

(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
2020年6月25日 (25.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/125743 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 14/55 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)
C07K 17/08 (2006.01) A61K 47/60 (2017.01)
C07K 19/00 (2006.01) A61K 47/62 (2017.01)
C12N 15/26 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)
C12N 15/63 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/126901

(22) 国际申请日: 2019年12月20日 (20.12.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201811570930.5 2018年12月21日 (21.12.2018) CN
201910158957.1 2019年3月4日 (04.03.2019) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE 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)。上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (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: 陈磊 (CHEN, Lei); 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)。胡齐悦 (HU, Qiyue); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。葛虎 (GE, Hu); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai

200245 (CN)。林源 (LIN, Yuan); 中国上海市浦东新区张江镇海科路1288号, Shanghai 201210 (CN)。王宏伟 (WANG, Hongwei); 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)。欧阳超 (OU, Yangchao); 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)。孔祥林 (KONG, Xianglin); 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)。廖成 (LIAO, Cheng); 中国上海市浦东新区张江镇海科路1288号, Shanghai 201210 (CN)。张连山 (ZHANG, Lianshan); 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19层程伟 (David W. Cheng), 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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,

(54) Title: HUMAN INTERLEUKIN-2 VARIANT OR DERIVATIVE THEREOF

(54) 发明名称: 一种人白细胞介素2变体或其衍生物

(57) Abstract: Provided is a human interleukin-2 (IL-2) variant having one or more amino acid mutations or a derivative thereof. The IL-2 variant or derivative thereof has increased stability compared to wild-type IL-2 and improved properties as an immunotherapeutic agent. Also disclosed are an immunoconjugate and a pharmaceutical composition which comprise the human IL-2 variant or derivative thereof, a polynucleotide molecule encoding same, a vector, a host cell and a preparation method therefor, as well as the pharmaceutical uses of the IL-2 variant or derivative thereof and the immunoconjugate or pharmaceutical composition comprising the L-2 variant or derivative thereof.

(57) 摘要: 提供了具有一个或多个氨基酸突变的人白细胞介素-2(IL-2)变体或其衍生物, 所述IL-2变体或其衍生物与野生型IL-2相比, 具有增加的稳定性, 并具有用作免疫治疗剂的改善特性。还公开了包含所述人IL-2变体或其衍生物的免疫缀合物、药物组合物、编码其的多核苷酸分子、载体、宿主细胞和制备方法, 以及所述IL-2变体或其衍生物、包含其的免疫缀合物或药物组合物的制药用途。

WO 2020/125743 A1

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))。

一种人白细胞介素 2 变体或其衍生物

技术领域

本公开涉及具有一个或多个氨基酸突变的人白细胞介素-2 (IL-2) 变体或其衍生物, 具体地, 所述人 IL-2 变体或其衍生物稳定性增加, 并作为免疫治疗剂具有改善的特性。本公开还涉及包含所述人 IL-2 变体或其衍生物的免疫缀合物、编码其的多核苷酸分子、载体、宿主细胞和制备方法, 以及包含所述 IL-2 变体或其衍生物、免疫缀合物的药物组合物及其治疗方法、制药用途。

背景技术

10 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。

15 最初的体外细胞实验表明 T 细胞在通过 TCR 和 CD28 活化之后, 可以分泌 IL-2 并在细胞表面表达 IL-2 受体 (IL-2R)。IL-2 和其受体的结合可以引起 T 细胞的增殖和使 T 细胞产生效应。这一模型使得 IL-2 成为 T 细胞免疫反应中起到中心作用的一个分子。不过随后的体内实验发现在敲除 IL-2 或其受体后, 动物产生了自身免疫。随后的实验表明 IL-2 不仅可以激活如 T 细胞和 NK 细胞的效应细胞, 还可以激活调节性 T 细胞 (Treg), 从而抑制过量的针对自身的免疫。

20 IL-2 通过 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, 但可以促进 IL-2 与 IL-2R β 和 IL-2R γ 的结合。IL-2R γ 在所有免疫细胞中均有表达; IL-2R β 在 CD8⁺ T 细胞、NK 细胞、Treg 中均有表达, 而且在 T 细胞被激活后还会提升表达水平; IL-2R α 在 Treg 持续高表达, 在被激活的 CD8⁺ T 细胞中会有短暂表达, 随即下调表达水平。

30 IL-2 主要由活化的 T 细胞, 尤其是 CD4⁺ 辅助 T 细胞合成。它刺激 T 细胞的增殖和分化, 诱导细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的生成以及外周血淋巴细胞分化成细胞毒性细胞和淋巴因子激活的杀伤 (LAK) 细胞, 促进 T 细胞表达细胞因子和细胞溶解分子, 促进 B 细胞的增殖和分化以及通过 B 细胞的免疫球蛋白合成, 并刺激天然杀伤 (NK) 细胞的生成、增殖和活化。

35

IL-2 在体内扩充淋巴细胞群体和提高这些细胞的效应器功能的能力使得其具有抗肿瘤效果，IL-2 免疫疗法成为某些转移性癌症患者的治疗选择，目前，高剂量 IL-2 已被批准用于治疗转移性肾细胞癌和恶性黑素瘤。

已有的 IL-2 变体研究显示，在 38、42、45、62、68 位中的至少四个位点具有突变的 IL-2 变体，对 Treg 的刺激作用降低 (WO2012062228)；同时包含 72、42、45 位突变的 IL-2 变体，对高结合力 IL-2 受体的结合力降低或消除，但仍保留对中等结合力 IL-2 受体的结合力 (CN201280017730.1)；在 91、126 位突变的变体，所述突变使得 IL-2 能与 CD25(IL2R α) 结合，但不激活 Treg 上的 IL-2R(US8906356)；至少包含一个 E15、H16、Q22、D84、N88 或 E95 突变的 IL-2R，用于治疗受试者中移植物抗宿主病 (US9732134)；至少包含 R38W 的 IL-2 变体能降低血管通透性，治疗实体瘤 (US7371371；US7514073；US8124066；US7803361)；IL-2 变体与 Fc 的融合蛋白治疗疾病，所述 IL-2 存在 N88R 突变 (WO2016014428)；hIL-2-N88R 可以选择性地活化 T 细胞而非天然杀伤细胞并且能够降低肺中的转移形成 (WO 99/60128)；20、88 或 126 位突变的 IL-2 可以制备用于治疗 and/或预防自身免疫性疾病的药物 (WO2009135615)；嵌合多肽，包含连接在免疫细胞表面蛋白靶向配体上的细胞因子，其中细胞因子可以为 IL-2 的变体 (WO2017136818) 等。

然而，本领域中仍然缺少具有更高稳定性的 IL-2 变体。提供这样的 IL-2 变体及其衍生物，以增强 IL-2 的治疗有效性，是本领域中亟需解决的问题。

20

发明内容

本公开提供具有一个或多个氨基酸突变的 IL-2 变体或其衍生物，及 IL-2 变体或其衍生物的缀合物、编码多肽和核酸分子、载体、宿主细胞、药物组合物、制药用途和治疗方法。

第一方面，本公开提供 IL-2 变体或其衍生物，其是在野生型人 IL-2 的第 11、26、27、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、70、71、72、78、82、88、132 位具有一个或多个氨基酸突变。本公开对于突变的表示方式为 abc，其中 a 为突变前的氨基酸类型，b 为突变位点，c 为突变后的氨基酸类型。例如，N26S，即第 26 位由天冬酰胺 (N) 突变为丝氨酸 (S)；N26 为第 26 位的天冬酰胺 (N) 发生突变；26S 为第 26 位突变为丝氨酸 (S)。

具体地，本公开提供的 IL-2 变体或其衍生物含有以下位点上的一个或多个氨基酸突变或其任意组合：26、29、30、71、11、132、70、82、27、78 位。在一些实施方案中，突变前的氨基酸 (例如野生型人 IL-2 中的) 为：26 位为天冬酰胺 (N)、29 位为天冬酰胺 (N)、30 位为天冬酰胺 (N)、71 位为天冬酰胺 (N)、11 位为谷氨酰胺 (Q)、132 位为亮氨酸 (L)、70 位为亮氨酸 (L)、82 位为脯氨酸

35

(P)、27 位为甘氨酸 (G)、78 位为苯丙氨酸 (F)。在一些实施方案中, IL-2 变体或其衍生物的氨基酸突变方式为包含以下的任一或任意组合: 26 位突变为 Gln (Q)、29 位突变为丝氨酸 (S)、30 位突变为 Ser (S)、71 位突变为 Gln (Q), 11、132、70、82、27、78 位突变为 Cys (C)。

5 在一些具体实施方案中, IL-2 变体或其衍生物包含第一类突变, 所述第一类突变为如下 (1) - (7) 任一所示或其任意组合:

- (1) N26Q,
- (2) N29S,
- (3) N30S,
- 10 (4) N71Q,
- (5) Q11C 和 L132C,
- (6) L70C 和 P82C, 和
- (7) G27C 和 F78C。

15 在一些具体实施方案中, 上述 IL-2 变体或其衍生物具有增加的稳定性, 例如, 增加的脱氨稳定性和/或热稳定性; 具体地, 本公开提供的第一类突变是包含所述突变的 IL-2 变体或其衍生物与野生型 IL-2 相比具有增加的稳定性, 包括但不限于, 具有增加的脱氨稳定性和/或热稳定性。

20 在另一方面, 本公开提供的 IL-2 变体或其衍生物还含有如下位点上的一个或多个氨基酸突变或其任意组合: 29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、72。在一些实施方案中, 突变前的氨基酸 (例如野生型人 IL-2 中的) 为: 29 位为天冬酰胺 (N)、30 位为天冬酰胺 (N)、31 位为酪氨酸 (Y)、32 位为赖氨酸 (K)、33 位为天冬酰胺 (N)、34 位为脯氨酸 (P)、35 位为赖氨酸 (K)、36 位为亮氨酸 (L)、37 位为苏氨酸 (T)、38 位为精氨酸 (R)、39 位为甲硫氨酸 (M)、40 位为亮氨酸 (L)、41 位为苏氨酸 (T)、42 25 位为苯丙氨酸 (F)、43 位为赖氨酸 (K)、44 位为苯丙氨酸 (F)、45 位为酪氨酸 (Y)、72 位为亮氨酸 (L)。

在一些具体实施方案中, IL-2 变体或其衍生物还包含第二类突变, 所述第二类突变选自 (8) - (11) 中任一项所示的突变或 (8) - (10) 的任意组合:

- (8) F42A,
- 30 (9) Y45A,
- (10) L72G, 和
- (11) 29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL。

35 一些实施方案中, 所述第二类突变能够消除或降低 IL-2 对高亲和力受体 (IL-2R α / β / γ) 的亲和力, 并保留 IL-2 对中等亲和力受体 (IL-2R β / γ) 的亲和力; 第二类突变能够保留 IL-2 对效应细胞 (如 NK 和 T 细胞) 的诱导增殖和激活功能, 但降低 IL-2 对 Treg 细胞的诱导增殖和激活功能。

在第三方面，本公开提供的 IL-2 变体或其衍生物含有如下位点上的一个或多个氨基酸突变或其任意组合：20、88、126。一些实施方案中，突变前的氨基酸（例如野生型人 IL-2 中的）为：20 位为天冬氨酸（D）、88 位为天冬酰胺（N）、126 位为谷氨酰胺（Q）。在一些实施方案中，IL-2 变体或其衍生物的氨基酸突变方式为包含以下的任一项或其任意组合：20 位突变为丙氨酸（A）或组氨酸（H）或异亮氨酸（I）或甲硫氨酸（M）或谷氨酸（E）或丝氨酸（S）或缬氨酸（V）或色氨酸（W）、88 位突变为丙氨酸（A）或精氨酸（R）或谷氨酸（E）或亮氨酸（L）或苯丙氨酸（F）或甘氨酸（G）或异亮氨酸（I）或甲硫氨酸（M）或丝氨酸（S）或 Y 或缬氨酸（V）、126 位突变为天冬酰胺（N）或亮氨酸（L）或 P 或苯丙氨酸（F）或甘氨酸（G）或异亮氨酸（I）或甲硫氨酸（M）或精氨酸（R）或丝氨酸（S）或苏氨酸（T）或酪氨酸（Y）或缬氨酸（V）。

在一些具体实施方案中，IL-2 变体或其衍生物还包含第三类突变，其选自 (12) - (14) 任一项所示的突变或其任意组合：

- (12) N88 突变为 A、R、E、L、F、G、I、M、S、Y、V 或 D，
- (13) D20 突变为 A、H、I、M、E、S、V、W 或 Y，
- (14) Q126 突变为 N、L、P、F、G、I、M、R、S、T、Y、V。

一些实施方案中，所述第三类突变能够降低 IL-2 对高亲和力受体（IL-2R α / β / γ ）和中等亲和力受体（IL-2R β / γ ）的亲和力，但对高亲和力受体的亲合力比中等亲和力受体的亲合力降低得更多；第三类突变能够保留 IL-2 对 Treg 的诱导增殖和激活功能，但消除或降低 IL-2 对效应细胞（如 NK 和 T 细胞）的诱导增殖和激活功能。

一些实施方案中，IL-2 变体或其衍生物含有如上所述的第一类突变和第二类突变，或含有第一类突变和第三类突变。

一些实施方案中，IL-2 变体或其衍生物中的第一类突变选自 (15) - (17)，或 (15) - (17) 中的任一项与前述 (5) - (7) 中的任一项的组合：

- (15) N26Q 和 N29S，
- (16) N26Q、N29S 和 N71Q，和
- (17) N26Q 和 N30S；

第二类突变选自 (18) - (20) 和 (11) 中的任一项：

- (18) F42A 和 Y45A，
- (19) F42A 和 L72G，和
- (20) Y45A 和 L72G；

第三类突变为 N88R 或 N88G 或 N88I 或 N88D。

一些实施方案中，IL-2 变体或其衍生物包含选自 (21) - (29) 中任一项所示的突变：

- (21) N26Q、N29S、F42A、N71Q 和 L72G，

- (22) N26Q、N29S 和 N88R,
 (23) N26Q、N29S、F42A 和 L72G,
 (24) N26Q、N30S、F42A 和 L72G,
 (25) Q11C、N26Q、N30S、F42A、L72G 和 L132C,
 5 (26) N26Q、N30S、F42A、L70C、L72G 和 P82C,
 (27) N26Q、G27C、N30S、F42A、L72G 和 F78C,
 (28) N29S、F42A 和 L72G, 和
 (29) Q11C、29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL 和
 L132C。

10 除上述 (1) - (29) 外, 本公开还提供如下 IL-2 变体, 其具有 (1) - (20) 中
 突变位点、突变类型的任意组合方式, 包括但不限于如下的 (30) - (208) :

- (30) N26Q/Q11C/L132C;
 (31) N26Q/L70C/P82C;
 (32) N26Q/G27C/F78C;
 15 (33) N26Q/29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL;
 (34) N26Q/F42A/Y45A;
 (35) N26Q/F42A/L72G;
 (36) N26Q/Y45A/L72G;
 (37) N26Q/F42A/Y45A/L72G;
 20 (38) Q11C/N30S/L132C;
 (39) N30S/L70C/P82C;
 (40) G27C/N30S/F78C;
 (41) N30S/F42A/Y45A;
 (42) N30S/F42A/L72G;
 25 (43) N30S/Y45A/L72G;
 (44) N30S/F42A/Y45A/L72G;
 (45) N29S/N30S/F42A/L72G;
 (46) Q11C/F42A/Y45A;
 (47) Q11C/F42A/L72G/L132C;
 30 (48) Q11C/Y45A/L72G/L132C;
 (49) Q11C/F42A/Y45A/L72G/L132C;
 (50) Q11C/N29S/F42A/L72G/L132C;
 (51) 29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/L70C/P82C;
 (52) F42A/Y45A/L70C/P82C;
 35 (53) F42A/L70C/L72G/P82C;
 (54) Y45A/L70C/L72G/P82C;

- (55) F42A/Y45A/L70C/L72G/P82C;
(56) N29S/F42A/L70C/L72G/P82C;
(57) G27C/29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/F78C;
(58) G27C/F42A/Y45A/F78C;
5 (59) G27C/F42A/L72G/F78C;
(60) G27C/Y45A/L72G/F78C;
(61) G27C/F42A/Y45A/L72G/F78C;
(62) G27C/N29S/F42A/L72G/F78C;
(63) 29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/Y45A;
10 (64) 29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/L72G;
(65) 29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/Y45A/L72G;
(66) N26Q/N30S/Q11C/L132C;
(67) N26Q/N30S/L70C/P82C;
(68) N26Q/G27C/N30S/F78C;
15 (69) N26Q/N30S/F42A/Y45A;
(70) N26Q/N30S/F42A/L72G;
(71) N26Q/N30S/Y45A/L72G;
(72) N26Q/N30S/F42A/Y45A/L72G;
(73) N26Q/N29S/N30S/F42A/L72G;
20 (74) N26Q/N29S/N30S;
(75) N26Q/N29S/Q11C/L132C;
(76) N26Q/N29S/L70C/P82C;
(77) N26Q/N29S/G27C/F78C;
(78) N26Q/N29S/F42A/Y45A;
25 (79) N26Q/N29S/Y45A/L72G;
(80) N26Q/N29S/F42A/Y45A/L72G;
(81) Q11C/N29S/N30S/L132C;
(82) N29S/N30S/L70C/P82C;
(83) G27C/N29S/N30S/F78C;
30 (84) N29S/N30S/F42A/Y45A;
(85) N29S/N30S/F42A/L72G;
(86) N29S/N30S/Y45A/L72G;
(87) N29S/N30S/F42A/Y45A/L72G;
(88) Q11C/N29S/F42A/Y45A/L132C;
35 (89) Q11C/N29S/F42A/L72G/L132C;
(90) Q11C/N29S/Y45A/L72G/L132C;

- (91) Q11C/N29S/F42A/Y45A/L72G/L132C;
(92) N29S/F42A/Y45A/L70C/P82C;
(93) N29S/F42A/L70C/L72G/P82C;
(94) N29S/Y45A/L70C/L72G/P82C;
5 (95) N29S/F42A/Y45A/L70C/L72G/P82C;
(96) G27C/N29S/F78C/F42A/Y45A;
(97) G27C/N29S/F78C/F42A/L72G;
(98) G27C/N29S/F78C/Y45A/L72G;
(99) G27C/N29S/F78C/F42A/Y45A/L72G;
10 (100) N29S/F42A/Y45A;
(101) N29S/F42A/L72G;
(102) N29S/Y45A/L72G;
(103) N29S/F42A/Y45A/L72G;
(104) Q11C/N29S/L132C;
15 (105) N29S/L70C/P82C;
(106) G27C/N29S/F78C;
(107) N29S/N30S;
(108) N26Q/N29S;
(109) N26Q/N71Q;
20 (110) N30S/N71Q;
(111) Q11C/N71Q/L132C;
(112) L70C/N71Q/P82C;
(113) G27C/N71Q/F78C;
(114) 29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/N71Q;
25 (115) F42A/Y45A/N71Q;
(116) F42A/N71Q/L72G;
(117) Y45A/N71Q/L72G;
(118) N26Q/N30S/F42A/N71Q/L72G;
(119) Q11C/N26Q/N30S/F42A/N71Q/L72G/L132C;
30 (120) N26Q/N30S/F42A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
(121) N26Q/G27C/N30S/F42A/N71Q/L72G/F78C;
(122) N29S/F42A/N71Q/L72G;
(123) N26Q/N30S/N71Q;
(124) N26Q/Q11C/N71Q/L132C;
35 (125) N26Q/L70C/N71Q/P82C;
(126) N26Q/G27C/N71Q/F78C;

- (127) N26Q/29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/N71Q;
- (128) N26Q/F42A/Y45A/N71Q;
- (129) N26Q/F42A/N71Q/L72G;
- (130) N26Q/Y45A/N71Q/L72G;
- 5 (131) N26Q/F42A/Y45A/N71Q/L72G;
- (132) Q11C/N30S/N71Q/L132C;
- (133) N30S/L70C/N71Q/P82C;
- (134) G27C/N30S/N71Q/F78C;
- (135) N30S/F42A/Y45A/N71Q;
- 10 (136) N30S/F42A/N71Q/L72G;
- (137) N30S/Y45A/N71Q/L72G;
- (138) N30S/F42A/Y45A/N71Q/L72G;
- (139) N29S/N30S/F42A/N71Q/L72G;
- (140) Q11C/F42A/Y45A/N71Q;
- 15 (141) Q11C/F42A/N71Q/L72G/L132C;
- (142) Q11C/Y45A/N71Q/L72G/L132C;
- (143) Q11C/F42A/Y45A/N71Q/L72G/L132C;
- (144) Q11C/N29S/F42A/N71Q/L72G/L132C;
- (145) 29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为
- 20 QSMHIDATL/L70C/N71Q/P82C;
- (146) F42A/Y45A/L70C/N71Q/P82C;
- (147) F42A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
- (148) Y45A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
- (149) F42A/Y45A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
- 25 (150) N29S/F42A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
- (151) G27C/29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为
- QSMHIDATL/N71Q/F78C;
- (152) G27C/F42A/Y45A/N71Q/F78C;
- (153) G27C/F42A/N71Q/L72G/F78C;
- 30 (154) G27C/Y45A/N71Q/L72G/F78C;
- (155) G27C/F42A/Y45A/N71Q/L72G/F78C;
- (156) G27C/N29S/F42A/N71Q/L72G/F78C;
- (157) 29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/Y45A/N71Q;
- (158) 29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/N71Q/L72G;
- 35 (159) 29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为
- QSMHIDATL/Y45A/N71Q/L72G;

- (160) N26Q/N30S/Q11C/N71Q/L132C;
(161) N26Q/N30S/L70C/N71Q/P82C;
(162) N26Q/G27C/N30S/N71Q/F78C;
(163) N26Q/N30S/F42A/Y45A/N71Q;
5 (164) N26Q/N30S/F42A/N71Q/L72G;
(165) N26Q/N30S/Y45A/N71Q/L72G;
(166) N26Q/N30S/F42A/Y45A/N71Q/L72G;
(167) N26Q/N29S/N30S/F42A/N71Q/L72G;
(168) N26Q/N29S/N30S/N71Q;
10 (169) N26Q/N29S/Q11C/N71Q/L132C;
(170) N26Q/N29S/L70C/N71Q/P82C;
(171) N26Q/N29S/G27C/N71Q/F78C;
(172) N26Q/N29S/F42A/Y45A/N71Q;
(173) N26Q/N29S/Y45A/N71Q/L72G;
15 (174) N26Q/N29S/F42A/Y45A/N71Q/L72G;
(175) Q11C/N29S/N30S/N71Q/L132C;
(176) N29S/N30S/L70C/N71Q/P82C;
(177) G27C/N29S/N30S/N71Q/F78C;
(178) N29S/N30S/F42A/Y45A/N71Q;
20 (179) N29S/N30S/F42A/N71Q/L72G;
(180) N29S/N30S/Y45A/N71Q/L72G;
(181) N29S/N30S/F42A/Y45A/N71Q/L72G;
(182) Q11C/N29S/F42A/Y45A/N71Q/L132C;
(183) Q11C/N29S/F42A/N71Q/L72G/L132C;
25 (184) Q11C/N29S/Y45A/N71Q/L72G/L132C;
(185) Q11C/N29S/F42A/Y45A/N71Q/L72G/L132C;
(186) N29S/F42A/Y45A/L70C/N71Q/P82C;
(187) N29S/F42A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
(188) N29S/Y45A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
30 (189) N29S/F42A/Y45A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
(190) G27C/N29S/F78C/F42A/Y45A/N71Q;
(191) G27C/N29S/F78C/F42A/N71Q/L72G;
(192) G27C/N29S/F78C/Y45A/N71Q/L72G;
(193) G27C/N29S/F78C/F42A/Y45A/N71Q/L72G;
35 (194) N29S/F42A/Y45A/N71Q;
(195) N29S/F42A/N71Q/L72G;

