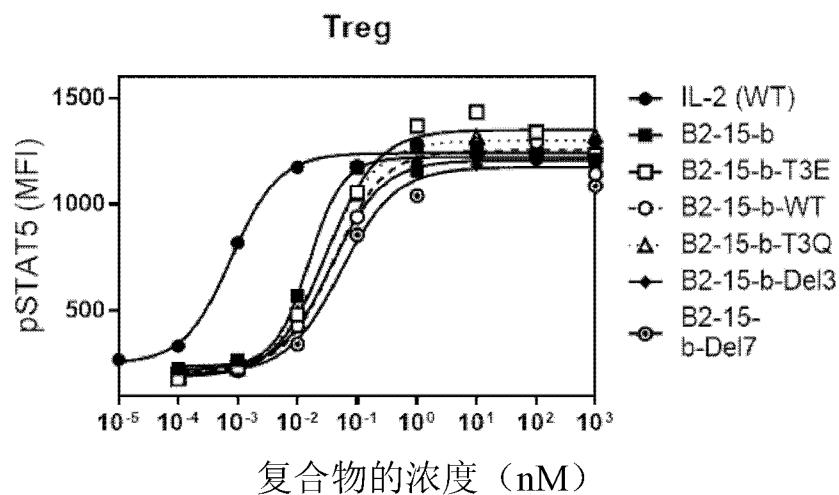


图 9C

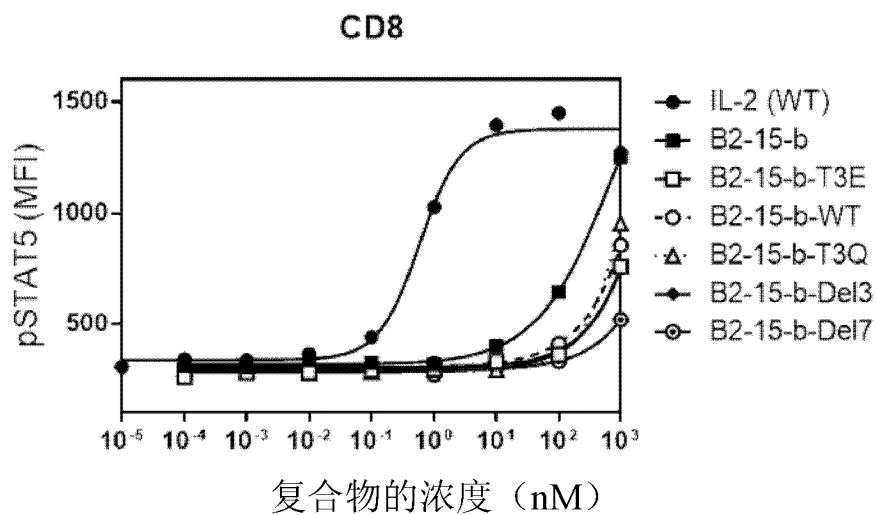


图 9D

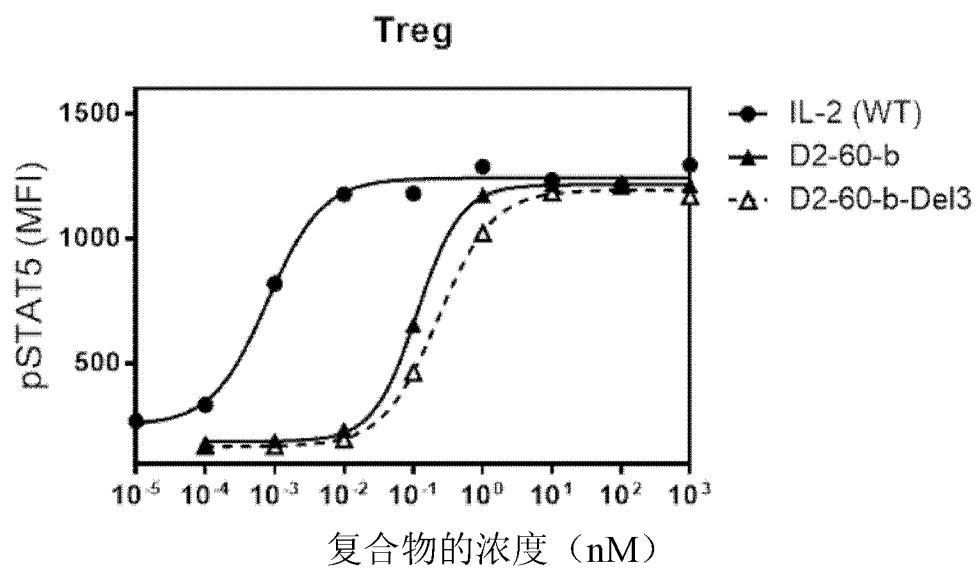


图 9E

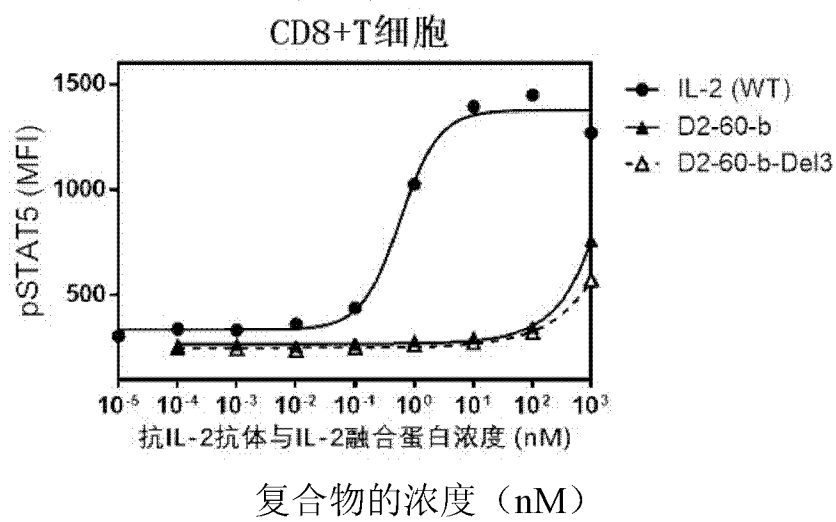