- (196) N29S/Y45A/N71Q/L72G;
- (197) N29S/F42A/Y45A/N71Q/L72G;
- (198) Q11C/N29S/N71Q/L132C;
- (199) N29S/L70C/N71Q/P82C;
- 5 (200) G27C/N29S/N71Q/F78C;
- (201) N29S/N30S/N71Q;
- (202) N26Q/N29S/N71Q;
- (203) N26Q/N88R;
- (204) N29S/N88R;
- 10 (205) N30S/N88R;
- (206) N26Q/N88R/Q11C/L132C;
- (207) N29S/N88R/L70C/P82C; 和

(208) N30S/N88R/G27C/F78C; 其中, “/”表示在同一个 IL-2 变体中, 所述突变是同时存在的。一些实施方案中, 上述突变是相对于野生型 IL-2 发生的突变, 所述野生型 IL-2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。突变的位点编号根据 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列从第 2 位的氨基酸 A 开始计数。

在一些实施方式中, 所述的 IL-2 变体或其衍生物包含选自 SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.18、SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.22、SEQ ID NO.24、SEQ ID NO.26、SEQ ID NO.28、SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.32、SEQ ID NO.34、SEQ ID NO.36 和 SEQ ID NO. 41 任一项所示的氨基酸。所述多肽的氨基酸和对应的核苷酸序列号如表 1 所示 (下划线为突变氨基酸):

表 1. IL-2 变体氨基酸序列和核酸序列

编号	突变位点	人 IL-2 野生型及变体氨基酸序列	对应的核酸序列号
IL-2-WT	野生型	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:2)	SEQ ID NO:1
IL-2-01	N26Q	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL <u>Q</u> G INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR	SEQ ID NO:3

		DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:4)	
IL-2-02	N30S	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNG IN <u>S</u> YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:6)	SEQ ID NO:5
IL-2-03	Q11C/L132C	MAPTSSSTKKT <u>C</u> LQLEHLLLDLQMILNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIIST <u>C</u> T (SEQ ID NO:8)	SEQ ID NO:7
IL-2-04	L70C/P82C	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEE <u>V</u> CNLAQSKNFHLR <u>C</u> R DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:10)	SEQ ID NO:9
IL-2-05	G27C/F78C	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN <u>C</u> INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN <u>C</u> HRLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:12)	SEQ ID NO:11
IL-2-06	29-44 位由 NNYKNPKLT RMLTFKF 突变为 QSMHIDATL	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNG <u>IQSMHIDATL</u> YMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:14)	SEQ ID NO:13
IL-2-07	F42A/Y45A	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNG INNYKNPKLTRMLT <u>A</u> K <u>F</u> A <u>M</u> PKKATELK	SEQ ID NO:15

		HLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:16)	
IL-2-08	F42A/L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNG INNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELK HLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:18)	SEQ ID NO:17
IL-2-09	Y45A/L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNG INNYKNPKLTRMLTFKFA ^u MPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO:19
IL-2-10	N26Q/N30S/ F42A/L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL ^o IN ^s YKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:22)	SEQ ID NO:21
IL-2-11	Q11C/N26Q/N 30S/F42A/ L72G/L132C	MAPTSSSTKKTCLQLEHLLLDLQMIL ^o IN ^s YKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIIST ^c T (SEQ ID NO:24)	SEQ ID NO:23
IL-2-12	N26Q/N30S/ F42A/L70C/ L72G/P82C	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL ^o IN ^s YKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEV ^c NGAQSKNFHLR ^c R DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:26)	SEQ ID NO:25

<p>IL-2-13</p>	<p>N26Q/G27C/ N30S/F42A/ L72G/F78C</p>	<p>MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL<u>QC</u> IN<u>S</u>YKNPKLTRMLT<u>A</u>KFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLN<u>G</u>AQSKN<u>C</u>HLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:28)</p>	<p>SEQ ID NO:27</p>
<p>IL-2-14</p>	<p>N29S/F42A /L72G</p>	<p>MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNG <u>I</u>SYKNPKLTRMLT<u>A</u>KFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLN<u>G</u>AQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:30)</p>	<p>SEQ ID NO:29</p>
<p>IL-2-21</p>	<p>N26Q/N29S/F 42A/L72G</p>	<p>MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL<u>QG</u> <u>I</u>SYKNPKLTRMLT<u>A</u>KFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLN<u>G</u>AQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:32)</p>	<p>SEQ ID NO:31</p>
<p>IL-2-22</p>	<p>N26Q/N29S/F 42A/N71Q/L7 2G</p>	<p>MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL<u>QG</u> <u>I</u>SYKNPKLTRMLT<u>A</u>KFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVL<u>Q</u>GQAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:34)</p>	<p>SEQ ID NO:33</p>
<p>IL-2-23</p>	<p>Q11C/29-44 位 的 NNYKNPKLT RMLTFKF 突 变 为 QSMHIDATL/ L132C</p>	<p>MAPTSSSTKKT<u>C</u>LQLEHLLLDLQMILNG <u>I</u>QSMHIDATL<u>L</u>YMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFAQSIIST<u>C</u>T (SEQ ID NO:36)</p>	<p>SEQ ID NO:35</p>
<p>IL-2-24</p>	<p>N26Q/N29S/N 88R</p>	<p>MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL<u>QG</u> <u>I</u>SYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELK HLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLIS<u>R</u>INVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFAQSIISTLT</p>	<p>SEQ ID NO:40</p>

		(SEQ NO ID.41)	
--	--	----------------	--

(注：上述的突变位点编号按 SEQ ID NO: 2 所示的人 IL-2 成熟蛋白编号计算，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。其中，“/”表示在同一个 IL-2 变体中，所述突变是同时存在的。所有变体均可以含有或不含有 C125A，含有 C125A 是避免形成二聚体。)

- 5 在一些实施方案中，IL-2 变体的衍生物包括涉及本公开 IL-2 变体的全长、部分蛋白或在本公开 IL-2 变体的基础上进一步突变获得的突变蛋白，功能性衍生物，功能性片段，生物活性肽，融合蛋白，同种型或其盐。例如，包含 IL-2 变体的融合蛋白，所述 IL-2 变体的单体或二聚物或三聚物或多聚物，所述 IL-2 变体的各种修饰形式（如 PEG 化，聚乙二醇化，糖基化，白蛋白缀合或融合，Fc 融合或缀和，
- 10 羟乙基化，去除 O-糖基化等），以及所述 IL-2 变体在各物种中的同源物。所述 IL-2 的修饰不会导致对治疗相关的免疫原性的不利影响。

- 在一些实施方案中，IL-2 变体或衍生物是 PEG 化的（可以表示为 PEG-IL-2），例如是单或双 PEG 化的 IL-2 变体或衍生物。PEG-IL-2 变体或衍生物包括 SC-PEG 连接基。在另一些实施方案中，PEG-IL-2 变体或衍生物包括甲氧基-PEG-醛
- 15 (mPEG-ALD) 连接基。在某些实施方案中，PEG 部分的平均分子量在约 5KD 至约 50KD，具体地 5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50 KD；或约 5KD 至约 40KD，或约 10KD 至约 30KD，或约 10KD 至约 30KD 之间，或约 15KD 至约 20KD 之间。某些具体实施方案中，mPEG-ALD 连接基包括具有选自下列平均分子量的 PEG 分子：约 5KDa、约 12KDa
- 20 或约 20KDa。在某些实施方案中，mPEG-ALD 的醛基可以是乙醛、丙醛或丁醛等。在一个实施方案中，IL-2 变体或其衍生物相比于野生型 IL-2 或其衍生物具有延长的血清半衰期。

- 当 IL-2 变体或其衍生物包含第二类突变时，一些实施方案中，IL-2 变体或其衍生物能引发一种或多种选自下组的细胞应答：激活的 T 淋巴细胞中的增殖、激活的 T 淋巴细胞中的分化、细胞毒性 T 细胞 (CTL) 活性、激活的 B 细胞中的增殖、
- 25 激活的 B 细胞中的分化、天然杀伤 (NK) 细胞中的增殖、NK 细胞中的分化、通过激活的 T 细胞或 NK 细胞的细胞因子分泌、和 NK/淋巴细胞激活的杀伤细胞 (LAK) 抗肿瘤细胞毒性。一些实施方案中，IL-2 变体或其衍生物与野生型 IL-2 多肽相比具有降低的诱导调节性 T 细胞中 IL-2 信号传导的能力。在一个实施方案中，IL-2
- 30 变体或其衍生物相比于野生型 IL-2 或其衍生物诱导 T 细胞中更少的激活诱导的细胞死亡 (AICD)。一些具体实施方案中，IL-2 变体或其衍生物相比于野生型 IL-2 或其衍生物具有减小的体内毒性。

当 IL-2 变体或其衍生物包含第三类突变时，一些实施方案中，IL-2 变体或其衍

生物能够降低 IL-2 对高亲和力受体 (IL-2R α / β / γ) 和中等亲和力受体 (IL-2R β / γ) 的亲和力, 但对高亲和力受体的亲合力比对中等亲和力受体的亲合力降低得更多。一些实施方案中, IL-2 变体或其衍生物能够保留 IL-2 对 Treg 的诱导增殖和激活功能, 但消除或降低 IL-2 对效应细胞 (如 NK 和 T 细胞) 的诱导增殖和激活功能。

在另一方面, 本公开提供 IL-2 变体或其衍生物直接或通过接头间接地与非 IL-2 模块连接的连接体或缀合物。一些实施方案中, 其为免疫缀合物, 其中, 非 IL-2 模块为抗原结合模块。一些实施方案中, 所述抗原结合模块靶向肿瘤细胞上呈现的或肿瘤细胞环境中的抗原。

一些实施方案中, IL-2 变体连接于至少一个非 IL-2 模块。一些实施方案中, IL-2 变体和非 IL-2 模块形成融合蛋白, 即 IL-2 变体与非 IL-2 模块共享肽键。一些实施方案中, IL-2 变体连接于至少一个非 IL-2 模块, 例如第一和第二非 IL-2 模块。一些实施方案中, 非 IL-2 模块为抗原结合模块。一些实施方案中, IL-2 变体与第一抗原结合模块共享氨基或羧基端肽键, 且第二抗原结合模块与以下共享氨基或羧基端肽键: i) IL-2 变体或 ii) 第一抗原结合模块。一些具体的实施方案中, IL-2 变体与所述第一非 IL-2 模块共享羧基端肽键, 而与所述第二非 IL-2 模块共享氨基末端肽键。一些实施方案中, 所述非 IL-2 模块是抗原结合模块。所述抗原结合模块可以是抗体或抗原结合片段, 包括但不限于免疫球蛋白分子 (例如 IgG (例如 IgG1) 类免疫球蛋白分子)、抗体或其抗原结合片段。一些具体实施方案中, 抗体或其抗原结合片段选自包含抗体重链可变区和抗体轻链可变区的多肽复合物、Fab、Fv、sFv、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 tetrabody、串联二-scFv、串联三-scFv)。在 IL-2 变体连接于超过一个抗原结合模块例如第一和第二抗原结合模块的情况下, 每个抗原结合模块可以独立地选自各种形式的抗体和抗原结合片段, 例如, 第一抗原结合模块可以是 Fab 分子, 而第二抗原结合模块可以是 scFv 分子, 或第一和第二抗原结合模块中的每一个都是 scFv 分子, 或第一和第二抗原结合模块中的每一个是 Fab 分子。一些实施方案中, 在 IL-2 变体连接于超过一个抗原结合模块例如第一和第二抗原结合模块的情况下, 能独立地选择每个抗原结合模块所针对的抗原, 例如, 所述第一和所述第二抗原结合模块针对不同的抗原或针对同一抗原。

一些实施方案中, 所述抗原结合模块结合的抗原可以选自下组: 生腱蛋白 C 的 A1 域(TNC A1)、生腱蛋白 C 的 A2 域(TNC A2)、纤连蛋白的外域(Extra Domain B)(EDB)、癌胚抗原(CEA)和黑素瘤有关的硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP)。一些实施方案中, 肿瘤抗原包括但不限于 MAGE、MART-1/Melan-A、gp100、二肽基肽酶 IV(DPPIV)、腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAbp)、亲环素(cyclophilin)b、结肠直肠有关的抗原(CRC)-C017-1A/GA733、癌胚抗原(CEA)及其免疫原性表位 CAP-1 和 CAP-2、

etv6、aml1、前列腺特异性抗原(PSA)及其免疫原性表位 PSA-1、PSA-2 和 PSA-3、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、T 细胞受体/CD3-zeta 链、肿瘤抗原的 MAGE 家族(例如 MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2(MAGE-B2)、MAGE-Xp3(MAGE-B3)、MAGE-Xp4(MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、肿瘤抗原的 GAGE 家族(例如 GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC 家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 α -胎蛋白、E-钙粘蛋白、 α -连环蛋白(catenin)、 β -连环蛋白和 γ -连环蛋白、p120ctn、gp100Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤样结肠息肉蛋白(adenomatous polyposis coli protein, APC)、胞衬蛋白(fodrin)、连接蛋白(Connexin)37、Ig 独特型、p15、gp75、GM2 和 GD2 神经节苷脂、病毒产物如人乳头状瘤病毒蛋白、肿瘤抗原的 Smad 家族、Imp-1、P1A、EBV 编码的核抗原(EBNA)-1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1 和 CT-7、以及 c-erbB-2。一些实施方案中，病毒抗原的非限制性例子包括流感病毒血凝素、Epstein-Barr 病毒 LMP-1、丙肝病毒 E2 糖蛋白、HIV gp160 和 HIV gp120。一些实施方案中，ECM 抗原的非限制性例子包括多配体聚糖(syndecan)、类肝素酶(heparanase)、整联蛋白、骨桥蛋白(osteopontin)、link、钙粘蛋白、层粘连蛋白、EGF 型层粘连蛋白、凝集素、纤连蛋白、notch、生腱蛋白和 matrixin。

一些实施方案中，包含上述抗原结合模块的 IL-2 变体或其衍生物包含第二类突变，不包含第三类突变。

一些实施方案中，提供增加 IL-2 或其衍生物、缀合物稳定性的方法，所述方法包括在 IL-2 或其衍生物、缀合物中引入 1) -7) 任一项所示的突变或其任意组合：

- 1) N26Q,
- 2) N29S,
- 3) N30S,
- 4) N71Q,
- 5) Q11C 和 L132C,
- 6) L70C 和 P82C, 和
- 7) G27C 和 F78C。

在另一方面，本公开提供药物组合物，其含有上述 IL-2 变体或其衍生物或免疫缀合物，任选地可包含药学上可接受的稀释剂、载体或助剂。所述药物组合物可以为冻干制剂或可注射溶液。

在一些具体实施方案中，药物组合物单位计量中可含有 0.01 至 99 重量%的 IL-2 变体或其衍生物或免疫缀合物，或药物组合物单位剂量中含有的 IL-2 变体或

其衍生物或免疫缀合物的量为 0.1-2000mg（例如 1-1000mg）。

在另一方面，本公开提供编码上述 IL-2 变体或其衍生物的核酸。所述核酸包含选自 SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.21、
5 SEQ ID NO.23、SEQ ID NO.25、SEQ ID NO.27、SEQ ID NO.29、SEQ ID NO.31、SEQ ID NO.33、SEQ ID NO.35、和 SEQ ID NO.40 中任一项所示的多核苷酸。

一些实施方案中，提供含有编码上述 IL-2 变体或其衍生物的核酸的表达载体。

在另一方面，提供表达上述载体的宿主细胞。所述宿主细胞可以是原核或真核细胞。一些具体实施方案中，宿主细胞为细菌、酵母菌或哺乳动物细胞，具体可以
10 为巴斯德毕赤酵母或酿酒酵母。

一些实施方案中，宿主细胞包含（例如已被转化或转染）载体，所述载体包含编码上述 IL-2 变体或其衍生物、免疫缀合物的氨基酸序列的多核苷酸。宿主细胞包括原核微生物（如大肠杆菌）或各种真核生物细胞（如中国仓鼠卵巢细胞（CHO）、人胚胎肾（HEK）细胞或淋巴细胞（例如 YO、NS0、Sp20 细胞）、昆虫细胞等）。

15 一些实施方案中，可以使用表达糖基化多肽的宿主细胞，由多细胞生物体（包括例如无脊椎动物和脊椎动物）衍生，例如植物和昆虫细胞。脊椎动物细胞也可以用作宿主细胞，例如，悬浮生长的哺乳动物细胞系、猴肾 CV1 系（COS-7）、人胚胎肾系（293 或 293T 细胞）、幼仓鼠肾细胞（BHK）、小鼠塞托利（sertoli）细胞（TM4 细胞）、猴肾细胞（CV1）、非洲绿猴肾细胞（VERO-76）、人宫颈癌细胞（HELA）、
20 犬肾细胞（MDCK）、buffalo 大鼠肝细胞（BRL3A）、人肺细胞（W138）、人肝细胞（Hep G2）、小鼠乳房肿瘤细胞（MMT060562）、TRI 细胞（如例如记载于 Mather 等，Annals N.Y.Acad Sci383, 44-68（1982））、MRC5 细胞和 FS4 细胞、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、骨髓瘤细胞系如 YO、NS0、P3X63 和 Sp2/0，以及在转基因动物、转基因植物或培养的植物或动物组织中包含的细胞。

25 在另一方面，本公开提供上述 IL-2 变体或其衍生物、免疫缀合物或包含其的药物组合物的制药用途。

当 IL-2 变体或其衍生物包含第二类突变时，其用于治疗增生性疾病、免疫性疾病、调节 T 细胞介导的免疫应答、刺激个体免疫系统的方法和相关制药用途。所述增生性疾病可以是肿瘤或癌（例如转移性肿瘤或癌），可以是实体瘤（例如转移性肾细胞癌和恶性黑素瘤）。一些实施方案中，本公开的 IL-2 变体或其衍生物、
30 免疫缀合物可用于治疗刺激宿主的免疫系统以获益的疾病情形，特别是期望增强细胞免疫应答的状况，可以包括宿主免疫应答不足或缺陷性的疾病情形。一些实施方案中，施用 IL-2 变体或其衍生物、免疫缀合物的疾病情形包括细胞免疫应答是特异性免疫的关键机制的肿瘤或感染，例如癌症（例如肾细胞癌或黑素瘤）、免疫缺陷（例如 HIV 阳性患者中、免疫受抑制的患者）、慢性感染等。一些实施方案中，
35 增强细胞免疫应答可以包括以下任一种或多种：免疫功能的一般升高、T 细胞功能

升高、B 细胞功能升高、淋巴细胞功能的恢复、IL-2 受体表达提高、T 细胞应答性提高、天然杀伤细胞活性或淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞活性升高等。一些实施方案中,本公开的 IL-2 变体或其衍生物、免疫缀合物用于治疗疾病是增殖性病征,例如癌症。癌症的非限制性例子包括膀胱癌、脑癌、头和颈癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、子宫内膜癌、食道癌、结肠癌、结肠直肠癌、直肠癌、胃癌、前列腺癌、血液癌、皮肤癌、鳞状细胞癌、骨癌和肾癌。其它可使用本公开的 IL-2 变体或其衍生物治疗的细胞增殖病征包括但不限于位于以下处的新生物:腹部、骨、乳房、消化系统、肝、胰、腹膜、内分泌腺(肾上腺、副甲状腺、垂体、睾丸、卵巢、胸腺、甲状腺)、眼、头和颈、神经系统(中枢和外周)、淋巴系统、骨盆、皮肤、软组织、脾、胸部、和泌尿生殖系统。还包括癌症前期状况或损伤以及癌症转移。在某些实施方案中,癌症选自下组:肾细胞癌、皮肤癌、肺癌、结肠直肠癌、乳腺癌、脑癌、头和颈癌。类似地,其它细胞增殖病征也可用本公开的 IL-2 变体或其衍生物治疗,包括但不限于:高丙种球蛋白血症(hypergammaglobulinemia)、淋巴增生性病征、病变蛋白血症(paraproteinemias)、紫癜(purpura)、结节病、塞扎里综合征(Sezary Syndrome)、Waldenström's 巨球蛋白血症、高歇氏病(Gaucher's Disease)、组织细胞增多病(histiocytosis)以及任何其它位于上文所列的器官系统中的瘤形成(neoplasia)外的细胞增殖疾病。在另一些实施方案中,所述疾病涉及自身免疫性、移植排斥、外伤后免疫应答和传染性疾病(例如 HIV)。

当 IL-2 变体或其衍生物包含第三类突变时,其用于治疗自身免疫性疾病或缓解/治疗/预防器官移植之后的自身免疫反应。自身免疫性疾病可以是选自由以下各种组成的组:I 型糖尿病(type I diabetes mellitus)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)、多发性硬化症(multiple sclerosis)、慢性胃炎(chronic gastritis)、克罗恩病(Crohn's disease)、巴塞多病(Basedow disease)、别赫捷列夫病(Bechterew disease)、银屑病(psoriasis)、重症肌无力(myasthenia gravis)、自身免疫肝炎(autoimmune hepatitis)、APECED、变应性肉芽肿血管炎(Churg-Strauss syndrome)、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)、肾小球肾炎(glomerulonephritis)、吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barré syndrome)、桥本甲状腺炎(Hashimoto thyroiditis)、硬化萎缩性苔藓(lichen sclerosus)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematoses)、PANDAS、风湿热(rheumatic fever)、结节病(sarcoidosis)、舍格伦综合征(syndrome)、僵人综合症(Stiff-Man syndrome)、硬皮病(scleroderma)、韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、白斑(vitiligo)、自身免疫性肠病(autoimmune enteropathy)、肺出血肾炎综合征(Goodpastures syndrome)、皮肌炎(dermatomyositis)、多发性肌炎(polymyositis)、自身免疫性过敏症(autoimmune allergy)、哮喘(asthma)。在一些实施方案中,IL-2 变体或其衍生物可以与免疫抑制剂联用。一些实施方案中,免疫抑制剂选自以下各项组成的组:糖皮质激素(glucocorticoid),包括去氧皮质酮(decortin)、prednisol; 硫唑嘌呤(azathioprine); 环孢素 A(cyclosporin A); 吗替麦考酚酯

(mycophenolatemofetil); 他克莫司(tacrolimus); 抗 T 淋巴细胞球蛋白, 抗 CD3 抗体, 包括莫罗单抗(muromonab); 抗 CD25 抗体, 包括巴利昔单抗(basiliximab)和达克珠单抗(daclizumab); 抗 TNF- α 抗体, 包括英利昔单抗(infliximab)和阿达木单抗(adalimumab); 硫唑嘌呤; 甲氨蝶呤(methotrexate); 环孢素(cyclosporin); 西罗莫司(siroliimus); 依维莫司(everolimus); 芬戈莫德(fingolimod); 骁悉(CellCept); 麦考酚酸钠肠溶剂(myfortic); 以及环磷酰胺(cyclophosphamide)。

一些实施方案中, 本公开的 IL-2 变体或其衍生物、免疫缀合物不能提供治愈而仅能提供部分益处。在一些实施方案中, 具有一些益处的生理学变化也被视为治疗有益的。如此, 在一些实施方案中, 提供生理学变化的 IL-2 变体或其衍生物、免疫缀合物的量被视为“有效量”或“治疗有效量”。需要治疗的受试者、患者或个体通常为哺乳动物, 更特定地为人。

一些实施方案中, 提供其中每日至少 2 次、每日至少 1 次、每 48 小时至少 1 次、每 72 小时至少一次、每周至少一次、每 2 周至少一次、每个月至少一次、每 2 个月至少一次或每 3 个月至少一次向受试者施用本公开的 IL-2 变体或其衍生物、免疫缀合物的方法。可通过任何有效途径施用 IL-2, 例如, 通过肠胃外注射包括皮下注射施用 IL-2 变体或其衍生物、免疫缀合物。

在进一步的方面, 本公开提供制备 IL-2 变体或其衍生物、免疫缀合物的方法, 包括向野生型人 IL-2 中引入前述 IL-2 变体的突变, 或使用前述核酸序列, 或使用前述表达载体, 或使用前述宿主细胞。此处全文引入 WO2012/107417 中的 IL-2 变体的制备方法。

附图说明

图 1A-1F 分别为野生型 IL-2(WT)及其变体 IL-2-01、IL-2-02、IL-2-03、IL-2-04、IL-2-05 的热稳定性实验结果。

图 2 为通过 ELISA 实验检测的野生型 IL-2 (WT) 及其变体 IL-2-01、IL-2-02、IL-2-03、IL-2-04、IL-2-05、IL-2-06、IL-2-07、IL-2-08、IL-2-09、IL-2-13 与 IL-2R α 的亲合力。

图 3A-3C 分别为经 ELISA 实验检测的 IL-2-10、IL-2-22、IL-2-23 及 PEG 化 IL-2-10、PEG 化 IL-2-22、PEG 化 IL-2-23 的促 CTLL2 细胞增殖实验结果。

图 4A-4C 分别为经 ELISA 实验检测的 IL-2-10、IL-2-22、IL-2-23 及 PEG 化 IL-2-10、PEG 化 IL-2-22、PEG 化 IL-2-23 的促 Mo7e 细胞增殖实验结果。

图 5 为经流式细胞法检测的 IL-2-01、IL-2-02、IL-2-07、IL-2-08、IL-2-09 对 CTLL2 细胞中 STAT5 磷酸化的实验结果。

图 6A-6C 分别为 IL-2-10、IL-2-22、IL-2-23 及 PEG 化 IL-2-10、PEG 化 IL-2-22、PEG 化 IL-2-23 刺激人外周血调节性 T 细胞 Treg (图 6A)、CD8 $^{+}$ T 细胞 (图 6B)、NK 细胞 (图 6C) STAT5 磷酸化的实验结果。

图 7A-7D 分别为 PEG-IL-2-22 对小鼠 NK 细胞 (图 7A)、CD8+ T (图 7B) 细胞、CD4+ T 细胞 (图 7C) 和 T_{reg} 细胞 (图 7D) 中数量影响的实验结果。

图 8A-8C 分别为 PEG-IL-2-24 对小鼠 CD8+ T 细胞 (图 8A)、CD4+ T 细胞 (图 8B)、Treg 细胞 (图 8C) 中数量影响的实验结果; 图 8D-8F 分别为相应的 CD8+ T 细胞在 CD3+T 细胞中的百分比 (图 8D)、CD4+ T 细胞在 CD3+T 细胞中的百分比 (图 8E)、Treg 细胞在 CD4+T 细胞中的百分比 (图 8F)。

图 9 为 PEG-IL-2-22 在小鼠 CT26 结肠癌模型中的抗肿瘤作用结果图。

图 10 为 PEG-IL-2-22 在人黑色素瘤 A375 混合人 PBMC 皮下移植 NCG 小鼠模型中的抗肿瘤作用结果图。

10

发明详述

为了更容易理解本公开, 以下具体定义了某些技术和科学术语。除显而易见在本公开中的它处另有明确定义, 否则本公开使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

15 本文中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。

术语

“白介素-2”或“IL-2”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) 的任何天然的 IL-2。该术语涵盖未加工的 IL-2 以及源自细胞中的加工的任何形式的 IL-2。该术语还涵盖天然存在的 IL-2 变体, 例如剪接变体或等位变体。例示性野生型人 IL-2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。未加工的人 IL-2 额外包含 N 端 20 个氨基酸的信号肽 (如 WO2012107417 中的 SEQ ID NO.272 所示), 所述信号肽在成熟的 IL-2 分子中是缺乏的。

25 “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。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。末端缺失的例子是在全长人 IL-2 的位置 1 缺失丙氨酸残基。优选的氨基酸突变是氨基酸取代。为了改变例如 IL-2 多肽的结合特性, 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。

35 “野生型 IL-2”是在其它方面与变体 IL-2 多肽相同, 只是在变体 IL-2 多肽的每个氨基酸位置具有野生型氨基酸的 IL-2 形式。例如, 如果 IL-2 变体是全长 IL-2

(即未与任何其它分子融合或缀合的 IL-2)，那么此变体的野生型形式是全长天然的 IL-2。如果 IL-2 变体是 IL-2 与在 IL-2 下游编码的另一种多肽（例如抗体链）之间的融合物，那么此 IL-2 变体的野生型形式是具有与相同下游多肽融合的野生型氨基酸序列的 IL-2。此外，如果 IL-2 变体是 IL-2 的截短形式（在 IL-2 的非截短部分内的经突变或修饰的序列），那么此 IL-2 变体的野生型形式是具有野生型序列的类似截短的 IL-2。为了对各种形式的 IL-2 变体与相应的 IL-2 野生型形式比较 IL-2 受体结合亲和力或生物学活性，术语“野生型”涵盖相比于天然存在的、天然的 IL-2，包含一处或多处不影响对 IL-2 受体结合的氨基酸突变的 IL-2 形式，例如在与人 IL-2 的残基 125 对应的位置处的半胱氨酸取代为丙氨酸 C125A。在一些实施方案中，野生型 IL-2 包含 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列。

“衍生物”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，活性成份例如抗体或其抗原结合片段）、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。

“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。

“高亲和力 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 或 p70）和受体 α 亚基（也称为 CD25 或 p55）组成。比较而言，“中等亲和力 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 Monit14, RA179-189 (2008)）。

“亲和力”指分子（例如受体）的单一结合位点与其结合配偶体（例如配体）之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另外指示，本文的“结合亲和力”指反映结合对的成员（例如受体和配体）之间 1:1 相互作用的内在结合亲和力。分子 X 对其配偶体 Y 的亲和力通常可以用解离常数 (K_D) 来表述，其为解离与结合速率常数（分别为 $K_{\text{解离}}$ 和 $K_{\text{结合}}$ ）的比率。如此，相等的亲和力可能包含不同的速率常数，只要速率常数的比率保持相同。亲和力可以通过本领域常规的方法来测量，包括本文中所描述的方法。

“调节性 T 细胞”或“T_{调节细胞}”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。

“效应细胞”指介导 IL-2 的细胞毒性效果的淋巴细胞群体。效应细胞包括效应 T 细胞如 CD8+ 细胞毒性 T 细胞、NK 细胞、淋巴因子激活的杀伤 (LAK) 细胞和巨噬细胞/单核细胞。

5 “抗原结合模块”指特异性结合抗原决定簇的多肽分子。在一些实施方案中，抗原结合模块能指导其连接物（例如，细胞因子 (IL-2 或其变体) 和/或其它抗原结合模块) 到达靶位点，例如到达特定类型的肿瘤细胞或具有特定抗原决定簇的肿瘤间质。抗原结合模块包括抗体及其抗原片段，优选的抗原结合模块包括抗体的抗原结合域，其可以包含抗体重链可变区和抗体轻链可变区。抗原结合模块可以包含
10 抗体恒定区，如本领域中已知的，可用的重链恒定区包括以下 5 种同种型中的任意一种： α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 。可用的轻链恒定区包括任意以下 2 种同种型中的任意一种： κ 和 λ 。IL-2 或其变体可通过一种或多种接头序列与一个或多个抗原结合模块连接以形成“免疫缀合物”。

“特异性结合”意指此结合对于抗原是选择性的，并且能与不想要的或非特异性的相互作用区别开来。抗原结合模块结合特异性抗原决定簇的能力能经由酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 或本领域技术人员熟知的其它技术，例如表面等离子共振技术（在 BIAcore 仪器上分析）(Liljeblad 等, Glyco J17, 323-329 (2000))，
15 以及传统的结合测定法来测量 (Heeley, Endocr Res28, 217-229 (2002))。

“抗体”在本文中以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，只要它们展现出期望的抗原结合活性，所述抗体包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）和抗原结合片段。抗体可以包括鼠源抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、骆驼抗体。例示性的，抗体可以是免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的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
20 恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。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、
25 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。

30 “抗原结合片段”，指具有抗原结合活性的 Fab 片段，Fab' 片段，F(ab')₂ 片段，单链 Fv (即 sFv)，纳米抗体 (即 VHH)，VH/VL 结构域。Fv 片段含有抗体重链可变区和轻链可变区，但没有恒定区，并具有全部抗原结合位点的最小抗原结合片段。一般地，Fv 抗体还包含在 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头，且能够形成抗原结合所需的结构。也可以用不同的连接物将两个抗体可变区连接成一条多肽链，称为单链抗体 (single chain antibody) 或单链 Fv (sFv)。
35

“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））。

“PEG 化”是指至少一个 PEG 分子与另一个分子（例如治疗性蛋白）连接。例如，批准 Adagen（腺苷脱氨酶的 PEG 化制剂）用于治疗严重联合免疫缺陷病。已经显示，聚乙二醇的连接可以防止蛋白水解作用（参见，例如，Sada 等人，（1991）*J.Fermentation Bioengineering* 71: 137-139）。在最常见形式中，PEG 是在一端与羟基连接的直链或支链聚醚，并且具有下列常规结构： $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ 。为了使 PEG 与分子（多肽、多糖、多核苷酸和小的有机分子）偶联，可以通过制备一些或两个末端具有官能团的 PEG 的衍生物来活化 PEG。蛋白的 PEG 缀合的常见途径是用官能团活化 PEG，该官能团适合与赖氨酸和 N-末端氨基酸基团的反应。尤其是，参与缀合的常见反应基团是赖氨酸的 α 或 ϵ 氨基。聚乙二醇化连接基与蛋白的反应可导致 PEG 部分主要在下列位点处的连接：蛋白的 N-末端的 α 氨基、赖氨酸残基侧链上的 ϵ 氨基、或组氨酸残基侧链上的咪唑基。由于大部分重组蛋白质具有单个 α 和许多 ϵ 氨基和咪唑基，可以根据连接基团的化学性质，产生许多位置异构体。

“载体”、“表达载体”与“表达构建体”同义并指用于导入与其可操作联合的特定基因并指导其在靶细胞中表达的 DNA 分子，包括作为自主复制核酸结构的载体以及掺入到其所导入的宿主细胞的基因组中的载体。本文的表达载体包含表达盒，允许转录大量稳定的 mRNA。一旦表达载体在靶细胞内，就通过细胞转录和/或翻译体系生成基因编码的核糖核酸分子或蛋白质。

“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可交换使用并指已引入外源核酸的细胞，包括这类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”，其包括初始转化的细胞和自其衍生的后代（不考虑传代数）。后代在核酸内含物上可能与亲本细胞不完全相同，但可以含有突变。本文中包括具有与原始转化细胞中所筛选或选择的功能或生物学活性相同的功能或生物学活性的突变后代。

“施用”、“给予”和“处理”当应用于动物、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。“施用”、“处理”当应用于人、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。

5 “治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂，诸如包含本公开的任一种 IL-2 变体及其衍生物或包含所述变体或衍生物的组合物，所述受试者确诊患有、疑似患有、易感于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，在受治疗受试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，无论是通过诱导这类症状退化还是抑制这类症状发展到任何临床不可测量的程度。

10 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，例如受试者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在受试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。尽本公开的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解每个患都有的目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领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受试者中应当减轻目标疾病症状。

15 “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。

具体实施方式

以下结合实施例用于进一步描述本公开，但这些实施例并非限制本公开的范围。

25

实施例 1: 野生型 IL-2 及其变体的构建和表达

1. 基因合成及重组表达载体构建

合成野生型人 IL-2 核酸序列，在 5'端添加 Nde I 酶切位点，在 3'端添加 BamH I 酶切位点，核酸序列如 SEQ ID NO.1 所示（Nde I 和 BamH I 的酶切位点如斜体所示）。野生型 IL-2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

30

>野生型 IL-2 核酸序列

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAACCCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACCTACAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCA
35 GTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAA
AACTTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAACTGA
AAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAAT

TTCTGAATCGTTGGATTACCTTTTGTGTCAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATCC
(SEQ ID NO.1)

>野生型 IL-2 氨基酸序列

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQ
5 CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFCQSIISTLT (SEQ ID NO.2)

合成 IL-2 核酸序列后, 连接至大肠杆菌表达载体 pET-9a (Novagen, Cat. 69431-3) 的 *Nde* I 和 *Bam*H I 两个酶切位点, 得到野生型 IL-2 的表达载体。

10 2.在野生型 IL-2 氨基酸序列中引入本公开中所述的氨基酸突变。

在一种变体中, 26 位的天冬酰胺置换成谷氨酰胺, 将其对应的核苷酸序列 76-78 位处的密码子 AAC 变为 CAG, 获得变体 IL-2-01。

其中, 斜体部分为酶切位点, 下划线部分为突变位点, 以下同。

> IL-2-01 的核酸序列:

15 CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGCAGGGCATCAACAACACTACAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCA
GTGTCTGGAAGAAGAAGACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAA
AACTTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTGA
20 AAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAAT
TTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATC
C (SEQ NO ID.3)

>IL-2-01 的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQC
25 LEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT
FAQSIISTLT (SEQ NO ID.4)

在一种变体中, 将 30 位的天冬酰胺置换成丝氨酸, 将其对应的核苷酸序列 88-90 位处的密码子 AAC 变为 AGC, 获得变体 IL-2-02。

> IL-2-02 的核酸序列:

30 CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAGCTACAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCA
GTGTCTGGAAGAAGAAGACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAA
AACTTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTGA
35 AAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAAT
TTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATC
C (SEQ NO ID.5)

> IL-2-02 的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINSYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQC
40 LEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT
FAQSIISTLT (SEQ NO ID.6)

在一种变体中，将 11 位的谷氨酰胺置换成半胱氨酸；将其对应的核苷酸序列 31-33 位处的密码子 CAG 变为 TGT；将 132 位的亮氨酸置换成半胱氨酸；将其对应的核苷酸序列 394-396 位处的密码子 CTG 变为 TGT，获得变体 IL-2-03。

> IL-2-03 的核酸序列：

5 CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCT**TGT**CTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACCTACAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCA
GTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAA
AACTTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAACCTGA
10 AAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAAT
TTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCT**TGT**ACCTAATGAGGATC
C (SEQ NO ID.7)

> IL-2-03 的氨基酸序列：

MAPTSSSTKKT**C**LQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQCLEE
15 ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIIST**C**T (SEQ ID NO:8)

在一种变体中，70 位的亮氨酸置换成半胱氨酸；将其对应的核苷酸序列 208-210 位处的密码子 CTG 变为 TGT；将 82 位的脯氨酸置换成半胱氨酸；将其对应的核苷酸序列 244-246 位处的密码子 CCG 变为 TGT，获得变体 IL-2-04。

> IL-2-04 的核酸序列：

20 CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACCTACAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCA
GTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTT**TGT**AATCTGGCACAGAGCAAAA
25 AACCTTTTCATCTGCGT**TGT**CGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAACCTGA
AAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAAT
TTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATC
C (SEQ NO ID.9)

> IL-2-04 的氨基酸序列：

30 MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPKKATELKHLQCLEE
ELKPLEEVC**N**LAQSKNFHLR**C**RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTLT (SEQ ID NO:10)

在一种变体中，27 位的甘氨酸置换成半胱氨酸；将其对应的核苷酸序列 79-81 位处的密码子 GGC 变为 TGT；将 78 位的苯丙氨酸置换成半胱氨酸；将其对应的核苷酸序列 232-234 位处的密码子 TTT 变为 TGT，获得变体 IL-2-05。

> IL-2-05 的核酸序列：

40 CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAAC**TGT**ATCAACAACCTACAAAATCCGAAACTGA
CCCCTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTG
CAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCA

AAAAC**TGT**CATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAC
 TGAAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTG
 GAATTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATGA
 GGATCC (SEQ NO ID.11)

5 > IL-2-05 的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN**C**INNYKNPKLTRMLTFKIFYMPKKATELKHLQCLEE
 ELKPLEEVLNLAQSKN**C**HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
 QSIISTLT (SEQ ID NO:12)

在一种变体中, 29-44 位的肽段置换为 QSMHIDATL; 将其对应的核苷酸序列
 10 85-132 位处的密码子 AACAACTACAAAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGAC
 CTTCAAATTC 变为 CAGAGCATGCATATTGATGCAACCCTG, 获得变体 IL-2-06。

> IL-2-06 的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
*GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATC**CAGAGCATGCATATTGATGCAACC***
 15 **TGT**TACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTG
 AAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAAACCTTCATCTGCGTCCGCG
 TGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTAAAGGTAGCGAAACCACCTTT
 ATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCT
 TTGCACAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATGAGGATCC (SEQ NO ID.13)

20 > IL-2-06 的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN**GIQSMHIDATL**YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE
 VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
 (SEQ ID NO:14)

在一种变体中, 42 位的苯丙氨酸置换成丙氨酸; 将其对应的核苷酸序列 124-126
 25 位处的密码子 TTC 变为 GCA; 将 45 位的酪氨酸置换成丙氨酸; 将其对应的核苷
 酸序列 133-135 位处的密码子 TAC 变为 GCA, 获得变体 IL-2-07。

> IL-2-07 的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACCTACAAAAATCCGAAACTGA
 30 **CCC**GTATGCTGACC**GCA**AAATTC**GCA**ATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCT
 GCAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGC
 AAAAATTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAA
 CTGAAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGT
 GGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATG
 35 **AGGATCC** (SEQ NO ID.15)

> IL-2-07 的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN**GINNYKNPKLTRMLTAKFA**MPKKATELKHLQCLEE
 ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
 QSIISTLT (SEQ ID NO:16)

40 在一种变体中, 42 位的苯丙氨酸置换成丙氨酸; 将其对应的核苷酸序列 124-126

位处的密码子 TTC 变为 GCA；将 72 位的亮氨酸置换成甘氨酸；将其对应的核苷酸序列 214-216 位处的密码子 CTG 变为 GGC，获得变体 IL-2-08。

> IL-2-08 的核酸序列：

5 CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACACTACAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACCGCAAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGC
AGTGTCTGGAAGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATGGCGCACAGAGCAA
AAACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGCTG
AAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAA
10 TTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATC
C (SEQ NO ID.17)

> IL-2-08 的氨基酸序列：

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEE
ELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
15 QSIISTLT (SEQ ID NO:18)

在一种变体中，45 位的酪氨酸置换成丙氨酸；将其对应的核苷酸序列 133-135 位处的密码子 TAC 变为 GCA；将 72 位的亮氨酸置换成甘氨酸；将其对应的核苷酸序列 214-216 位处的密码子 CTG 变为 GGC，获得变体 IL-2-09。

> IL-2-09 的核酸序列：

20 CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACACTACAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACCTTCAAATTCGCAATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGC
AGTGTCTGGAAGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATGGCGCACAGAGCAA
AAACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGCTG
25 AAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAA
TTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATC
C (SEQ NO ID.19)

> IL-2-09 的氨基酸序列：

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFAAMPKKATELKHLQCLEE
30 ELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTLT (SEQ ID NO:20)

在一种变体中，26 位的天冬酰胺置换成谷氨酰胺；将其对应的核苷酸序列 76-78 位处的密码子 AAC 变为 CAG；将 30 位的天冬酰胺置换成丝氨酸；将其对应的核苷酸序列 88-90 位处的密码子 AAC 变为 AGC；将 42 位的苯丙氨酸置换成丙氨酸；
35 将其对应的核苷酸序列 124-126 位处的密码子 TTC 变为 GCA；将 72 位的亮氨酸置换成甘氨酸；将其对应的核苷酸序列 214-216 位处的密码子 CTG 变为 GGC，获得变体 IL-2-10。

> IL-2-10 的核酸序列：

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT

GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTG**CAG**GGGCATCAAC**AGCT**TACAAAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACC**GCA**AAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAAT**GGCG**CACAGAGCAAAAACCTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAACTGAAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATCC (SEQ NO ID.21)

> IL-2-10 的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI**LQ**GIN**S**YKNPKLTRMLT**A**KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN**G**AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:22)

在一种变体中, 11 位的谷氨酰胺置换成半胱氨酸, 将其对应的核苷酸序列 31-33 位处的密码子 CAG 变为 TGT; 将 26 位的天冬酰胺置换成谷氨酰胺, 将其对应的核苷酸序列 76-78 位处的密码子 AAC 变为 CAG; 将 30 位的天冬酰胺置换成丝氨酸, 将其对应的核苷酸序列 88-90 位处的密码子 AAC 变为 AGC; 将 42 位的苯丙氨酸置换成丙氨酸, 将其对应的核苷酸序列 124-126 位处的密码子 TTC 变为 GCA; 将 72 位的亮氨酸置换成甘氨酸, 将其对应的核苷酸序列 214-216 位处的密码子 CTG 变为 GGC; 将 132 位的亮氨酸置换成半胱氨酸, 将其对应的核苷酸序列 394-396 位处的密码子 CTG 变为 TGT, 获得变体 IL-2-11。

> IL-2-11 的核酸序列:

CATATGGCACCCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCT**TGT**CTGCAACTGGAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTG**CAG**GGGCATCAAC**AGCT**TACAAAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACC**GCA**AAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAAT**GGCG**CACAGAGCAAAAACCTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAACTGAAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCT**TGT**ACCTAATGAGGATCC (SEQ NO ID.23)