图 9F

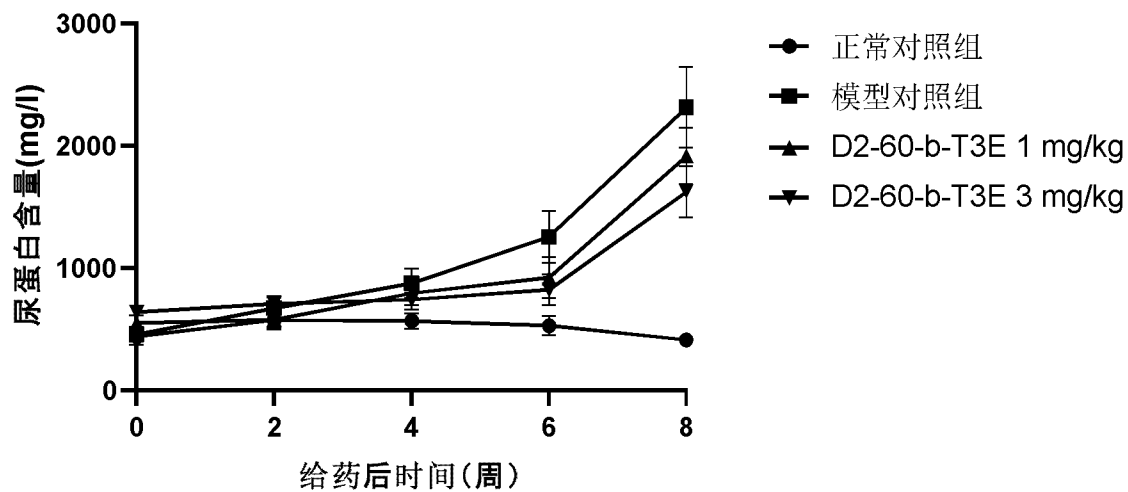


图 10

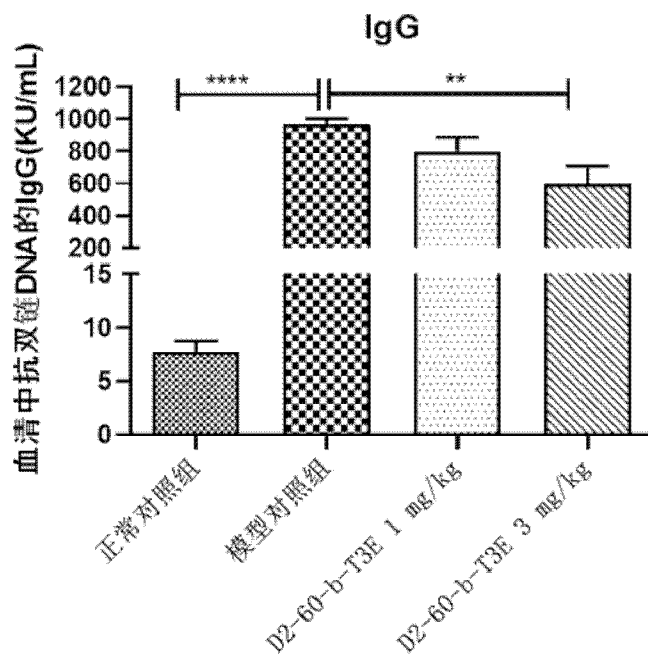


图 11A

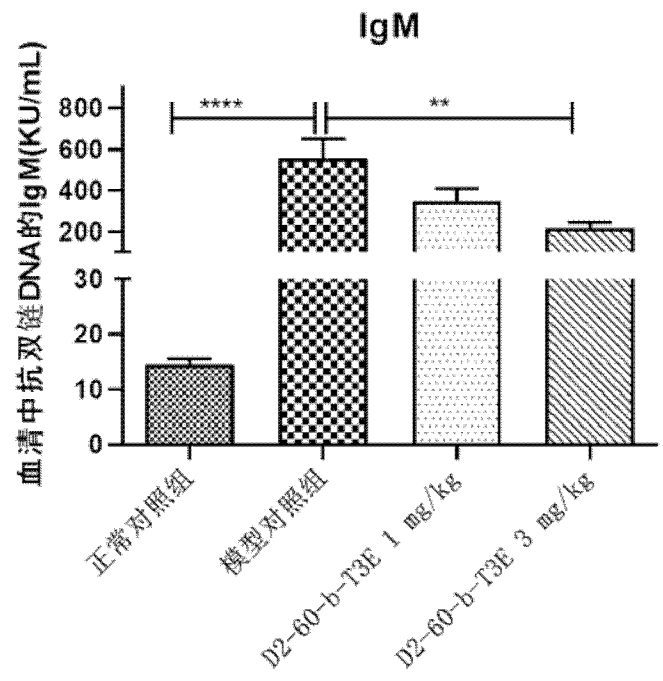


图 11B

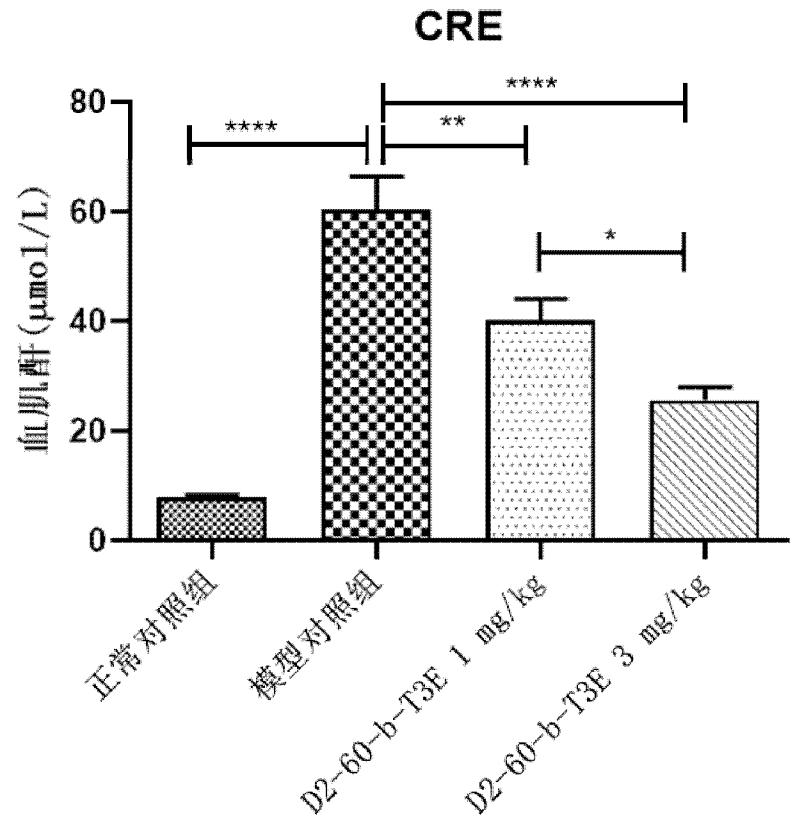


图 12A

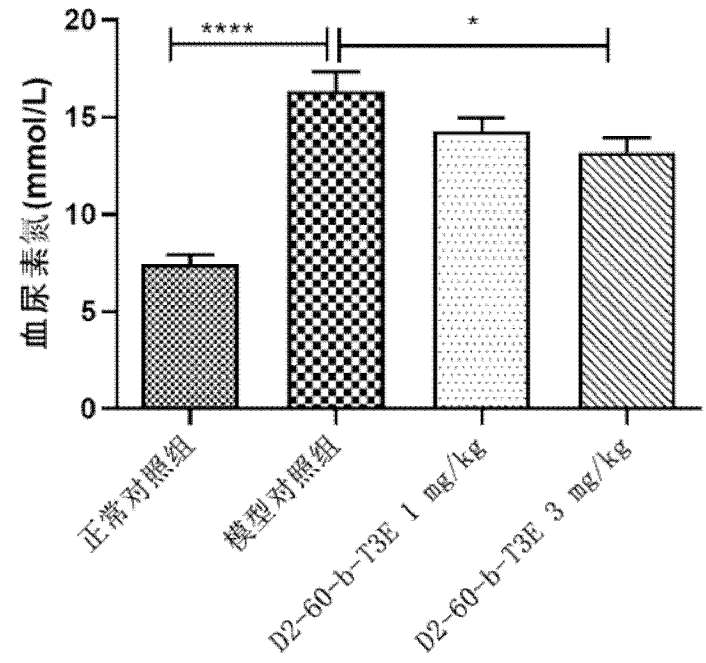


图 12B

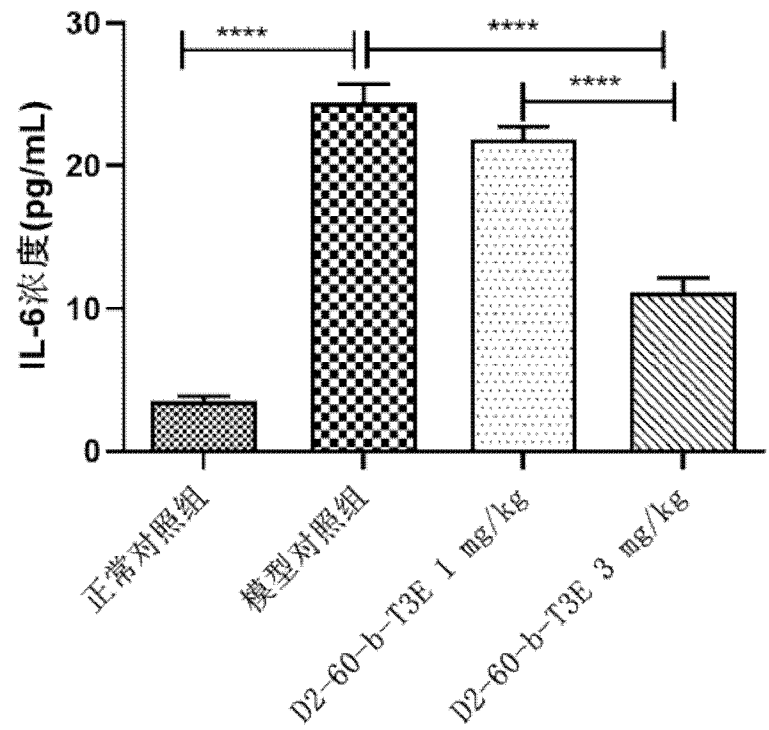


图 13A