> IL-2-11 的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKT**C**LQLEHLLLDLQMI**LQ**GIN**S**YKNPKLTRMLT**A**KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN**G**AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST**C**T (SEQ ID NO:24)

在一种变体中, 26 位的天冬酰胺置换成谷氨酰胺, 将其对应的核苷酸序列 76-78 位处的密码子 AAC 变为 CAG; 将 30 位的天冬酰胺置换成丝氨酸, 将其对应的核苷酸序列 88-90 位处的密码子 AAC 变为 AGC; 将 42 位的苯丙氨酸置换成丙氨酸, 将其对应的核苷酸序列 124-126 位处的密码子 TTC 变为 GCA; 将 70 位的亮氨酸置换成半胱氨酸, 将其对应的核苷酸序列 208-210 位处的密码子 CTG 变为 TGT; 将 72 位的亮氨酸置换成甘氨酸, 将其对应的核苷酸序列 214-216 位处的密码子 CTG 变为 GGC; 将 82 位的脯氨酸置换成半胱氨酸, 将其对应的核苷酸序列 244-246 位

处的密码子 CCG 变为 TGT，获得变体 IL-2-12。

> IL-2-12 的核酸序列：

CATATGGCACCCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
 GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGCAGGGCATCAACAGCTACAAAAATCCGAAACTGA
 5 CCCGTATGCTGACCGCAAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTG
 CAGTGTCTGGAAGAAGAAGACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTTGTAATGGCGCACAGAGC
 AAAAACTTTCATCTGCGTTGTCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAA
 CTGAAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGT
 GGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATG
 10 AGGATCC (SEQ NO ID.25)

> IL-2-12 的氨基酸序列：

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGINSYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEE
 ELKPLEEVCNGAQSKNFHLRCRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
 QSIISTLT (SEQ ID NO:26)

15 在一种变体中，26 位的天冬酰胺置换成谷氨酰胺，将其对应的核苷酸序列 76-78
 位处的密码子 AAC 变为 CAG；将 27 位的甘氨酸置换成半胱氨酸，将其对应的核
 苷酸序列 79-81 位处的密码子 GGC 变为 TGT；将 30 位的天冬酰胺置换成丝氨酸，
 将其对应的核苷酸序列 88-90 位处的密码子 AAC 变为 AGC；将 42 位的苯丙氨酸
 置换成丙氨酸，将其对应的核苷酸序列 124-126 位处的密码子 TTC 变为 GCA；将
 20 72 位的亮氨酸置换成甘氨酸，将其对应的核苷酸序列 214-216 位处的密码子 CTG
 变为 GGC；将 78 位的苯丙氨酸置换成半胱氨酸，将其对应的核苷酸序列 232-234
 位处的密码子 TTT 变为 TGT，获得变体 IL-2-13。

> IL-2-13 的核酸序列：

CATATGGCACCCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
 25 GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGCAGTGTATCAACAGCTACAAAAATCCGAAACTGA
 CCCGTATGCTGACCGCAAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTG
 CAGTGTCTGGAAGAAGAAGACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATGGCGCACAGAGC
 AAAAACTTGTCATCTGCGTCCGCGTGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAA
 CTGAAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGT
 30 GGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATG
 AGGATCC (SEQ NO ID.27)

> IL-2-13 的氨基酸序列：

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQCINSYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEE
 ELKPLEEVLNGAQSKNCHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
 35 QSIISTLT (SEQ ID NO:28)

在一种变体中，29 位的天冬酰胺置换成丝氨酸，将其对应的核苷酸序列 85-87
 位处的密码子 AAC 变为 AGC；将 42 位的苯丙氨酸置换成丙氨酸，将其对应的核
 苷酸序列 124-126 位处的密码子 TTC 变为 GCA；将 72 位的亮氨酸置换成甘氨酸，
 将其对应的核苷酸序列 214-216 位处的密码子 CTG 变为 GGC，获得变体 IL-2-14。

> IL-2-14 的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
 GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATC**AGC**AACTACAAAAATCCGAAACTGAC
 CCGTATGCTGACC**GCA**AAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGC
 5 AGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAAT**GGC**GCACAGAGCAA
 AAACCTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGA
 AAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAA
 TTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATC
 C (SEQ NO ID.29)

10 > IL-2-14 的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGI**S**NYKNPKLTRMLT**A**KFYMPKKATELKHLQCLEE
 ELKPLEEVLN**G**AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
 QSIISTLT (SEQ ID NO:30)

15 在一种变体中,26 位的天冬酰胺置换成谷氨酰胺,将其对应的核苷酸序列 76-78
 位处的密码子 AAC 变为 CAG; 29 位的天冬酰胺置换成丝氨酸,将其对应的核苷
 酸序列 85-87 位处的密码子 AAC 变为 AGC; 将 42 位的苯丙氨酸置换成丙氨酸,
 将其对应的核苷酸序列 124-126 位处的密码子 TTC 变为 GCA; 将 72 位的亮氨酸置
 换成甘氨酸,将其对应的核苷酸序列 214-216 位处的密码子 CTG 变为 GGC, 获得
 变体 IL-2-21。

20 > IL-2-21 的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
 GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTG**CAG**GGCATC**AGC**AACTACAAAAATCCGAAACTGAC
 CCGTATGCTGACC**GCA**AAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGC
 25 AGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAAT**GGC**GCACAGAGCAA
 AAACCTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGA
 AAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAA
 TTTCTGAATCGTTGGATTACCTTT**GCA**CAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGAT
 CC (SEQ NO ID.31)

> IL-2-21 的氨基酸序列:

30 MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL**Q**GI**S**NYKNPKLTRMLT**A**KFYMPKKATELKHLQCLEE
 ELKPLEEVLN**G**AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
 QSIISTLT (SEQ ID NO:32)

35 在一种变体中,26 位的天冬酰胺置换成谷氨酰胺,将其对应的核苷酸序列 76-78
 位处的密码子 AAC 变为 CAG; 29 位的天冬酰胺置换成丝氨酸,将其对应的核苷
 酸序列 85-87 位处的密码子 AAC 变为 AGC; 将 42 位的苯丙氨酸置换成丙氨酸,
 将其对应的核苷酸序列 124-126 位处的密码子 TTC 变为 GCA; 将 71 位的天冬酰胺
 置换成谷氨酰胺,将其对应的核苷酸序列 211-213 位处的密码子 AAT 变为 CAG。
 将 72 位的亮氨酸置换成甘氨酸,将其对应的核苷酸序列 214-216 位处的密码子 CTG
 变为 GGC, 获得变体 IL-2-22。

> IL-2-22 的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTG**CAGGGCATCAGCA**ACTACAAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACCG**GCA**AAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGC
5 AGTGTCTGGAAGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTG**CAGGGC**GCACAGAGCAA
AAACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGT
AAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAA
TTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATC
C (SEQ NO ID:33)

10 > IL-2-22 的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL**QGIS**NYKNPKLTRMLT**A**KFYMPKKATELKHLQCLEE
ELKPLEEV**LQGA**QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTLT (SEQ ID NO:34)

15 在一种变体中, 11 位的谷氨酰胺置换成半胱氨酸, 将其对应的核苷酸序列 31-33
位处的密码子 CAG 变为 TGT; 29-44 位的肽段置换为 QSMHIDATL, 将其对应的
核 苷 酸 序 列 85-132 位 处 的 密 码 子
AACAACTACAAAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTCAAATTC 变为
CAGAGCATGCATATTGATGCAACCCTG; 将 132 位的亮氨酸置换成半胱氨酸,
将其对应的核苷酸序列 394-396 位处的密码子 CTG 变为 TGT, 获得变体 IL-2-23。

20 > IL-2-23 的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCT**TGT**CTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATC**CAGAGCATGCATATTGATGCAACCC**
TGTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTG
AAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAAACTTTCATCTGCGTCCGCG
25 TGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTAAAGGTAGCGAAACCACCTTT
ATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCT
TTGCACAGAGCATTATTAGCACCT**TGT**ACCTAATGAGGATCC (SEQ NO ID:35)

> IL-2-23 的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKT**CL**QLEHLLLDLQMILNGI**QSMHIDATL**YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE
30 VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA**QSIISTCT**
(SEQ ID NO:36)

35 在一种变体中, 26 位的天冬酰胺置换成谷氨酰胺, 将其对应的核苷酸序列 76-78
位处的密码子 AAC 变为 CAG; 29 位的天冬酰胺置换成丝氨酸, 将其对应的核苷
酸序列 85-87 位处的密码子 AAC 变为 AGC; 将 88 位的天冬酰胺置换成精氨酸,
将其对应的核苷酸序列 262-264 位处的密码子 AAT 变为 CGT, 获得变体 IL-2-24。

> IL-2-24 的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTG**CAGGGCATCAGCA**ACTACAAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCA
40 GTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAA

AACTTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCCCGTATTAACGTTATTGTGCTGGAACCTGA
 AAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAAT
 TTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATC
 C (SEQ NO ID.40)

5 > IL-2-24 的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLQGISNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
 CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
 WITFAQSIISTLT (SEQ NO ID.41)

10 上述变体的基因序列经合成后, 连接至 pET-9a 的 *Nde* I 和 *Bam*HI 两个酶切位点, 得到 IL-2 各变体的重组表达载体。

3. 野生型 IL-2 及变体的重组表达与制备

15 将上述重组表达载体转化到 BL21 (DE3) 菌株 (Novagen, Cat. 69450-3), 得到野生型 IL-2 及变体的重组菌, 将重组菌涂布在含 Kan 抗性的 LB 平板进行筛选。

挑取 Kan 筛选后的单菌落于 10mL LB 培养基, 37°C, 220rpm 培养至 OD₆₀₀ 为 1.2±0.2, 加入 50%甘油至终浓度为 10%, 分装至冻存管中(1mL/管), 保存于-80°C。

20 取冻存的甘油管 1 支, 于 37°C 水浴中复苏, 接种至 1L 的 LB 培养基中, 37°C, 220rpm 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~1.0, 加入 1M 的 IPTG 使其终浓度为 1mM, 37°C, 220rpm 诱导培养 4h。诱导结束后, 收集菌体。

菌体经破碎, 包涵体变性、复性、纯化, 经检测获得野生型 IL-2 及变体的目的蛋白。

实施例 2: PEG 化的 IL-2 及其变体的制备

25 取 IL-2 蛋白, 蛋白浓度为 2 mg/mL, 所处的缓冲体系为 10 mM 乙酸-乙酸钠缓冲液, pH 5.0, 向 IL-2 蛋白溶液中加入 20 kDa 的 mPEG-丁醛水溶液, mPEG-丁醛的物质的量为蛋白量的 1-2 倍; 向反应体系中加入氰基硼氢化钠水溶液, 氰基硼氢化钠的物质的量为蛋白量的 50-100 倍; 25°C 搅拌反应约 15-20 小时后, 加入甘氨酸水溶液终止反应, 甘氨酸的终浓度为 30 mM。终止后的 PEG 修饰液使用反相高效液相色谱纯化, 将双/多修饰、裸蛋白等杂质与单 PEG 修饰 IL-2 分开。收集目的
 30 组分, 置换缓冲液并进行活性、结合能力分析。

经检测, 获得 PEG 化的 IL-2 及其变体。

实施例 3: IL-2 及其变体的稳定性研究

35 1、野生型 IL-2 及其变体的化学稳定性

野生型 IL-2 样品(缓冲体系为 10 mM Tris-HCl, 50 mg/ml 甘露醇, 0.18 mg/ml SDS, pH 8.5), 置于 40°C、30 天进行稳定性研究, 取样液质肽图分析降解情况。

检测方法：取样品 0.5 mL 加入 0.5 mL 变性溶液（8 mol/L 盐酸胍，0.2 mol/L Tris-HCl, pH 9.0），加入 8 μ l 1 mol/L DTT（二硫苏糖醇）混匀，25 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时。然后加入 35 μ l 0.5 mol/L IAC，25 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时。经 PD-10 柱将样品置换在酶解缓冲液（2 mol/L 尿素，50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3）中。取置换缓冲液后的样品 0.5 mL 加入 12.5 μ g 胰蛋白酶，25 $^{\circ}$ C 水浴 18 小时，加盐酸终止反应，进行液质肽图分析。

液质肽图检测结果见表 2。放置 30 天后，含有 N26 和 N29 的酶切片段 9-32（即第 9-32 位氨基酸肽段），检测到三个脱氨增加明显的片段（即 9-32A、9-32B、9-32C）。在对变体研究的过程中，考察了 IL-2-08（F42A/L72G）、IL-2-22（N26Q/N29S/F42A/N71Q/L72G）两个变体的稳定性，取样检测降解情况，方法同野生型 IL-2。结果见表 2。

实验结果表明，IL-2-08 和野生型 IL-2 在 9-32 的肽段上均出现三个脱氨增加明显的片段，脱氨增加量相似，说明 F42A/L72G 的突变没有影响 9-32 肽段上发生的脱氨。另一方面，IL-2-22 和 IL-2-24 上的 N26 和 N29 的突变降低了两个位点所在片段的脱氨情况，30 天后，检测到脱氨片段增加 <0.5%（未统计在表内），说明 N26Q 和 N29S 可以增加 IL-2 的稳定性。

表 2. IL-2 变体的稳定性结果（N26 和 N29 位点）

名称	IL-2 酶切片段	可能的脱氨位点	30 天脱氨增加量
IL-2	9-32 A	Q11/Q13/Q22/N26/N29/N30	7.4%
	9-32 B	Q11/Q13/Q22/N26/N29/N30	1.7%
	9-32 C	Q11/Q13/Q22/N26/N29/N30	4.4%
IL-2-08（F42A/L72G）	9-32 A	Q11/Q13/Q22/N26/N29/N30	6.2%
	9-32 B	Q11/Q13/Q22/N26/N29/N30	1.2%
	9-32 C	Q11/Q13/Q22/N26/N29/N30	5.2%
IL-2-22 （N26Q/N29S/F42A/N71Q/L72G）	9-32	Q11/Q13/Q22/Q26/N30	/
IL-2-24 （N26Q/N29S/N88R）	9-32	Q11/Q13/Q22/Q26/N30	/

此外，在 IL-2-08（F42A/L72G）中，发现 55-76 酶切序列上出现脱氨增加较明显的四个片段（即 55-76A、55-76B、55-76C、55-76D）。考察了将 N71 突变成 Q 的效果，即 IL-2-22（N26Q/N29S/F42A/N71Q/L72G），其稳定性结果见表 3。N71 位点的突变，使得 55-76 酶切序列上脱氨片段数量减少，脱氨增加量降低，显著改善了脱氨情况，蛋白更加稳定，设计符合预期。

表 3. IL-2 变体的稳定性结果 (N71 位点)

名称	IL-2 酶切片段	可能的脱氨位点	30 天 脱氨增加量
IL-2-08 (F42A/L72G)	55-76 A	N71/Q57/Q74	14.2%
	55-76 B	N71/Q57/Q74	9.8%
	55-76 C	N71/Q57/Q74	1.2%
	55-76 D	N71/Q57/Q74	10.2%
IL-2-22 (N26Q/N29S/F42A/N71Q/ L72G)	55-76	Q71/Q57/Q74	3.1%

2、野生型 IL-2 及变体的热稳定性

用 Uncle (Unchained labs) 仪器对 1 mg/mL IL-2 样品 (缓冲体系为 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 4.5, 10% 海藻糖) 进行稳定性研究。样品的温度以 0.3°C/分钟的速度从 25°C 升至 95°C, 同时以 266 nm 光激发样品中的色氨酸, 并观测样品在 300- 400 nm 下的发射光 (emission)。按照下面的公式计算熔解温度 (T_m), 其中 λ 为波长 (300-400 nm), $I(\lambda)$ 为该波长下发射光强, BCM 为重心平均值 (barycentric mean), 即以光强加权的波长。

$$BCM = \frac{\sum I(\lambda) \times \lambda}{\sum I(\lambda)}$$

$$T_m = \max \frac{dBCM}{dT}$$

随着温度的增加, 样品的 BCM 参数发生变化, 反映了蛋白质构象的变化。野生型 IL-2 存在两个熔解温度, 说明 IL-2 在完全去折叠前经历了两个阶段, 第一个去折叠阶段需要的能量相对于第二阶段较低。N26Q 和 N30S 突变虽然基本不影响第一个熔解温度, 但却使得第二个熔解温度显著升高; 而 IL-2-03、IL-2-04、IL-2-05 则不存在第一个熔解温度, 第二个熔解温度相比野生型也有显著升高。

IL-2 变体的热稳定性实验结果见图 1A-图 1F 和表 4。实验结果说明 N26Q、N30S、Q11C/L132C、L70C/P82C、G27C/F78C 突变提高了 IL-2 的热稳定性。

表 4. 野生型 IL-2 及其变体的溶解温度

名称	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)
IL-2	61.5	77.5
IL-2-01	60.8	90.5
IL-2-02	61.8	89.1
IL-2-03	不存在	92.1
IL-2-04	不存在	91.8
IL-2-05	不存在	92.5

实施例 4: IL-2 变体与白介素 2 受体 alpha (IL-2R α) 的结合亲和力测定

使用 ELISA 实验检测 IL-2 及其变体与 IL-2R α 的结合特性。包被带 his 标签的 IL-2R α 重组蛋白, 加入 IL-2 后, 通过加入 HRP 偶联的抗 IL-2 多克隆抗体和 HRP 底物 TMB 检测抗体与抗原结合的活性。

- 5 用 2 $\mu\text{g/mL}$ 带 his 标签的 IL-2R α 重组蛋白(SinoBiological, Cat# 10165-H08H) 包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗液洗三遍, 每孔 250 μl 。每次洗涤震荡 10 秒以保证充分清洗。加入 200 μl /孔封闭液室温孵育 2 小时。洗液洗三遍, 每孔 250 μl 。每次洗涤震荡 10 秒以保证充分清洗。每孔加 100 μl 用稀释液稀释好的 IL-2 及其变体。室温孵育 1 小时。洗液洗三遍, 每孔 250 μl 。每孔加入 100 μl 用稀释液按 0.1
- 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 HRP 标记的抗 IL-2 多克隆抗体 (SinoBiological, Cat# 11848-T16)。室温孵育 1 小时。洗液洗三遍, 每孔 250 μl 。每孔加入 100 μl TMB, 避光反应 15 分钟。加入 50 μl 每孔的 0.16 M 硫酸。Thermo MultiSkanFc 酶标仪读取 450nm OD 值, 计算 IL-2 及其变体与 IL-2R α 的结合 EC₅₀ 值。

- 15 实施例4中变体与IL-2R α 的ELISA结合数据见图2和表5。结果表明, 第一类突变, 即N26Q、N30S、Q11C/L132C、L70C/P82C、G27C/F78C、N29S突变并不影响IL-2 与IL-2R α 的结合。而第二类突变, 即F42A/Y45A、F42A/L72G、Y45A/L72G、29-44 突变为QSMHIDATL, 则极大的降低了IL-2与IL-2R α 的结合, 在实验条件下几乎观测不到二者的结合。将两类突变进行组合时, 由于含有第二类突变, 也降低了IL-2 与IL-2R α 的结合。

- 20 >IL-2R α (His 标签)

ELCDDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWD
NQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT
ERIHVFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQF
PGEEKPQASPEGRPESETSCHHHHHH (SEQ ID NO.37)

25

表 5. ELISA 检测 IL-2 变体与低亲和力受体 IL-2R α 结合的 EC₅₀

名称	突变位点和类型 (对应氨基酸序列号)	EC ₅₀ (nM)
IL-2	野生型 (SEQ ID NO:2)	0.50
IL-2-01	N26Q (SEQ ID NO:4)	0.50
IL-2-02	N30S (SEQ ID NO:6)	0.41
IL-2-03	Q11C/L132C (SEQ ID NO:8)	1.53
IL-2-04	L70C/P82C (SEQ ID NO:10)	0.87
IL-2-05	G27C/F78C (SEQ ID NO:12)	0.60
IL-2-06	29-44 位突变为 QSMHIDATL (SEQ ID NO:14)	N.A.
IL-2-07	F42A/Y45A (SEQ ID NO:16)	N.A.
IL-2-08	F42A/L72G (SEQ ID NO:18)	N.A.

IL-2-09	Y45A/L72G (SEQ ID NO:20)	N.A.
IL-2-13	N26Q/ N30S/G27C/F78C/F42A/L72G (SEQ NO ID.28)	N.A.

(注: N.A., 检测不到, 由于这些变体与 IL-2R α 的结合力较低, 在实验所用浓度范围内无法通过拟合数据得到 EC50。)

5 使用 Octet RED96e (Fortebio) 来检测 IL-2、PEG-IL-2-10、PEG-IL-2-22、PEG-IL-2-23 与 IL-2R α 的亲合力。

将 HIS1K 生物传感器 (Fortebio, 18-5120) 浸泡在 200 μ L 的 PBS, pH 7.4, 0.02% tween-20, 0.1% BSA 缓冲液中 10 分钟, 进行湿润处理。然后, 将带有 His 标签的人 IL-2R α (SinoBiological, Cat# 10165-H08H) 溶于 PBS, pH 7.4, 0.02% tween-20, 0.1% BSA 中, 将传感器置于 200 μ L 该溶液中。将传感器浸泡于 200 μ L
10 PBS, pH 7.4, 0.02% tween-20, 0.1% BSA 缓冲液中, 以洗脱多余的 IL-2R α 。然后将 PEG-IL-2-10, PEG-IL-2-22, PEG-IL-2-23 分别用 PBS, pH 7.4, 0.02% tween-20, 0.1% BSA 缓冲液稀释至 133.3 nM。将传感器分别置于不同浓度的 IL-2 溶液中, 进行 300 秒结合。然后将传感器再置于 200 μ L 1 X PBS, pH 7.4, 0.02% tween-20, 0.1% BSA 中进行 600 秒 IL-2 的解离。表 6 实验结果表明, PEG-IL-2-10、PEG-IL-2-22、
15 PEG-IL-2-23 不结合 IL-2R α 。

表 6. IL-2 变体与低亲合力受体 IL-2R α 的结合亲合力 (Octet)

名称	突变位点和类型 (对应氨基酸序列号)	亲合力 (nM)
IL-2	野生型 (SEQ ID NO:2)	7.83
IL-2-24	N26Q/N29S/N88R (SEQ ID NO:38)	11.8
PEG-IL-2-10	N26Q/N30S/F42A/L72G (SEQ ID NO:22)	N.A.
PEG-IL-2-22	N26Q/N29S/F42A/N71G/L72G (SEQ ID NO:34)	N.A.
PEG-IL-2-23	Q11C/29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/ L132C (SEQ ID NO:36)	N.A.