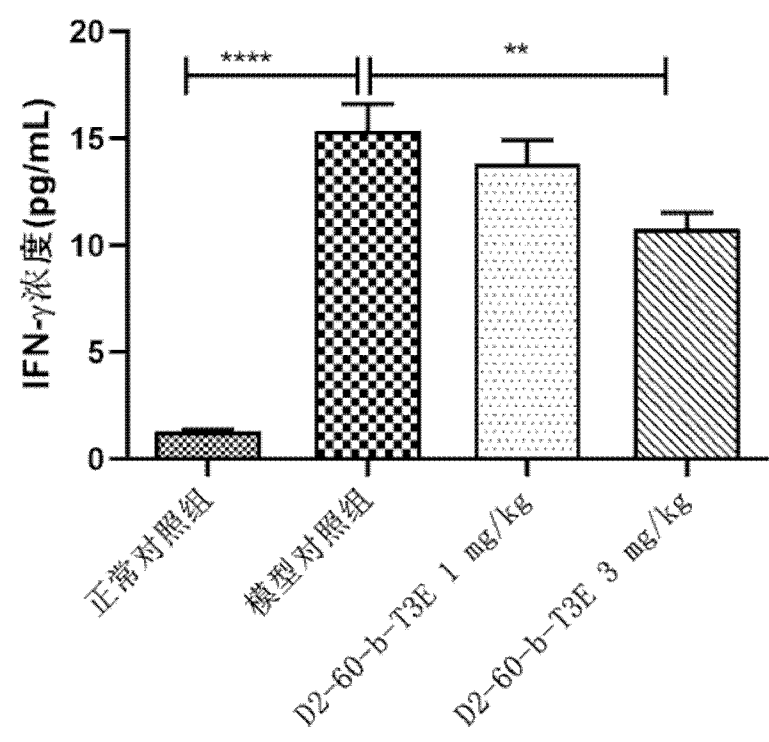


图 13B

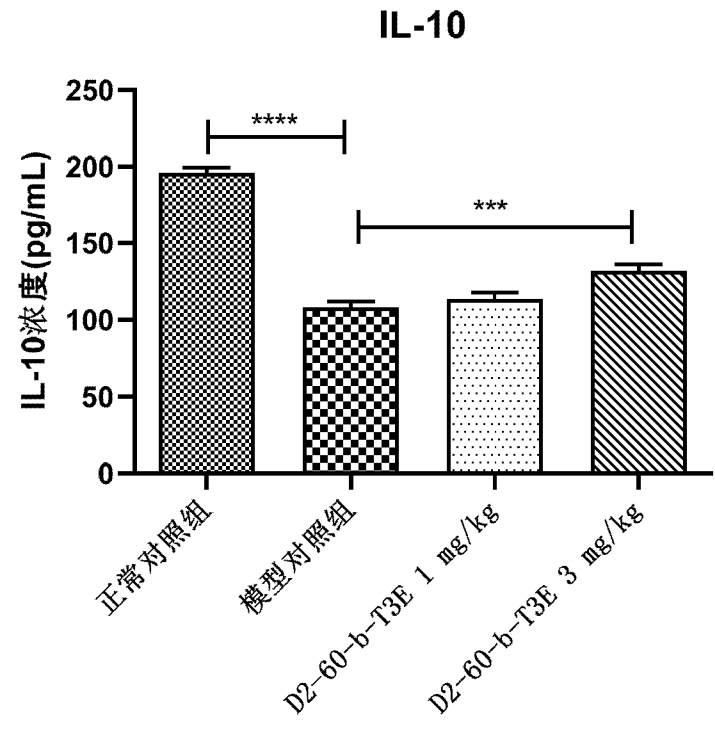


图 14

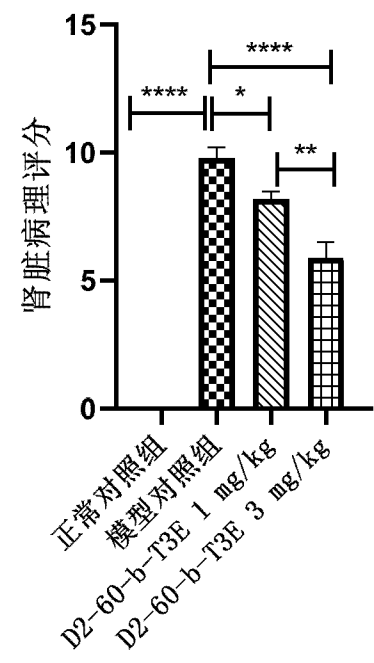


图 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/114858

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/24(2006.01)i; C07K 14/55(2006.01)i; A61K 39/00(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

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)

CNTEXT, WPABS, WPABSC, ENTXT, ENTXTC, DWPI, VEN, CNKI, PubMed, GenBank, STN, 中国专利生物序列数据库, Chinese Patent Biological Sequence Database: 融合蛋白, 抗体, 白介素2, 免疫细胞因子, 共价连接, 共价键, 自免疫疾病, fusion protein, antibodies, IL-2, Interleukin-2, immunocytokines, covalent binding, covalent bond, autoimmune diseases, SEQ ID NOs: 9-10, 37-42, 165-166

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 109071648 A (PFIZER INC. et al.) 21 December 2018 (2018-12-21) claims 1-29, and description, paragraphs 0117, 0197, and 0410-0435	1-10, 12-20
Y	WO 2021161287 A2 (AULOS BIOSCIENCE INC.) 19 August 2021 (2021-08-19) description, paragraphs 0004-0018 and 0137-0138	1-10, 12-20
Y	高瑞等 (GAO, Rui et al.). "抗体-细胞因子融合蛋白治疗肿瘤的前景 (Prospect of Antibody-Cytokine Fusion Proteins for the Therapy of Cancer)" <i>药物生物技术 (Pharmaceutical Biotechnology)</i> , Vol. 27, No. 2, 15 April 2020 (2020-04-15), pp. 182-188	1-10, 12-20
Y	王明皋 (WANG, Minggao). "抗体细胞因子融合蛋白的临床前研究进展 (Non-official translation: Advances in Preclinical Research of Antibody Cytokine Fusion Proteins)" <i>细胞与分子免疫学杂志 (Journal of Cellular and Molecular Immunology)</i> , Vol. 21, 31 December 2005 (2005-12-31), pp. S43-S45	1-10, 12-20
A	CN 112154153 A (BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY) 29 December 2020 (2020-12-29) entire document	1-20



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

10 November 2022

Date of mailing of the international search report

25 November 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/CN2022/114858

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014028748 A1 (IRM LLC.) 20 February 2014 (2014-02-20) entire document	1-20
A	LETOURNEAU, S. et al. "IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor α subunit CD25" <i>PNAS</i> , Vol. 107, No. 5, 02 February 2020 (2020-02-02), pp. 2171-2176	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/114858

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 table is an XML file of the standard ST.26.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/114858

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.: **20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 20 relates to a method for treating a disease or delaying the progression of a disease, falling within the scope defined in PCT Rule 39.1(iv) for which no search is required; however, a search was still conducted on the basis of a pharmaceutical use thereof.
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/CN2022/114858

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109071648	A	21 December 2018	JP	2018537962	A	27 December 2018
				US	2019106488	A1	11 April 2019
				KR	20180064541	A	14 June 2018
				CA	2946113	A1	23 April 2017
				TW	201722989	A	01 July 2017
				AU	2016340989	A1	26 April 2018
				WO	2017070561	A1	27 April 2017
				US	2017114130	A1	27 April 2017
				US	2021061902	A1	04 March 2021
				EP	3365369	A1	29 August 2018
WO	2021161287	A2	19 August 2021	CA	3166139	A1	19 August 2021
				AU	2021221287	A1	25 August 2022
				IL	295210	A	01 October 2022
CN	112154153	A	29 December 2020	TW	202003551	A	16 January 2020
				CL	2020002477	A1	12 March 2021
				US	2019300592	A1	03 October 2019
				IL	277288	A	29 October 2020
				EA	202092316	A1	25 May 2021
				SG	11202009017 W	A	29 October 2020
				US	2019359672	A1	28 November 2019
				KR	20200136453	A	07 December 2020
				AU	2019244091	A1	08 October 2020
				BR	112020018709	A2	05 January 2021
				PE	20210313	A1	12 February 2021
				CO	2020013246	A2	10 November 2020
				WO	2019191295	A1	03 October 2019
				JP	2021519094	A	10 August 2021
				AR	115024	A1	18 November 2020
				EP	3774861	A1	17 February 2021
				CA	3094112	A1	03 October 2019
WO	2014028748	A1	20 February 2014	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/114858