(注: N.A., 检测不到, 由于这些变体与 IL-2R α 的结合力较低, 在实验所用浓度范围内无法通过拟合数据得到亲合力。)

20 **实施例 5: IL-2 及变体与 IL-2 受体 beta/gamma (IL-2R β/γ) 的结合亲和力测定**

Biacore 实验被用来检测实施例 1 中 IL-2 及其变体与 IL-2R β/γ 的结合力。

首先, IL-2R β 和 IL-2R γ 亚基被分别克隆、融合到 Fc hole 和 Fc knob 上 (SEQ ID NO 38 和 39), 用于制备工具分子 IL-2R β/γ -Fc 异源二聚体。IL-2R β -Fc-hole 和
25 IL-2R γ -Fc-knob 被同时转染到 HEK293 细胞中。异源二聚体先后用 Protein A 和分子筛 Superdex 200 纯化。经检测, 获得 IL-2R β/γ 蛋白。

>IL-2Rβ (Fc hole)

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARCAVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVH
 AWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQD
 FKPFENLRMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTL
 5 KQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTGAQDKTH
 TCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKL
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ NO ID. 38)

10 >IL-2Rγ (Fc knob)

MLKPSLPFTSLLFLQLPLLGVGLNNTTILTPNGNEDTTADFFLTMPTDSLSVSTLPLPEVQC
 FVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLTLHYWYKNSDNDKVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHL
 YQTFVVQLQDPREPRRQATQMLKLQNLVIPWAPENLTLHKLSESQLELNWNNRFLNHCLEHL
 VQYRTDWDHSWTEQSDYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFPNPLCGSAQHWSEWSPIHW
 15 GSNTSKENPFLFALEAGAQDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ NO ID. 39)

20

用 Biacore 仪器(Biacore T200, GE)的 Protein A 传感芯片(GE, Cat# 29127556) 捕获 IL-2Rβ/γ-Fc, 其中 IL-2Rβ/γ-Fc 用 1×HBS-EP 稀释至 1 μg/mL, 以 10 μL/min 的流速持续 30 秒。然后, 在芯片表面以 30 μL/min 的流速流经一系列浓度梯度的 IL-2 及其变体, 结合持续 120 秒, 解离持续 360 秒, 利用 Biacore 仪器(Biacore X100, GE) 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 1.5 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 IL-2 及其变体与中亲合力受体 IL-2Rβ/γ 的结合力数值, 见表 7。

结果表明, N26Q、N30S、Q11C/L132C、L70C/P82C、G27C/F78C、F42A/Y45A、 F42A/L72G、Y45A/L72G、N26Q/N30S/F42A/L72G、29-44 位突变为 QSMHIDATL, 30 包括突变之间的组合, 均对 IL-2 与 IL-2Rβ/γ 的结合影响不大。

表 7. IL-2 及其变体与中亲合力受体 IL-2Rβ/γ 的亲合力

名称	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	K_d (nM)
IL-2 (WT)	9.36×10^5	2.40×10^{-4}	0.257
IL-2-01	9.02×10^5	2.20×10^{-4}	0.244
IL-2-02	1.03×10^6	2.12×10^{-4}	0.206
IL-2-03	5.33×10^5	1.35×10^{-4}	0.253
IL-2-04	4.98×10^5	1.50×10^{-4}	0.302
IL-2-05	3.36×10^5	9.68×10^{-5}	0.288
IL-2-06	8.56×10^5	4.36×10^{-4}	0.509

IL-2-07	8.22×10^5	2.15×10^{-4}	0.261
IL-2-08	9.20×10^5	2.06×10^{-4}	0.224
IL-2-09	6.46×10^5	2.22×10^{-4}	0.344
IL-2-10	1.62×10^6	4.30×10^{-4}	0.266

用类似的方法通过 Biacore 检测 PEG-IL-2-10、PEG-IL-2-22、PEG-IL-2-23 与 IL-2R β/γ 的亲合力, 结果见表 8。结果显示, IL-2 变体在偶联了 PEG 后, 与 IL-2R β/γ 的结合有一定程度的降低, 但仍保持较强亲合力。实验结果表明, 相比野生型 IL-2, IL-2-24 几乎不与 IL-2R β 结合, 也即, N26Q/N29S/N88R 降低 IL-2 与 IL-2R β 的结合 (此处结果未显示)。

表 8. PEG-IL-2 变体与中亲合力受体 IL-2R β/γ 的亲合力

名称	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	K_d (nM)
PEG-IL-2-10	1.38×10^6	1.19×10^{-3}	0.86
PEG-IL-2-22	1.55×10^5	5.49×10^{-4}	3.54
PEG-IL-2-23	3.50×10^5	6.49×10^{-4}	1.86

实施例 6: IL-2 及变体的高亲合力受体 IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$ 介导的细胞活性

CTLL2 为小鼠来源细胞株, 同时表达 IL-2R α 、 β 、 γ , 可用于评估各 IL-2 变体的高亲合力受体 IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$ 介导的细胞活性。依据在不同 IL-2 或其变体的浓度下, 检测 CTLL-2 的增殖速率, 以评价 IL-2 或其变体的生物学活性。

完全培养液: RPMI 1640 + 2 mM L-谷氨酰胺 + 1 mM 丙酮酸钠 + 10% 胎牛血清 + 10% T-STIM, 培养物补充有伴刀豆球蛋白 A (concanavalin-A) (含有 IL-2);
基础培养基: RPMI 1640 + 2 mM L-谷氨酰胺 + 1 mM 丙酮酸钠 + 10% 胎牛血清。

CTLL-2 细胞增殖实验: CTLL-2 细胞用完全培养液于 37°C、5% CO₂ 条件下培养至 2.0×10^5 个细胞/mL 的密度, 对细胞进行传代, 3-4 天后离心收集 CTLL-2 细胞, 用 PBS 洗涤 3 次, 重悬于基础培养液中配制成每 mL 含 2.0×10^5 个细胞的细胞悬液, 置于 96 孔板中, 每孔 90 μ L 细胞。加入 10 μ L 的 10 \times 相应浓度的用基础培养液调配的 IL-2 浓缩液, 把细胞置于 37°C、5% CO₂ 条件下。培养 24 小时后, 每孔加入裂解液 100 μ L 的 CELLTITER-Glo 试剂 (Promega), 混匀细胞板中的液体, 放入酶标仪, 以 630nm 为参比波长, 在波长 570nm 处测定吸光度, 记录测定结果。

数据采用计算机程序或四参数回归算法进行拟合, 并按下式进行计算结果:
供试品相对生物学活性 (%) = 对照品 EC₅₀ / 供试品 EC₅₀ (EC₅₀: 半最大效应浓度)。

IL-2 及其变体的活性数据见表 9、表 10 和图 3A-3C。结果表明, 第一类突变, 即 N26Q, N29S, N30S, Q11C/L132C, L70C/P82C, G27C/F78C 突变并不影响

甚至略有增强IL-2对CTLL2细胞的促增殖活性；而第二类突变，即F42A/Y45A，F42A/L72G，Y45A/L72G，29-44突变为QSMHIDATL，则由于降低了IL-2与IL-2R α 的结合，也降低了IL-2对CTLL2细胞的增殖活性。

表 9. IL-2 变体对 CTLL2-细胞的促增殖活性

名称	突变位点和类型（对应氨基酸序列号）	相对生物学活性
IL-2	野生型（SEQ ID NO:2）	100%
IL-2-01	N26Q（SEQ ID NO:4）	96%
IL-2-02	N30S（SEQ ID NO:6）	117%
IL-2-03	Q11C/L132C（SEQ ID NO:8）	162%
IL-2-04	L70C/P82C（SEQ ID NO:10）	176%
IL-2-05	G27C/F78C（SEQ ID NO:12）	229%
IL-2-06	29-44 位突变为 QSMHIDATL（SEQ ID NO:14）	4%
IL-2-07	F42A/Y45A（SEQ ID NO:16）	4%
IL-2-08	F42A/L72G（SEQ ID NO:18）	7%
IL-2-09	Y45A/L72G（SEQ ID NO:20）	2%

5

表 10. IL-2 变体对 CTLL2-细胞的促增殖活性

名称	突变位点和类型（对应氨基酸序列号）	EC ₅₀ （nM）	相对生物学活性
IL-2	野生型（SEQ ID NO:2）	0.053	100 %
IL-2-10	N26Q/N30S/F42A/L72G（SEQ ID NO:22）	4.80	1 %
IL-2-22	N26Q/N29S/F42A/N71G/L72G（SEQ ID NO:34）	5.73	0.9 %
IL-2-23	Q11C/29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/ L132C（SEQ ID NO:36）	22.71	0.2 %
PEG-IL-2-10	N26Q/N30S/F42A/L72G（SEQ ID NO:22）	35.29	0.2 %
PEG-IL-2-22	N26Q/N29S/F42A/N71G/L72G（SEQ ID NO:34）	39.25	0.1%
PEG-IL-2-23	Q11C/29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/ L132C（SEQ ID NO:36）	N.A.	N.A.

（注：N.A.，未检测到，表示所述变体的 CTLL2 细胞增殖活性较低，在实验所用浓度范围内无法通过拟合数据得到 EC₅₀。）

10 实施例 7: IL-2 及变体的中亲合力受体 IL-2R β / γ 介导的细胞活性

Mo7e为人源细胞系，只表达IL-2R β 、 γ ，不表达IL-2R α ，可用于评估各IL-2变体的中亲合力受体IL-2R β / γ 介导的细胞活性。依据在不同IL-2或其变体的浓度下，其细胞依赖株Mo7e的增殖速率，检测IL-2或其变体的生物学活性。

15 完全培养液：RPMI 1640 + 2 mM L-谷氨酰胺 + 1 mM 丙酮酸钠 + 10% 胎牛血清 + 15 ng/mL GM-CSF；基础培养基：RPMI 1640 + 2 mM L-谷氨酰胺 + 1 mM 丙酮酸钠 + 10% 胎牛血清。

Mo7e细胞增殖实验：Mo7e细胞用完全培养液于37℃、5% CO₂条件下培养至2.0×10⁵个细胞/mL的密度，对细胞进行传代，3-4天后离心收集Mo7e细胞，用PBS洗涤3次，重悬于基础培养液中配制成每mL含2.0×10⁵个细胞的细胞悬液，置于96孔板中，每孔90 μL细胞。加入10 μL 10×相应浓度的用基础培养液调配的IL-2浓缩液，把细胞置于37℃、5% CO₂条件下。培养72小时后，每孔加入裂解液100 μL CELLTITER-Glo试剂（Promega），混匀细胞板中的液体，放入酶标仪，以630 nm为参比波长，在波长570 nm处测定吸光度，记录测定结果。用实施例6中相同方法计算相对生物学活性。

IL-2及其变体的Mo7e细胞增殖活性数据见表11和图4A-4C。结果表明，第一类突变，即N26Q，N29S，N30S，Q11C/L132C，L70C/P82C，G27C/F78C突变，和第二类突变即F42A/Y45A，F42A/L72G，Y45A/L72G，29-44突变为QSMHIDATL突变，均不影响IL-2的促Mo7e细胞的增殖活性，即，不影响IL-2与IL-2Rβ/γ的亲合力。在IL-2上偶联PEG虽然会在一定程度上降低IL-2的促Mo7e细胞的增殖活性，但仍能保持较好结合。

表 11. IL-2 及其变体的促 Mo7e-细胞增殖活性

名称	突变位点和类型（对应氨基酸序列号）	EC ₅₀ (nM)	相对生物学活性
IL-2	野生型 (SEQ ID NO:2)	2.44	100 %
IL-2-10	N26Q/N30S/F42A/L72G (SEQ ID NO:22)	1.78	137 %
IL-2-22	N26Q/N29S/F42A/N71G/L72G (SEQ ID NO:34)	2.84	86 %
IL-2-23	Q11C/29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/ L132C (SEQ ID NO:36)	2.22	110 %
PEG-IL-2-10	N26Q/N30S/F42A/L72G (SEQ ID NO:22)	13.19	19 %
PEG-IL-2-22	N26Q/N29S/F42A/N71G/L72G (SEQ ID NO:34)	34.81	7 %
PEG-IL-2-23	Q11C/29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/ L132C (SEQ ID NO:36)	23.37	10%

实施例 8: IL-2 及变体对 CTLL2 细胞 STAT5 磷酸化活性的测定

依据在不同的IL-2或其变体的浓度下，其细胞依赖株CTLL-2中STAT5磷酸化水平，检测IL-2或其变体的生物学活性。

完全培养液：RPMI 1640 + 2 mM L-谷氨酰胺 + 1 mM 丙酮酸钠 + 10% 胎牛血清 + 10% T-STIM culture supplement with concanavalin-A（含有IL-2）；基础培养基：RPMI 1640 + 2 mM L-谷氨酰胺 + 1 mM 丙酮酸钠 + 10% 胎牛血清。

CTLL-2细胞STAT5磷酸化实验：CTLL-2细胞用完全培养液于37℃、5% CO₂条件下培养至每mL2.0×10⁵个细胞的密度，用PBSA（PBS，pH7.2，1% BSA）洗涤1次，调整密度至每mL含1.0×10⁶个细胞，按每管500 μL的体积分装至流式管中，加入相应浓度的用基础培养液调配的IL-2浓缩液，室温孵育20分钟后，立即加入多聚

甲醛，至终浓度1.5%，涡旋混匀，室温孵育10分钟。加入1 mL PBS，4℃、1400 rpm离心5分钟，去除多聚甲醛。重悬细胞，加入1mL4℃预冷的100%甲醇，涡旋混匀，4℃孵育20分钟。加入3mLPBSA缓冲液，4℃、1400 rpm离心5分钟，清洗细胞2次。加入偶联了Alexa Fluor 647的抗STAT5-pY694抗体（BD， Cat# 612599）室温避光孵育30分钟。加入3 mL PBSA清洗两次，用流式细胞仪进行检测。用实施例6中相同方法计算相对生物学活性。

IL-2及其变体的CTLL2细胞STAT5磷酸化活性数据见图5和表12。结果表明，N26Q， N29S， N30S突变并不影响甚至略有增强IL-2的CTLL2细胞STAT5磷酸化活性，而F42A/Y45A， F42A/L72G， Y45A/L72G降低了IL-2的CTLL2细胞STAT5磷酸化活性，进而能够证明N26Q， N29S， N30S不影响IL-2与高亲和力受体IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$ 的结合，而F42A/Y45A， F42A/L72G， Y45A/L72G会降低IL-2与高亲和力受体IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$ 的结合。

表12. IL-2野生型及其变体的CTLL2-细胞STAT5磷酸化活性

名称	突变（对应氨基酸序列号）	EC ₅₀ （nM）	相对生物学活性
IL-2	野生型（SEQ ID NO:2）	0.010	100%
IL-2-01	N26Q（SEQ ID NO:4）	0.0084	119%
IL-2-02	N30S（SEQ ID NO:6）	0.0084	119%
IL-2-07	F42A/Y45A（SEQ ID NO:16）	2.45	0.41%
IL-2-08	F42A/L72G（SEQ ID NO:18）	3.93	0.25%
IL-2-09	Y45A/L72G（SEQ ID NO:20）	4.02	0.25%

15

实施例 9： IL-2 及变体对人外周血（PBMC）STAT5 磷酸化活性的测定

依据在IL-2或其变体的不同浓度下，人外周血中各细胞群体（包括Treg， NK细胞， CD4+ T细胞， CD8+ T细胞）中STAT5磷酸化水平，检测IL-2的生物学活性。

20 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）， FOXP3 PE（BD 560852）， CD56 BV650（BD 564057）， 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每mL 6.0×10^6 个细胞的密度，取90 μ L置于96孔板中。将IL-2及其变体和衍生物用基础培养基稀释至1000 nM， 100 nM， 10 nM， 1 nM， 0.1 nM， 0.01 nM，取10 μ L加入90 μ L PBMC中，37℃刺激15分钟。之后立即用预热的BD Cytotfix缓冲液（BD， Cat No. 554655）在37℃固定细胞10分钟。350 g 4℃离心7分钟。去除上清液，加入200 μ L在-20℃预冷的BD Phosflow Perm Buffer III（BD， Cat No. 558050）在冰上

破膜30分钟。450 g 4℃离心7分钟。去除上清液，加入200 μL PBS， pH 7.4洗涤两次。加入100 μL 按1:200稀释的FcR blocker，在4℃下温育20分钟。450 g 4℃离心7分钟。去除上清液，加入100 μL抗体混合物，对细胞在室温下染色40分钟。450 g 4℃离心7分钟。去除上清液，加入200 μL PBS， pH 7.4洗涤一次，用200 μL PBS， pH 7.4重悬PBMC，用流式细胞仪检测。NK细胞定义为CD3-CD56+的细胞，CD8+ T细胞定义为CD3+CD4-CD8+的细胞，Treg定义为CD3+CD4+CD25+Foxp3+的细胞。

对上述三个细胞群在不同IL-2浓度条件下的pSTAT5荧光数值(MFI)进行统计，采用计算机程序或四参数回归计算法进行拟合，用实施例6中相同方法计算相对生物学活性。

结果表明，F42A/L72G和IL-2-10以及IL-2-23中的突变，由于只降低IL-2与IL-2R α 的结合，但并不影响IL-2与IL-2R β/γ 的结合，使得这些突变对Treg活性的降低大于对CD8+T细胞和NK细胞活性的降低。相反，N88R由于不影响IL-2与IL-2R α 的结合，但降低IL-2与IL-2R β 的结合，使得IL-2对Treg活性的降低小于对CD8+T细胞活性的降低。在IL-2上偶联PEG，均会导致一定程度上IL-2对CD8+T细胞和NK细胞激活活性的降低。

IL-2变体的PBMC细胞STAT5磷酸化活性数据见表13、表14、表15和图6A-6C。

表 13. IL-2 及其变体的人 Treg 细胞 STAT5 磷酸化活性

名称	突变 (对应氨基酸序列号)	EC ₅₀ (nM)	相对生物学活性
IL-2	野生型 (SEQ ID NO:2)	0.00046	100 %
PEG-IL-2-10	N26Q/N30S/F42A/L72G (SEQ ID NO:22)	2.65	0.02 %
PEG-IL-2-23	Q11C/29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL/ L132C (SEQ ID NO:36)	4.24	0.01 %
IL-2-24	N26Q/N29S/N88R (SEQ ID NO:38)	0.209	0.2 %
PEG-IL-2-24		6.02	0.007 %

表 14. IL-2 及其变体的人 CD8+ T 细胞磷酸化活性

名称	EC ₅₀ (nM)	相对活性
IL-2	2.32	100 %
PEG-IL-2-10	8.97	26 %
PEG-IL-2-23	14.41	16 %
IL-2-24	N.A.	N.A.
PEG-IL-2-24	N.A.	N.A.

(注: N.A., 未检测到, 表示所述变体的 CD8+ T 细胞 STAT5 磷酸化活性较低, 在实验所用浓度范围内无法通过拟合数据得到 EC₅₀)

表 15. IL-2 及其变体的人 NK 细胞 STAT5 磷酸化活性

名称	EC ₅₀ (nM)	相对活性
IL-2	0.48	100 %
PEG-IL-2-10	2.00	24 %
PEG-IL-2-23	2.88	17 %

实施例 10: IL-2 及其变体对 Balb/c 小鼠外周血免疫细胞影响的测定

BALB/c 小鼠(购自上海灵畅生物科技有限公司),雌性,4-8 周龄,体重 18-20g, 5 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 20~26 °C,湿度 40~70 %,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,笼盒大小为 325 mm × 210 mm × 180 mm,笼盒内使用垫料为玉米芯,每周更换两次。在整个实验过程中,所有实验小鼠均可以自由饮食,饲料和水均经过高压灭菌,每周更换 2 次。所有出入动物饲养室或实验操作人员均穿戴灭菌实验服、一次性医用口罩和橡胶手套。每只饲养笼均有对应的明确的详细标签,标签内容包括: IACUC 批准号 LDIACUC006、动物数目、性别、品系、接收日期、项目编号、组别、目前实验阶段和实验负责人等。在整个实验过程中,对实验动物的使用和观察均按照 AAALAC 动物使用和管理的相关规定进行。在按照常规实验过程中,对所有的实验动物进行行为、进食、进水、15 体重改变、毛发光泽和其他一些异常情况的监测和记录。

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 和图 7A-7D。模型分组当天为第 0 天。

每个时间点采血并测定血液体积后,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 20 APC-Cy7 (Biolegend 100329)、CD8 PE (Biolegend 100708)、CD4 PE-Cy7 (eBioscience 25-0042-82)、CD25 PerCP-Cy5.5 (BD 561112) 和 CD49b-APC (Biolegend 108909)。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 25 126405) 室温孵育 60 分钟。用 PBS, pH 7.4 洗液洗两次,最后用 500 μLPBS, pH 7.4 洗液重悬,上机分析。NK 细胞定义为 CD3-CD49b+的细胞,CD8+ T 细胞定义为 CD3+CD4-CD8+的细胞, Treg 定义为 CD3+CD4+CD25+Foxp3+的细胞。根据采血体积,计算各细胞群在外周血中的细胞密度。

表 16. PEG-IL-2-22 治疗的给药方案

组别	动物数量	给药	给药剂量 (mg/kg)	给药途径	给药时间	采血时间 (天)
----	------	----	--------------	------	------	----------

1	3	PEG-IL-2-22	3	i.v.	实验开始单 次给药	0, 3, 5, 10
2	3			i.v.		2, 4, 6
3	3		3	s.c.		0, 3, 5, 10
4	3			s.c.		2, 4, 6
5	3		6	s.c.		3, 5, 10
6	3			s.c.		2, 4, 6
7	3		9	s.c.		3, 5, 10
8	3			s.c.		2, 4, 6

实验过程中，PEG-IL-2-22 在第 0 天经尾静脉注射给药，并在第 0、2、3、4、5、6、10 天分别进行小鼠血液采集和流式分析。血液中各细胞群密度结果显示：与第 0 天相比，小鼠的全细胞中，CD3⁻CD49b⁺ 的 NK 细胞，其密度在第 3 天时出现显著上升，且呈现剂量依赖，在第 10 天时基本恢复给药前密度；CD8⁺ T 细胞密度在第 3 天时出现显著上升，且呈现剂量依赖，在第 5 天时基本恢复给药前密度；调节性 T 细胞（Treg）的密度在第 3 天时出现显著上升，在第 4 天时即基本恢复给药前密度。

实验过程中，不同剂量 PEG-IL-2-22 受试药物组所有小鼠均未出现体重下降和行为异常现象，表明小鼠对该受试剂量下的药物具有良好的耐受性。

10 表 17. PEG-IL-2-24 给药和治疗

组别	数量	治疗	给药剂量 (mg/kg)	给药途径	给药时间	采血时间 (天)
1	3	PEG-IL-2-24	0.2	i.p.	实验开始单 次给药	0, 3, 4, 5
2	3		1	i.p.		0, 3, 4, 5
3	3		5	i.p.		0, 3, 4, 5

(注：i.v., 尾静脉注射；s.c., 皮下注射；i.p., 腹腔注射)

结果显示，PEG-IL-2-24 给药第三天，在高（5 mg/kg）、中（1 mg/kg）、低（0.2 mg/kg）下均可以刺激 Treg 的增殖，并呈现剂量效应；CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞在 CD3⁺ T 细胞中的百分比在三个剂量下均无变化，显示了 PEG-IL-2-24 对 Treg 的优先激活。结果见图 8A-8F。