A. 主题的分类

C07K 16/24(2006.01)i; C07K 14/55(2006.01)i; A61K 39/00(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

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))

CNXTX, WPABS, WPABSC, ENTXT, ENTXTC, DWPI, VEN, CNKI, PubMed, GenBank, STN, 中国专利生物序列数据库, 融合蛋白, 抗体, 白介素2, 免疫细胞因子, 共价连接, 共价键, 自免疫疾病, fusion protein, antibodies, IL-2, Interleukin-2, immunocytokines, covalent binding, covalent bond, autoimmune diseases, SEQ ID NOs: 9-10, 37-42, 165-166

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 109071648 A (辉瑞有限公司等) 2018年12月21日 (2018 - 12 - 21) 权利要求1-29, 说明书第0117, 0197, 0410-0435段	1-10, 12-20
Y	W0 2021161287 A2 (AULOS BIOSCIENCE INC.) 2021年8月19日 (2021 - 08 - 19) 说明书第0004-0018, 0137-0138段	1-10, 12-20
Y	高瑞等. “抗体-细胞因子融合蛋白治疗肿瘤的前景” 药物生物技术, 第27卷, 第2期, 2020年4月15日 (2020 - 04 - 15), 第182-188页	1-10, 12-20
Y	王明杲. “抗体细胞因子融合蛋白的临床前研究进展” 细胞与分子免疫学杂志, 第21卷, 2005年12月31日 (2005 - 12 - 31), 第S43-S45页	1-10, 12-20
A	CN 112154153 A (百时美施贵宝公司) 2020年12月29日 (2020 - 12 - 29) 全文	1-20
A	W0 2014028748 A1 (IRM LLC.) 2014年2月20日 (2014 - 02 - 20) 全文	1-20

☒ 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11月10日

国际检索报告邮寄日期

2022年11月25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

李子东

电话号码 86-(10)-53961971

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	LETOURNEAU, S.等. "IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor α subunit CD25" PNAS, 第107卷, 第5期, 2020年2月2日 (2020 - 02 - 02), 第2171-2176页	1-20

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： 20
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20涉及治疗疾病或延缓疾病进展的方法，属于PCT细则第39.1(iv)项规定的不进行检索的范围，但仍然基于其制药用途进行了检索。
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/CN2022/114858

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	109071648	A	2018年12月21日	JP	2018537962	A	2018年12月27日
				US	2019106488	A1	2019年4月11日
				KR	20180064541	A	2018年6月14日
				CA	2946113	A1	2017年4月23日
				TW	201722989	A	2017年7月1日
				AU	2016340989	A1	2018年4月26日
				WO	2017070561	A1	2017年4月27日
				US	2017114130	A1	2017年4月27日
				US	2021061902	A1	2021年3月4日
				EP	3365369	A1	2018年8月29日
WO	2021161287	A2	2021年8月19日	CA	3166139	A1	2021年8月19日
				AU	2021221287	A1	2022年8月25日
				IL	295210	A	2022年10月1日
CN	112154153	A	2020年12月29日	TW	202003551	A	2020年1月16日
				CL	2020002477	A1	2021年3月12日
				US	2019300592	A1	2019年10月3日
				IL	277288	A	2020年10月29日
				EA	202092316	A1	2021年5月25日
				SG	11202009017W	A	2020年10月29日
				US	2019359672	A1	2019年11月28日
				KR	20200136453	A	2020年12月7日
				AU	2019244091	A1	2020年10月8日
				BR	112020018709	A2	2021年1月5日
				PE	20210313	A1	2021年2月12日
				CO	2020013246	A2	2020年11月10日
				WO	2019191295	A1	2019年10月3日
				JP	2021519094	A	2021年8月10日
				AR	115024	A1	2020年11月18日
				EP	3774861	A1	2021年2月17日
				CA	3094112	A1	2019年10月3日
WO	2014028748	A1	2014年2月20日	无			