实施例 11: IL-2 及其变体在小鼠的鼠源性结肠癌肿瘤模型中的药效评估

鼠源性结肠腺癌 CT26.WT 细胞（来源于中国科学院上海细胞库（SIBC）），复苏 P4+1 代开始扩增，培养于含 10%胎牛血清（FBS）的 DMEM 培养液中。收集指数生长期的 CT26.WT 细胞，HBSS 重悬至 1×10⁶/mL，无菌条件下，移植于 BALB/c 小鼠皮下，每只小鼠接种 1×10⁵ 个细胞。当瘤体积达到 80-100 mm³ 左右时

分组，分组后开始第一次给药，详细的给药方法、给药剂量和给药途径见表 18，模型分组当天为第 0 天。

表 18. PEG-IL-2-22 给药方案

组别	数量	治疗	给药剂量 (mg/kg)	给药途径	给药周期
1	6	PBS	--	s.c.	Q5D
2	6	PEG-IL-2-22	3	s.c.	Q5D
3	6		6	s.c.	Q5D
4	6		9	s.c.	Q5D
5	6		3	i.v.	Q5D
6	6		6	i.v.	Q5D

(注: i.v., 尾静脉注射; s.c., 皮下注射。Q5D, 每五天给一次药。给药体积: 根据小鼠体重调整给药体积 (0.1mL/10g))

给药开始后，小鼠每周 3 次测量体重及肿瘤体积，肿瘤体积 (mm³) = 0.5 × (肿瘤长径 × 肿瘤短径²) 计算。相对肿瘤抑制率 TGI (%) : TGI % = (1-T/C) × 100%。T/C % 为相对肿瘤增值率，即在某一时间点，治疗组和对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的肿瘤体积 (TV) 或瘤重 (TW)。实验结果见表 19 和图 9。

表 19. PEG-IL-2-22 在 CT26 模型肿瘤中的抑瘤效果

组	第 0 天肿瘤体积 (mm ³)	第 12 天肿瘤体积 (mm ³)	TGI (%)	T/C (%)	p 值
1	72.3±5.31	2577.6±360.91			
2	72.2±6.03	1410.5±673.38	47	53	0.1576
3	70.9±5.37	1297.5±263.52	51	49	0.0168
4	71.8±5.33	1168.6±352.3	56	44	0.0190
5	70.1±5.53	2369.4±547.49	8	92	0.7574
6	69.8±5.85	1122.2±418.6	58	42	0.0265

本实验检测了不同剂量及不同给药方式的 PEG-IL-2-22 在小鼠结肠癌细胞 CT26 同种移植模型中的药效。结果显示，皮下给药中剂量组 (G3)，PEG-IL-2-22 6mg/kg s.c. Q5D*5 给药后第 12 天，平均肿瘤体积为 1297.5±263.52mm³，显著低于对照组同日肿瘤体积 (2577.6±360.91mm³，TGI=51%，p=0.0168)。皮下给药高剂量组 (G4)，PEG-IL-2-22 9mg/kg s.c. Q5D*5 给药后第 12 天，平均肿瘤体积为 1168.6±352.3mm³，显著低于对照组同日肿瘤体积 (2577.6±360.91mm³，TGI=56%，p=0.0190)。静脉给药中剂量组 (G6)，PEG-IL-2-22 6mg/kg i.v. Q5D*5

给药后第 12 天，平均肿瘤体积为 $1122.2 \pm 418.6 \text{mm}^3$ ，显著低于对照组同日肿瘤体积 ($2577.6 \pm 360.91 \text{mm}^3$ ，TGI=58%， $p=0.0265$)。

实施例 12: IL-2 及其变体在小鼠的人源黑色素瘤肿瘤模型中的药效评估

5 NCG小鼠，雌性，4-8 周，体重约 18-22 g，购自江苏集萃药康生物科技有限公司。所有的NCG小鼠按照SPF级动物房IVC恒温恒压系统条件培养。

A375 细胞培养在含 10%胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养液中。收集指数生长期的 A375 细胞，HBSS 重悬至适合浓度用于 NCG 小鼠皮下肿瘤接种。共培养所用的 A375 细胞需经过 Mitomycin C 处理 2 h 后，PBS 洗三次。取正常人外周血，用
10 密度梯度离心法分离人 PBMC，计数。然后用 RPMI1640 培养基(含 IL-2 和 10% FBS) 将 PBMC 重悬至 3×10^6 个/ mL 的浓度，与 Mitomycin C 处理后的 A375 细胞共培养。共培养 8 天后，收取 PBMC，同时收取新鲜消化下来的 A375 细胞。每只老鼠接种：PBMC 8×10^5 个，A375 细胞 4×10^6 个；接种体积：0.2 ml/只 (含 50% Matrigel)；接种于雌性 NCG 小鼠右侧皮下，总计接种 30 只小鼠。根据小鼠体重随机进行分组
15 给药，详细的给药方法、给药剂量和给药途径见表 20，分组给药当天为第 0 天。

表 20. PEG-IL-2-22 给药方案

组别	给药组	N	剂量 (mg/kg)	给药方案	给药方式
1	PBS	6	--	Q3D	i.v.
2	PEG-IL-2-22	6	0.03	Q3D	i.v.
3		6	0.1	Q3D	i.v.
4		6	0.03	Q3D	s.c.
5		6	0.1	Q3D	s.c.

(注: N: 使用动物数量。i.v.: 尾静脉注射; s.c.: 皮下注射。Q3D: 三天一次。给药体积: 根据荷瘤鼠体重调整给药体积 (0.1mL/10g))

20 给药开始后，小鼠每周 2 次测量体重及肿瘤体积。实验结果分别见表 21 和图 10。

表 21. PEG-IL-2-22 在小鼠人源 A375 肿瘤模型中的抑瘤效果

组别	第 0 天肿瘤体积 (mm^3)	第 27 天肿瘤体积 (mm^3)	TGI (%)	T/C (%)	p 值
1	0±0	1558.55±320.54			
2	0±0	175.75±64.16	88.72	11.28	<0.001
3	0±0	55.62±15.18	96.43	3.57	<0.001
4	0±0	95.08±37.27	93.90	6.10	<0.001
5	0±0	232.23±35.68	85.10	14.90	<0.001

实验结束时（给药后第 27 天），与 PBS 组相比，PEG-IL-2-22 0.03 mg/kg，尾静脉注射）给药组、PEG-IL-2-22（0.1 mg/kg，尾静脉注射）给药组、PEG-IL-2-22（0.03 mg/kg，皮下注射）给药组、PEG-IL-2-22（0.1 mg/kg，皮下注射）给药组的
5 肿瘤体积与肿瘤重量均存在极显著性差异（P 值均小于 0.001），表现出明显的肿瘤生长的抑制作用。

实施例 13: IL-2 及其变体的免疫原性分析

经计算机模拟分析，IL-2 变体相比野生型 IL-2 计算模拟的 T 细胞表位（T cell
10 epitope, TCE）数目大致相当或有所减少，见表 22。结果表明，各 IL-2 变体中的氨基酸突变不会导致对 IL-2 用于治疗相关用途的免疫原性产生不利影响。

表 22. IL-2 变体的 T 细胞表位

编号	TCE 数目	TCE					
IL-2	5	LISNINVIV	FKFYMPKKA	MILNGINNY	LTRMLTFKF	MLTFKFYMP	
IL-2-01	4	FKFYMPKKA	LISNINVIV	LTRMLTFKF	MLTFKFYMP		
IL-2-02	6	MILNGINSY	FKFYMPKKA	LTRMLTFKF	LISNINVIV	INSYKNPKL	MLTFKFYMP
IL-2-03	5	LISNINVIV	FKFYMPKKA	MILNGINNY	LTRMLTFKF	MLTFKFYMP	
IL-2-04	5	LISNINVIV	FKFYMPKKA	MILNGINNY	LTRMLTFKF	MLTFKFYMP	
IL-2-05	5	MILNCINNY	FKFYMPKKA	LISNINVIV	LTRMLTFKF	MLTFKFYMP	
IL-2-06	5	LISNINVIV	MHIDATLYM	IQSMHIDAT	MILNGIQSM	LNGIQSMHI	
IL-2-07	4	TRMLTAKFA	LISNINVIV	MILNGINNY	LTRMLTAKF		
IL-2-08	3	LISNINVIV	MILNGINNY	LTRMLTAKF			
IL-2-09	6	FKFAMPKKA	MILNGINNY	LTRMLTFKF	RMLTFKFAM	LISNINVIV	MLTFKFAMP
IL-2-10	3	LISNINVIV	LTRMLTAKF	INSYKNPKL			
IL-2-11	3	LISNINVIV	LTRMLTAKF	INSYKNPKL			
IL-2-12	3	LISNINVIV	LTRMLTAKF	INSYKNPKL			
IL-2-13	3	LISNINVIV	LTRMLTAKF	INSYKNPKL			
IL-2-14	3	LISNINVIV	MILNGISNY	LTRMLTAKF			
IL-2-21	2	LISNINVIV	LTRMLTAKF				
IL-2-22	2	LISNINVIV	LTRMLTAKF				
IL-2-23	5	LISNINVIV	MHIDATLYM	IQSMHIDAT	MILNGIQSM	LNGIQSMHI	

权利要求书:

1. 一种 IL-2 变体或其衍生物, 其特征在于, 包含第一类突变, 所述第一类突变为如下 1) -7) 任一项所示或其任意组合:

- 5 1) N26Q,
 2) N29S,
 3) N30S,
 4) N71Q,
 5) Q11C 和 L132C,
10 6) L70C 和 P82C, 和
 7) G27C 和 F78C。

2. 如权利要求 1 所述的 IL-2 变体或其衍生物, 其还包含第二类突变或第三类突变, 其中:

15 所述第二类突变能够消除或降低所述的 IL-2 变体或其衍生物对高亲和力受体 (IL-2R α / β / γ) 的亲合力, 并保留其对中等亲和力受体 (IL-2R β / γ) 的亲合力;

 所述第三类突变能够降低所述的 IL-2 变体或其衍生物对高亲和力受体 (IL-2R α / β / γ) 和中等亲和力受体 (IL-2R β / γ) 的亲合力, 但对高亲和力受体的亲合力比对中等亲和力受体的亲合力降低得更多;

20 优选地,

 所述第二类突变选自 8) -11) 中的任一项或 8) -10) 的任意组合:

- 8) F42A,
 9) Y45A,
 10) L72G, 和
25 11) 29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL;

 所述第三类突变选自 12) -14) 中的任一项或其任意组合:

- 12) N88R 或 N88G 或 N88I 或 N88D,
 13) D20H 或 D20Y, 和
30 14) Q126L。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的 IL-2 变体或其衍生物, 其中,

 所述第一类突变选自 15) -17) 中的任一项, 或 15) -17) 中的任一项与 5) -7) 中的任一项的组合:

- 15) N26Q 和 N29S,
35 16) N26Q、N29S 和 N71Q, 和
 17) N26Q 和 N30S;

所述第二类突变选自 18) -20) 和 11) 中的任一项:

18) F42A 和 Y45A,

19) F42A 和 L72G, 和

20) Y45A 和 L72G;

5 所述第三类突变为 N88R 或 N88G 或 N88I 或 N88D;

优选地, 所述 IL-2 变体或其衍生物包含 21) -29) 中任一项所示的突变:

21) N26Q、N29S、F42A、N71Q 和 L72G,

22) N26Q、N29S 和 N88R,

23) N26Q、N29S、F42A 和 L72G,

10 24) N26Q、N30S、F42A 和 L72G,

25) Q11C、N26Q、N30S、F42A、L72G 和 L132C,

26) N26Q、N30S、F42A、L70C、L72G 和 P82C,

27) N26Q、G27C、N30S、F42A、L72G 和 F78C,

28) N29S、F42A 和 L72G, 和

15 29) Q11C、29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL 和 L132C。

4. 一种 IL-2 变体或其衍生物, 其特征在于所述 IL-2 变体或其衍生物的第 29-44 位氨基酸替换为 QSMHIDATL;

20 优选地, 所述 IL-2 变体或其衍生物还含有如权利要求 1 中 1) -7) 任一项所示的突变或其任意组合。

5. 一种 IL-2 变体或其衍生物, 其特征在于所述 IL-2 变体或其衍生物含有 N71Q 和 L72G 的突变;

25 优选地, 所述 IL-2 变体或其衍生物还含有 1) -3) 和 5) -9) 中任一项所述的突变或其任意组合:

1) N26Q,

2) N29S,

3) N30S,

5) Q11C 和 L132C,

30 6) L70C 和 P82C,

7) G27C 和 F78C

8) F42A 和

9) Y45A。

35 6. 如前述权利要求任一项所述的 IL-2 变体或其衍生物, 其稳定性是较之野生型 IL-2 增加的。

7. 如前述权利要求任一项所述的 IL-2 变体或其衍生物，其还包括 C125A 的氨基酸突变。

5 8. 如前述权利要求任一项所述的 IL-2 变体或其衍生物，其突变是相对于野生型 IL-2 发生的突变，所述野生型 IL-2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，其中所示突变的位点编号根据 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列从第 2 位的氨基酸 A 开始计数。

10 9. 如前述权利要求任一项所述的 IL-2 变体或其衍生物，其包含选自 SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.18、SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.22、SEQ ID NO.24、SEQ ID NO.26、SEQ ID NO.28、SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.32、SEQ ID NO.34、SEQ ID NO.36 和 SEQ ID NO.41 中任一项所示的氨基酸。

15 10. 如前述权利要求任一项所述的 IL-2 变体或其衍生物，其是单体、和/或 PEG 化的、和/或糖基化的、和/或白蛋白缀合或融合的、和/或 Fc 融合的、和/或羟乙基化的、和/或去除 O-糖基化的；

优选地，PEG 连接至 IL-2 变体的 N 端；

20 更优选地，PEG 分子量为 5KD 至 50KD；

最优选地，PEG 分子量为 20KD。

11. 一种缀合物，其包含如前述权利要求任一项所述的 IL-2 变体或其衍生物，所述 IL-2 变体或其衍生物直接或通过接头间接地与非 IL-2 模块连接；

25 优选地，所述非 IL-2 模块是抗原结合模块；

更优选地，所述抗原结合模块是抗体或其抗原结合片段；

最优选地，所述抗体或其抗原结合片段靶向肿瘤细胞上或肿瘤细胞环境中呈现的抗原。

30 12. 一种药物组合物，其含有权利要求 1-10 任意一项所述的 IL-2 变体或其衍生物或权利要求 11 所述的缀合物，优选地，所述药物组合物含有药学上可接受的稀释剂、载体或助剂。

13. 核酸分子，其编码权利要求 1-10 中任意一项所述的 IL-2 变体或其衍生物，

35 优选地，所述核酸分子包含选自 SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.17、

SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.21、SEQ ID NO.23、SEQ ID NO.25、SEQ ID NO.27、SEQ ID NO.29、SEQ ID NO.31、SEQ ID NO.33、SEQ ID NO.35 和 SEQ ID NO. 40 中任一项所示的多核苷酸。

5 14. 表达载体，其包含权利要求 13 所述的核酸分子。

15. 宿主细胞，其包含权利要求 14 所述的表达载体，或表达权利要求 1-10 任一项所述的 IL-2 变体或其衍生物、权利要求 11 所述的缀合物，

优选地，所述宿主细胞为原核或真核细胞；

10 更优选地，所述宿主细胞为细菌或酵母菌或哺乳动物细胞；

最优选地，所述宿主细胞为酿酒酵母或大肠杆菌。

16. 如权利要求 1-10 中任一项所述的 IL-2 变体或其衍生物、权利要求 11 所述的缀合物、或权利要求 12 所述的药物组合物在制备药物中的用途；

15 当 IL-2 变体或其衍生物含有第二类突变时，所述的药物用于治疗增生性疾病或转移性增生性疾病、免疫性疾病、调节 T 细胞介导的免疫应答、刺激个体免疫系统；

优选地，所述增生性疾病是肿瘤或癌，所述免疫性疾病是糖尿病；

20 更优选地，所述肿瘤或癌选自上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌、乳头状瘤病毒引起的癌、腺癌、癌肿、黑素瘤、肉瘤、畸胎瘤、肺部肿瘤、转移性肺癌、淋巴瘤和转移性肾细胞癌；

当 IL-2 变体或其衍生物含有第三类突变时，所述的药物用于治疗自身免疫性疾病或器官移植之后的自身免疫反应；

优选地，所述自身免疫疾病选自 I 型糖尿病、类风湿性关节炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮（SLE）、湿疹、哮喘。

25

17. 一种治疗增生性疾病或转移性增生性疾病、免疫性疾病或调节 T 细胞介导的免疫应答、刺激个体免疫系统的方法，所述包括向受试者施用治疗有效量的权利要求 1-10 中任一项所述的 IL-2 变体或其衍生物、权利要求 1 所述的缀合物或权利要求 12 所述的药物组合物，

30 其中，所述 IL-2 变体或其衍生物均含有所述第二类突变；

优选地，所述增生性疾病是肿瘤或癌，所述免疫性疾病是糖尿病；

更优选地，所述肿瘤或癌选自上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌、乳头状瘤病毒引起的癌、腺癌、癌肿、黑素瘤、肉瘤、畸胎瘤、肺部肿瘤、转移性肺癌、淋巴瘤和转移性肾细胞癌。

35

18. 一种治疗和/或预防自身免疫性疾病或器官移植之后的自身免疫反应的方

法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的权利要求 1-3 和 6-10 中任一项所述的 IL-2 变体或其衍生物、权利要求 11 所述的缀合物或权利要求 12 所述的药物组合物，

其中，所述 IL-2 变体或其衍生物均含有所述第三类突变；

- 5 优选地，所述自身免疫疾病选自 I 型糖尿病、类风湿性关节炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮（SLE）、湿疹和哮喘。

19. 一种制备如权利要求 1-10 中任一项所述的 IL-2 变体或其衍生物的方法，所述方法包括：

- 10 向野生型人 IL-2 中引入突变，或
使用权利要求 13 的核酸分子，或
使用权利要求 14 的表达载体，或
使用权利要求 15 的宿主细胞进行重组表达。

- 15 20. 一种增加 IL-2 或其衍生物、缀合物稳定性的方法，所述方法包括在 IL-2 或其衍生物、缀合物中引入 1) -7) 任一项所示的突变或其任意组合：

- 1) N26Q,
2) N29S,
3) N30S,
20 4) N71Q,
5) Q11C 和 L132C,
6) L70C 和 P82C, 和
7) G27C 和 F78C。

25

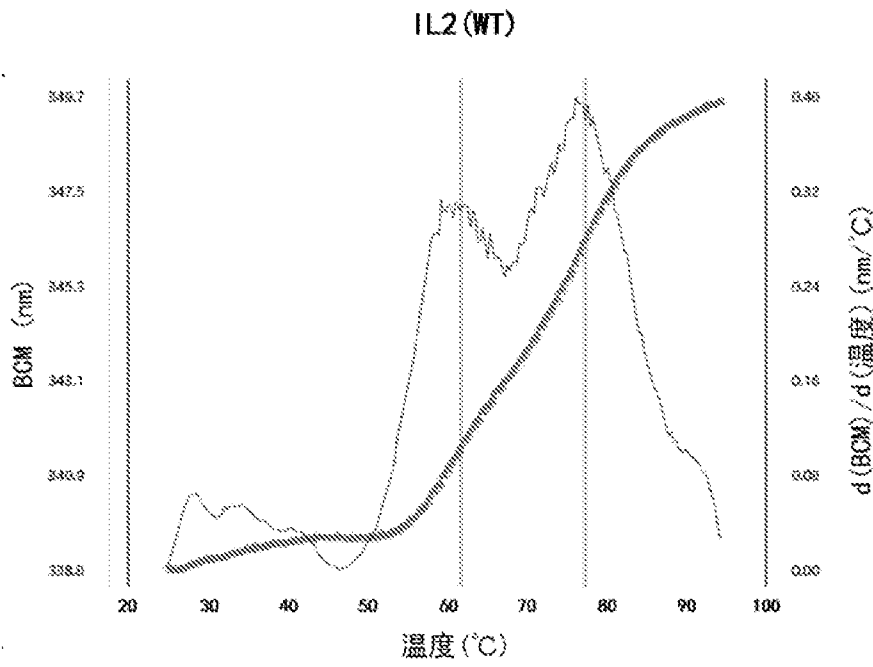


图 1A

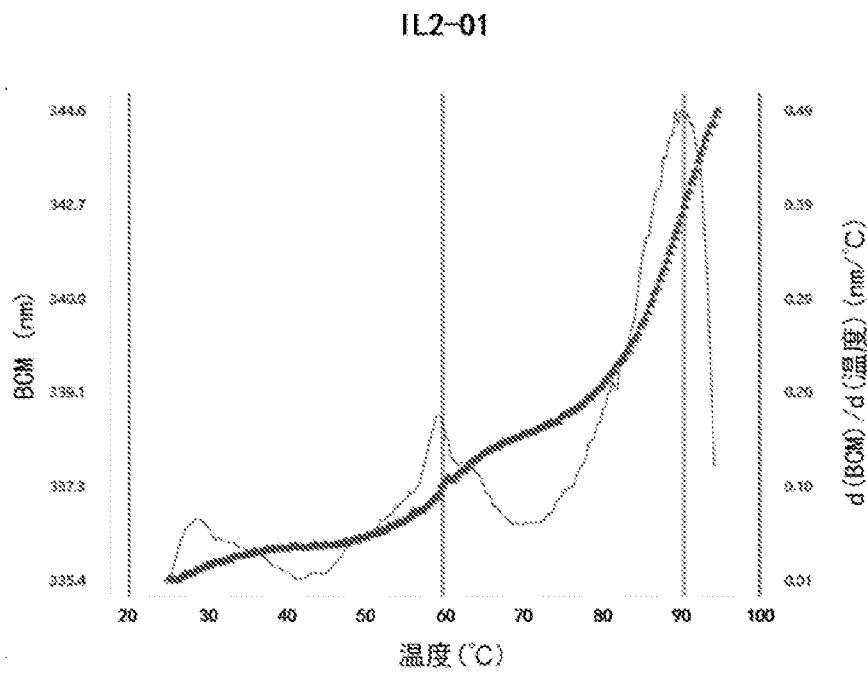


图 1B

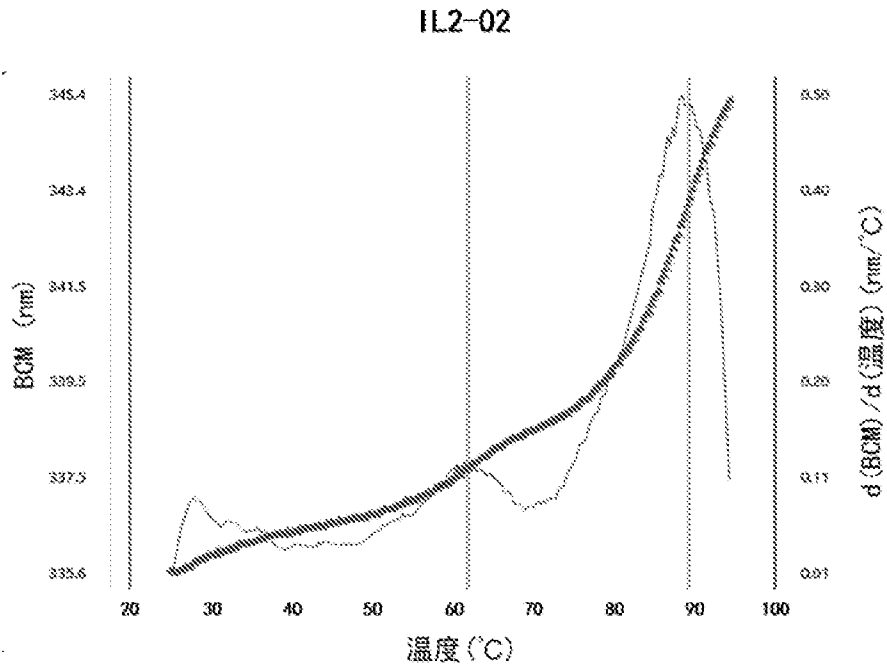


图 1C

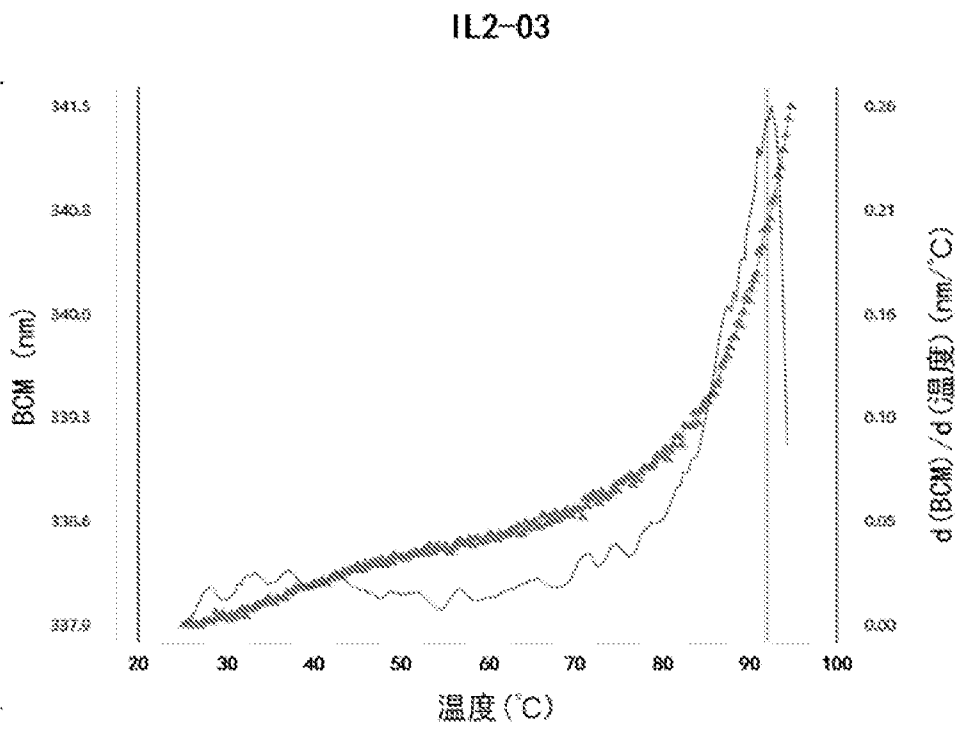


图 1D

IL2-04

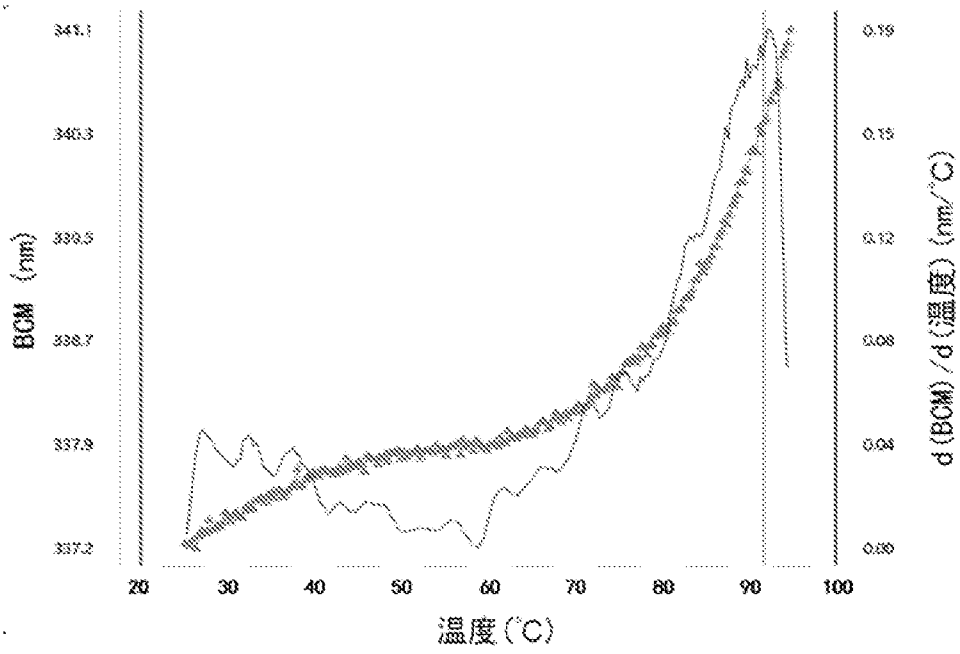


图 1E

IL2-05

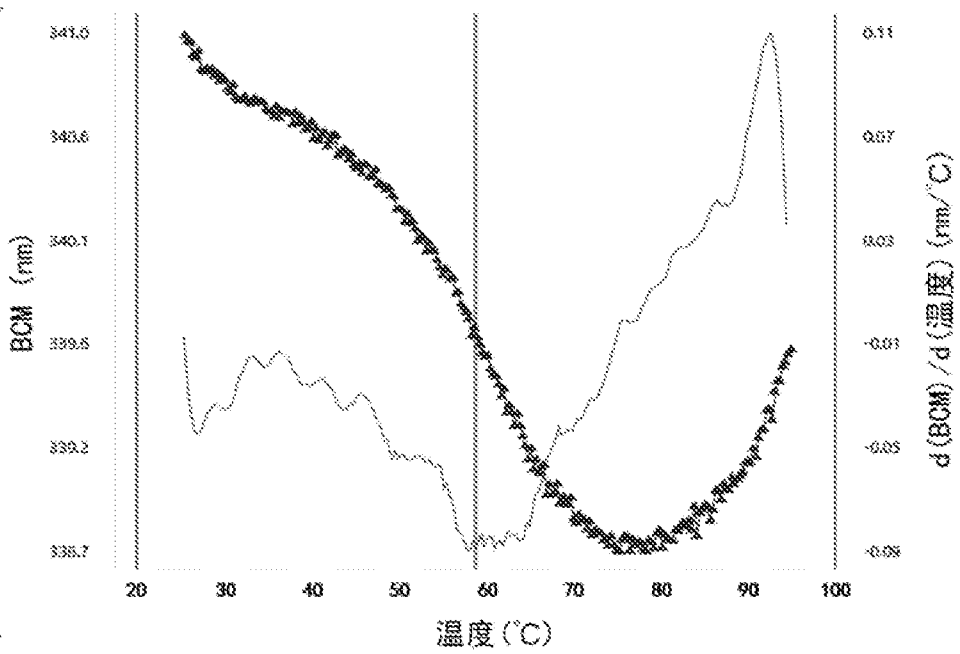


图 1F

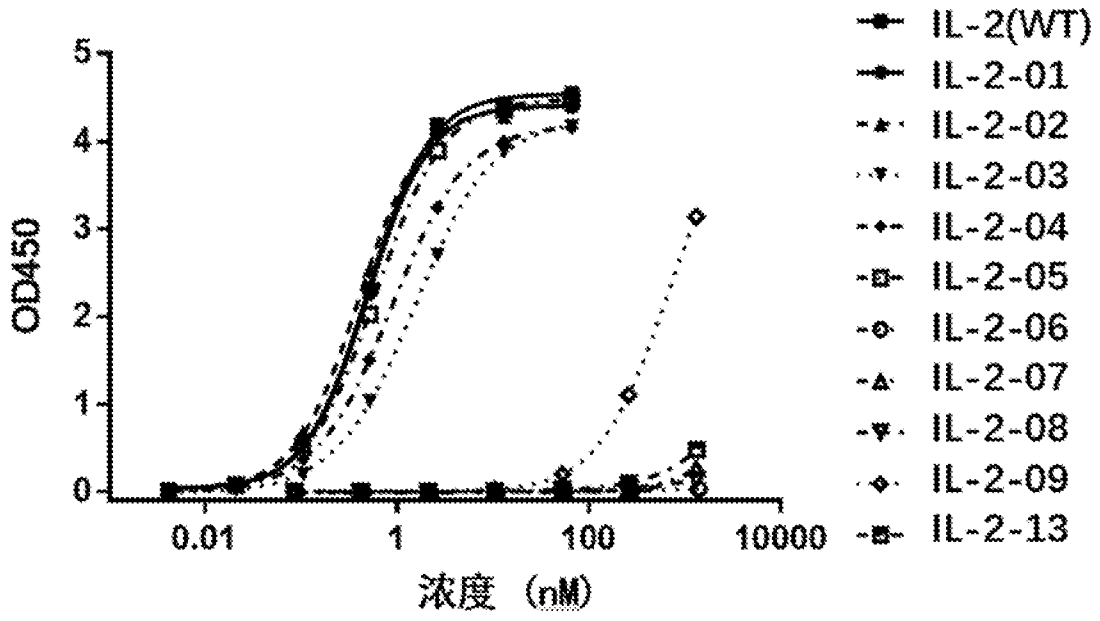


图 2

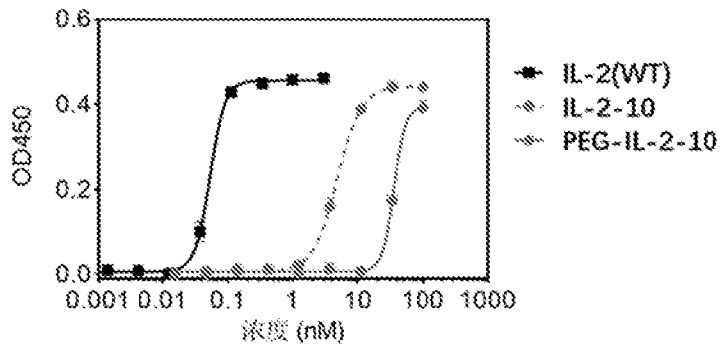


图 3A

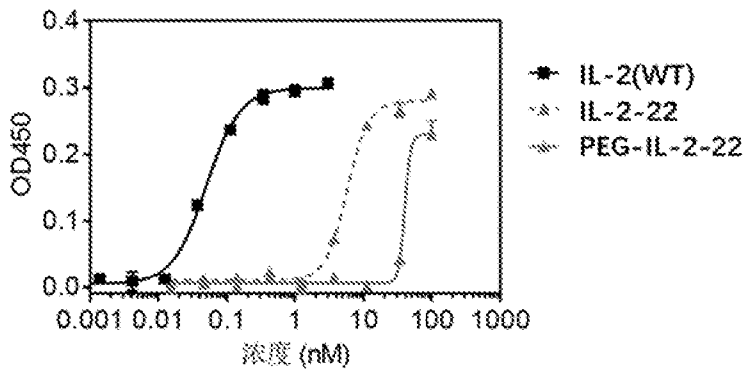


图 3B

5

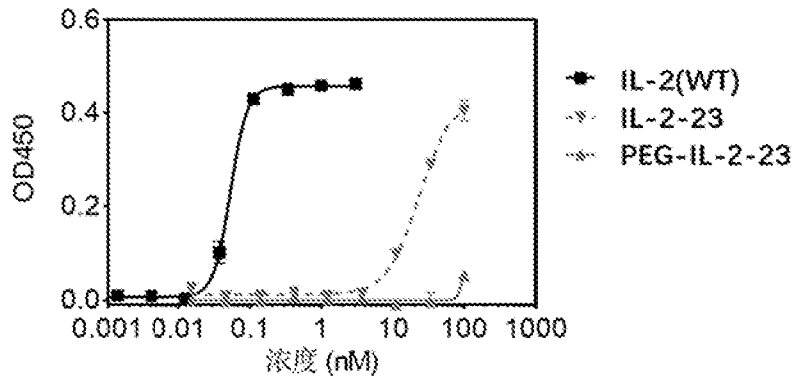


图 3C

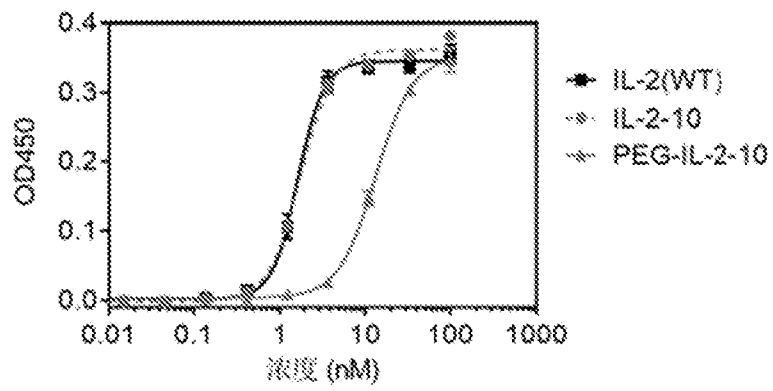


图 4A

5

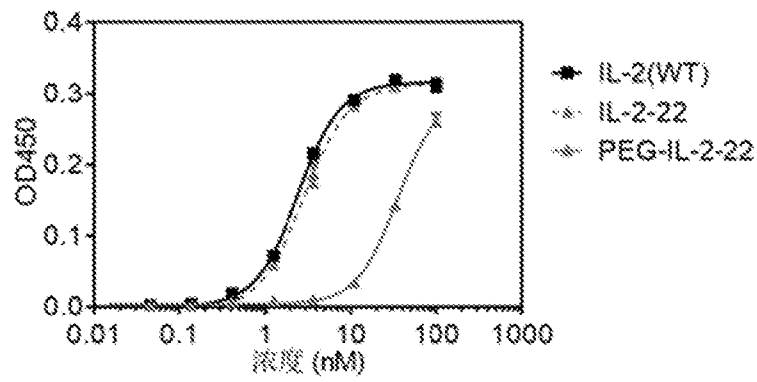


图 4B

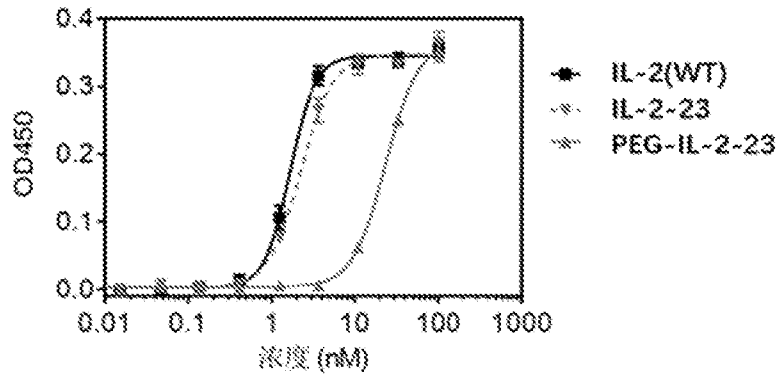
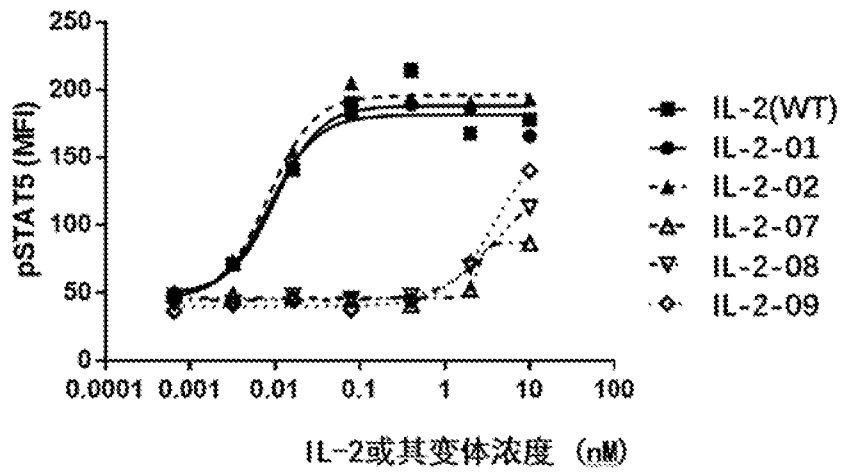


图 4C



5

图 5

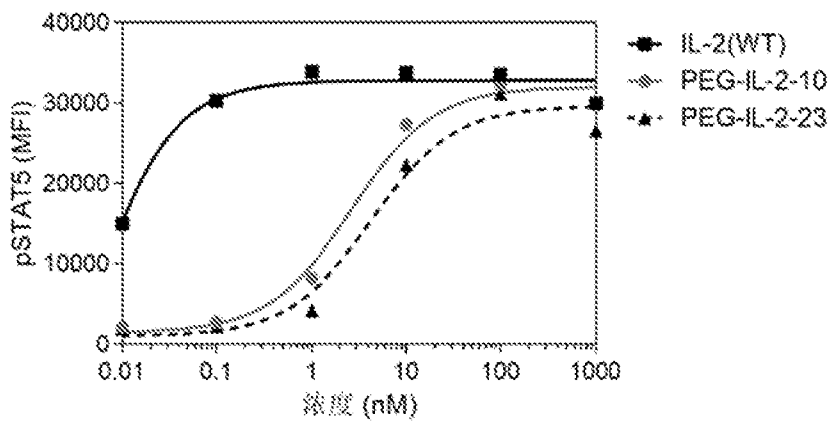


图 6A

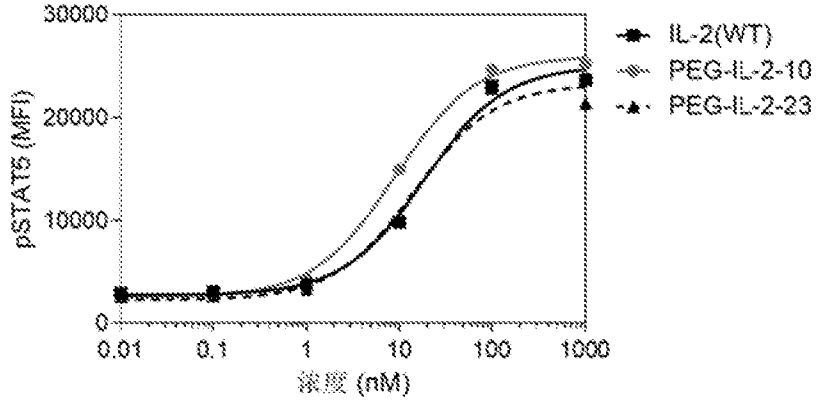


图 6B

5

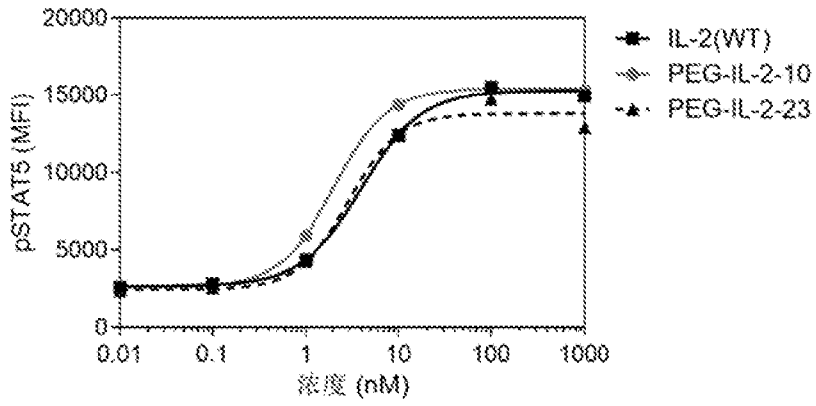


图 6C

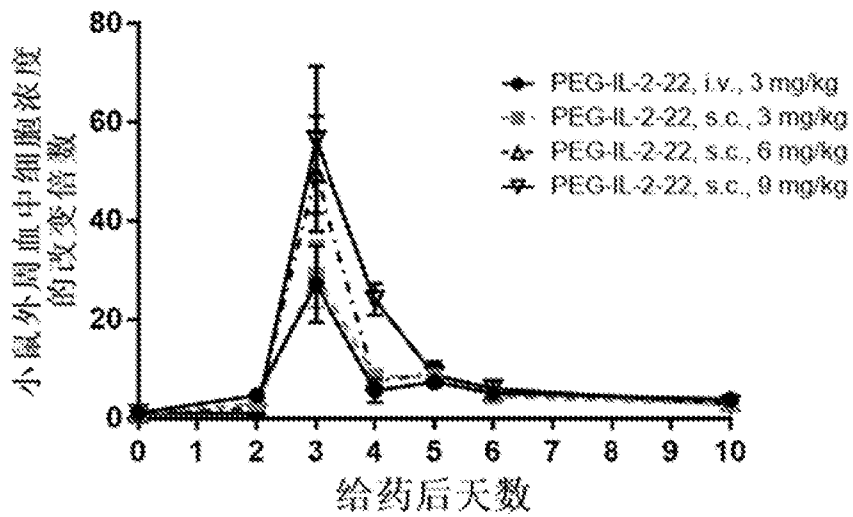


图 7A

10

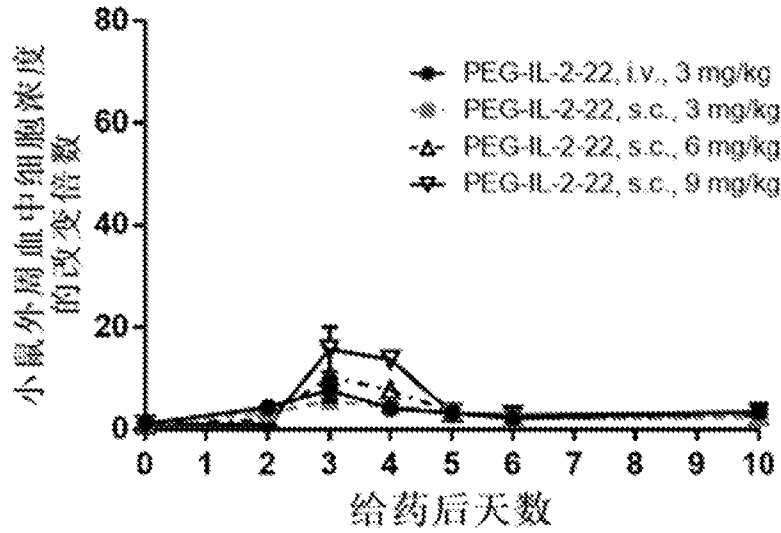


图 7B

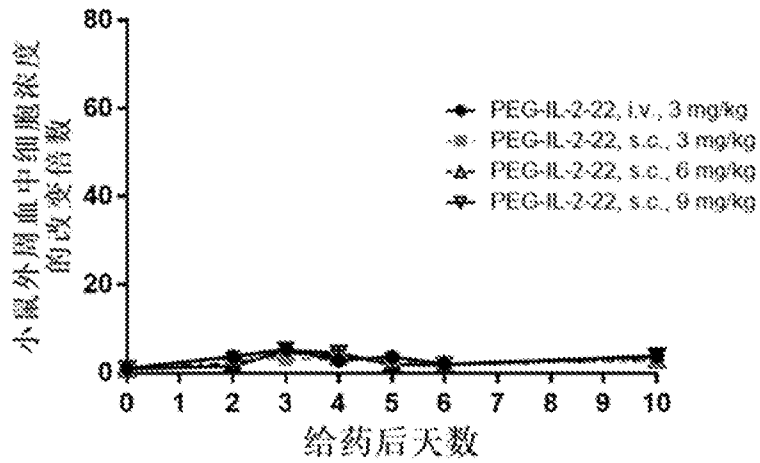


图 7C

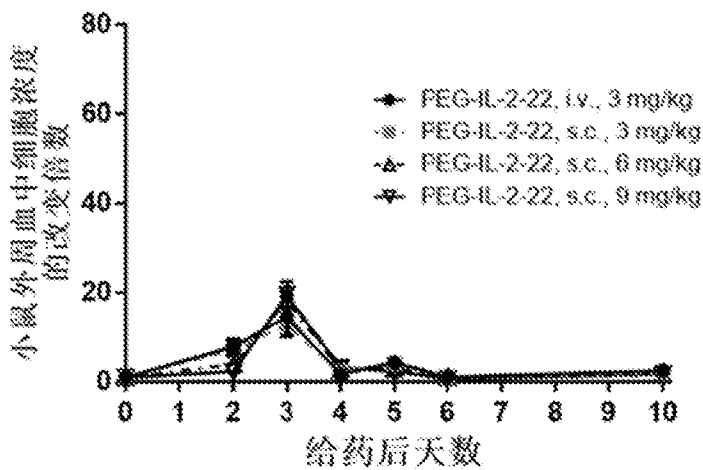


图 7D

5

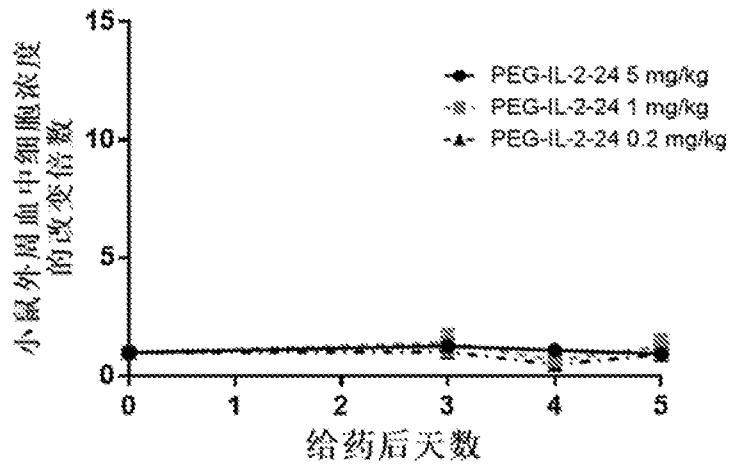


图 8A

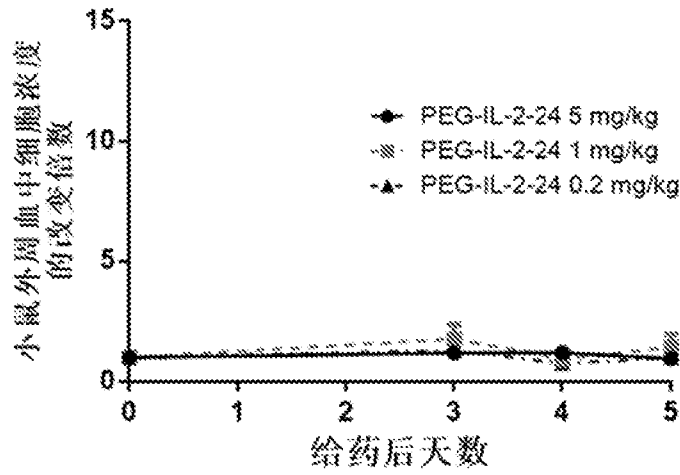


图 8B

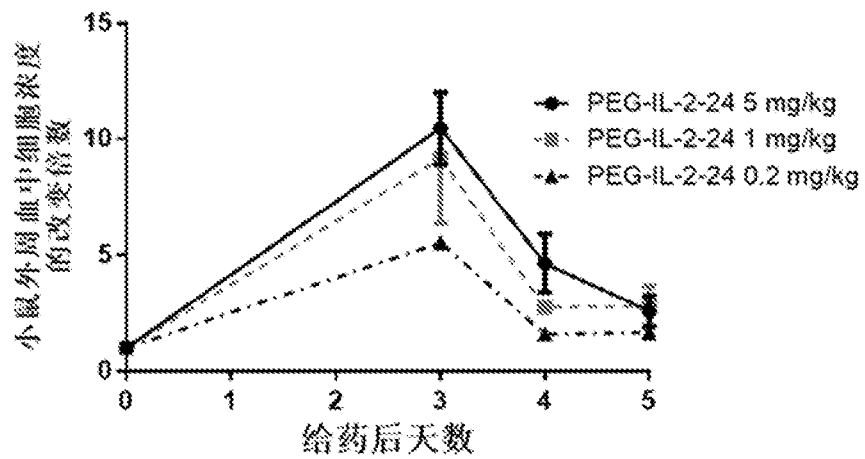


图 8C

5

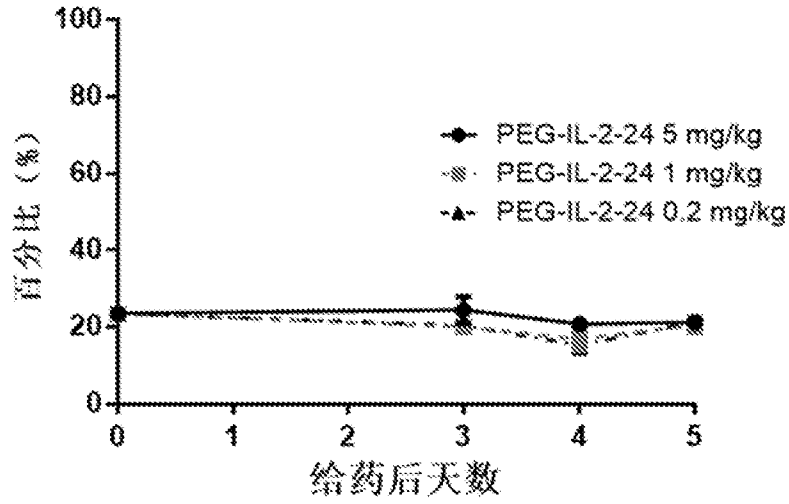


图 8D

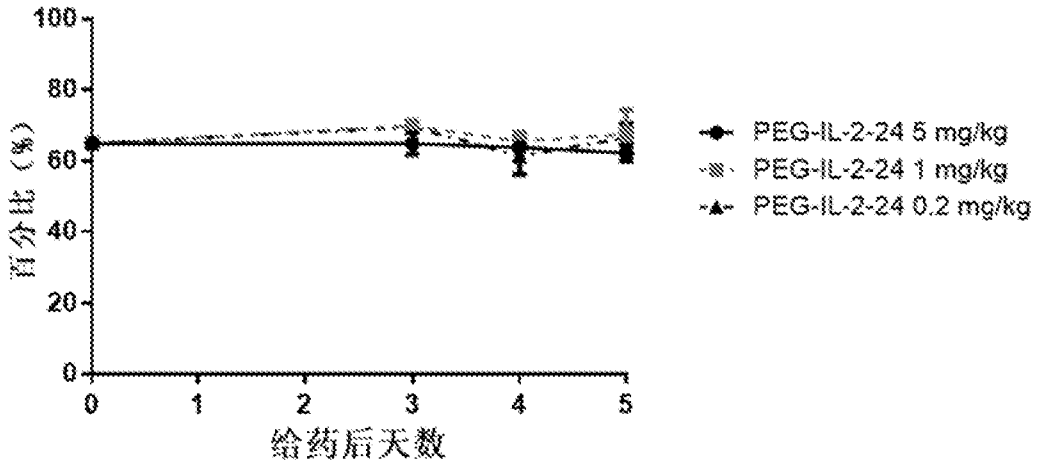


图 8E

5

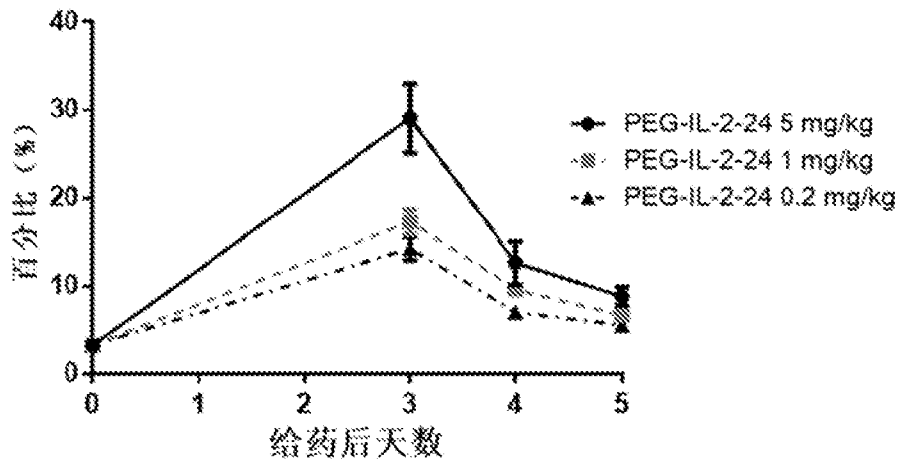


图 8F

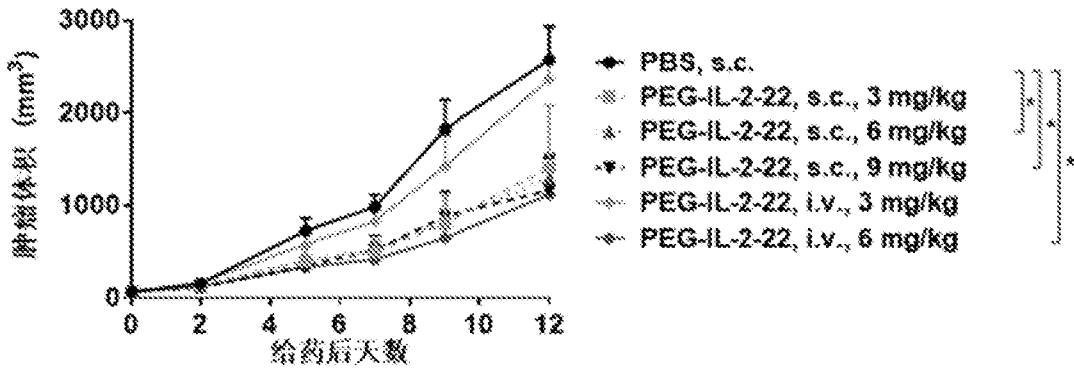


图 9

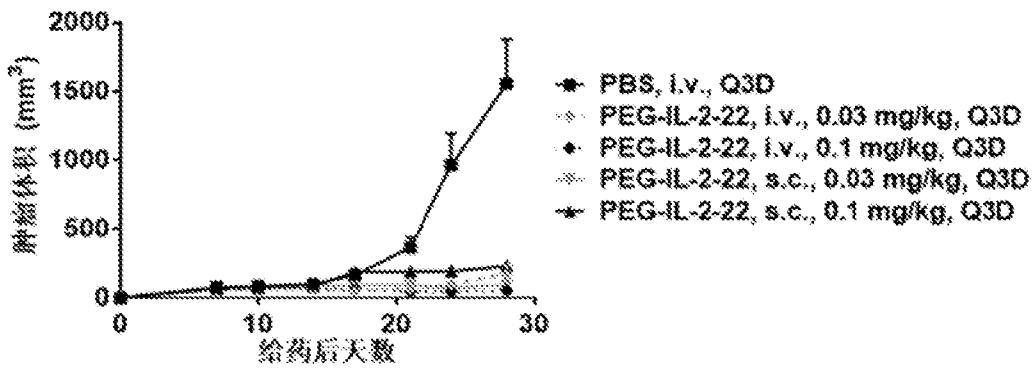


图 10

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/126901

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/55(2006.01)i; C07K 17/08(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/26(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61K 47/62(2017.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; C12P; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Database: CNMED; CNABS; CPEA; TWMED; DWPI; SIPOABS; EPOQUE; CNKI; ISI; ELESEVER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; 万方, WANFANG; 中国专利生物序列检索系统数据库, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System Database; Search Terms: 白细胞介素2, 白介素2, 变体, 突变, 衍生物, interleukin-2, IL-2, mutant, variant, analog, SEQ ID NOS: 3-41		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005007121 A2 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY et al.) 27 January 2005 (2005-01-27) see description, page 2, paragraph 1 to page 4, paragraph 2 and page 14, paragraph 2 to page 29, paragraph 1, and claims	1, 6, 8-16, 19, 20
Y	WO 2005007121 A2 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY et al.) 27 January 2005 (2005-01-27) see description, page 2, paragraph 1 to page 4, paragraph 2 and page 14, paragraph 2 to page 29, paragraph 1, and claims	2, 3, 7, 9, 13
A	WO 2005007121 A2 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY et al.) 27 January 2005 (2005-01-27) see description, page 2, paragraph 1 to page 4, paragraph 2 and page 14, paragraph 2 to page 29, paragraph 1, and claims	4, 5
X	CN 103492411 A (ROCHE GLYCART AG) 01 January 2014 (2014-01-01) see description, paragraphs [0084]-[0239], and claims	9-16, 19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 February 2020		Date of mailing of the international search report 13 March 2020
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		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/126901

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 103492411 A (ROCHE GLYCART AG) 01 January 2014 (2014-01-01) see description, paragraphs [0084]-[0239], and claims	2, 3, 7, 9, 13
A	CN 103492411 A (ROCHE GLYCART AG) 01 January 2014 (2014-01-01) see description, paragraphs [0084]-[0239], and claims	4-5
Y	CN 1599867 A (MERCK PATENT GMBH) 23 March 2005 (2005-03-23) see description, page 2, paragraph 2 to page 17, paragraph 5, and claims	2, 3, 7, 9, 13
A	CN 1599867 A (MERCK PATENT GMBH) 23 March 2005 (2005-03-23) see description, page 2, paragraph 2 to page 17, paragraph 5, and claims	4, 5

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.: **17-18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] A method for treating a disease (PCT Rule 39.1(iv)).
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/CN2019/126901

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2005007121	A2	27 January 2005	WO	2005007121	A3	14 September 2006
				US	2005142106	A1	30 June 2005
				US	2011306752	A1	15 December 2011
				US	2010036097	A1	11 February 2010
				US	7569215	B2	04 August 2009
				US	8349311	B2	08 January 2013
				US	7951360	B2	31 May 2011
<hr/>							
CN	103492411	A	01 January 2014	TW	201718029	A	01 June 2017
				KR	20130118363	A	29 October 2013
				RS	57767	B1	31 December 2018
				AU	2015249085	B2	14 December 2017
				PL	3075745	T3	31 July 2019
				PL	2673294	T3	30 November 2016
				CN	105440123	A	30 March 2016
				PE	03032014	A1	22 March 2014
				PT	3075745	T	14 November 2018
				CY	1117842	T1	17 May 2017
				US	10184009	B2	22 January 2019
				EA	201300896	A1	28 February 2014
				IL	269687	D0	28 November 2019
				AU	2012215573	A1	02 May 2013
				MX	340671	B	20 July 2016
				CN	103492411	B	07 December 2016
				EP	3075745	A1	05 October 2016
				ZA	201305282	B	27 July 2016
				NZ	710742	A	28 April 2017
				EP	2673294	A1	18 December 2013
				CA	2824253	A1	16 August 2012
				NZ	611749	A	28 August 2015
				IL	252230	D0	31 July 2017
				KR	20150092367	A	12 August 2015
				TW	1666027	B	21 July 2019
				DK	2673294	T3	30 May 2016
				DK	3075745	T3	26 November 2018
				US	2019077881	A1	14 March 2019
				SG	10201604160W	A	28 July 2016
				US	9266938	B2	23 February 2016
				CL	2013001987	A1	31 January 2014
				SI	2673294	T1	31 August 2016
				SI	3075745	T1	31 December 2018
				CR	20130314	A	09 August 2013
				HK	1217020	A1	16 December 2016
				PE	20140303	A1	22 March 2014
				MA	35803	B1	01 December 2014
				UA	117294	C2	10 July 2018
				ES	2694564	T3	21 December 2018
				EP	3489255	A1	29 May 2019
				US	2016208017	A1	21 July 2016
				EC	SP13012815	A	31 October 2013
				PE	10772018	A1	05 July 2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/126901

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				JP 6155300 B2	28 June 2017
				BR 112013018932 A2	02 May 2017
				HU E029139 T2	28 February 2017
				IL 252230 A	31 October 2019
				TW 201237165 A	16 September 2012
				LT 3075745 T	26 November 2018
CN	1599867	A	23 March 2005	EP 1454138 A4	21 February 2007
				RU 2312677 C2	20 December 2007
				WO 03048334 A2	12 June 2003
				MX PA04005266 A	11 October 2004
				US 2007036752 A1	15 February 2007
				ZA 200405247 B	31 August 2005
				PL 206975 B1	29 October 2010
				CA 2469151 A1	12 June 2003
				AU 2002357784 A1	17 June 2003
				PT 1454138 E	28 March 2012
				BR 0214650 A	03 May 2005
				US 7888071 B2	15 February 2011
				US 2003166163 A1	04 September 2003
				EP 1454138 B1	18 January 2012
				JP 2005511707 A	28 April 2005
				RU 2312677 C9	27 March 2008
				AU 2002357784 B2	31 July 2008
				HU 229098 B1	29 July 2013
				ES 2381025 T3	22 May 2012
				CN 100390282 C	28 May 2008
				KR 100988180 B1	18 October 2010
				CA 2469151 C	13 August 2013
				AT 542137 T	15 February 2012
				HU 0402541 A2	29 March 2005
				EP 2354791 A1	10 August 2011
				DK 1454138 T3	13 February 2012
				RU 2004119961 A	20 April 2005
				US 2009098609 A1	16 April 2009
				HU 0402541 A3	28 January 2010
				PL 369741 A1	02 May 2005
				EP 1454138 A2	08 September 2004
				US 7186804 B2	06 March 2007
				KR 20050044862 A	13 May 2005
				WO 03048334 A3	04 September 2003
				JP 4795640 B2	19 October 2011
				US 7462350 B2	09 December 2008

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 14/55(2006.01)i; C07K 17/08(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/26(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61K 47/62(2017.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i</p> <p>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</p>																																			
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; C12P; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>数据库: CNMED; CNABS; CPEA; TWMED; DWPI; SIPOABS; EPOQUE; CNKI; ISI; ELSEVEER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; 万方; 中国专利生物序列检索系统数据库 检索词: 白细胞介素2, 白介素2, 变体, 突变, 衍生物, interleukin-2, IL-2, mutant, variant, analog, SEQ ID NOS: 3-41</p>																																			
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2005007121 A2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY等) 2005年 1月 27日 (2005 - 01 - 27) 参见说明书第2页第1段-第4页第2段, 第14页第2段-29页第1段, 权利要求书</td> <td>1, 6, 8-16, 19-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2005007121 A2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY等) 2005年 1月 27日 (2005 - 01 - 27) 参见说明书第2页第1段-第4页第2段, 第14页第2段-29页第1段, 权利要求书</td> <td>2-3, 7, 9, 13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2005007121 A2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY等) 2005年 1月 27日 (2005 - 01 - 27) 参见说明书第2页第1段-第4页第2段, 第14页第2段-29页第1段, 权利要求书</td> <td>4-5</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 103492411 A (罗切格利卡特公司) 2014年 1月 1日 (2014 - 01 - 01) 参见说明书第0084-0239段, 权利要求书</td> <td>9-16, 19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103492411 A (罗切格利卡特公司) 2014年 1月 1日 (2014 - 01 - 01) 参见说明书第0084-0239段, 权利要求书</td> <td>2-3, 7, 9, 13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103492411 A (罗切格利卡特公司) 2014年 1月 1日 (2014 - 01 - 01) 参见说明书第0084-0239段, 权利要求书</td> <td>4-5</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <table border="1"> <tr> <td>* 引用文件的具体类型:</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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)</td> <td>“&” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	WO 2005007121 A2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY等) 2005年 1月 27日 (2005 - 01 - 27) 参见说明书第2页第1段-第4页第2段, 第14页第2段-29页第1段, 权利要求书	1, 6, 8-16, 19-20	Y	WO 2005007121 A2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY等) 2005年 1月 27日 (2005 - 01 - 27) 参见说明书第2页第1段-第4页第2段, 第14页第2段-29页第1段, 权利要求书	2-3, 7, 9, 13	A	WO 2005007121 A2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY等) 2005年 1月 27日 (2005 - 01 - 27) 参见说明书第2页第1段-第4页第2段, 第14页第2段-29页第1段, 权利要求书	4-5	X	CN 103492411 A (罗切格利卡特公司) 2014年 1月 1日 (2014 - 01 - 01) 参见说明书第0084-0239段, 权利要求书	9-16, 19	Y	CN 103492411 A (罗切格利卡特公司) 2014年 1月 1日 (2014 - 01 - 01) 参见说明书第0084-0239段, 权利要求书	2-3, 7, 9, 13	A	CN 103492411 A (罗切格利卡特公司) 2014年 1月 1日 (2014 - 01 - 01) 参见说明书第0084-0239段, 权利要求书	4-5	* 引用文件的具体类型:	“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	“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“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	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“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	“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)	“&” 同族专利的文件	“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	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																																	
X	WO 2005007121 A2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY等) 2005年 1月 27日 (2005 - 01 - 27) 参见说明书第2页第1段-第4页第2段, 第14页第2段-29页第1段, 权利要求书	1, 6, 8-16, 19-20																																	
Y	WO 2005007121 A2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY等) 2005年 1月 27日 (2005 - 01 - 27) 参见说明书第2页第1段-第4页第2段, 第14页第2段-29页第1段, 权利要求书	2-3, 7, 9, 13																																	
A	WO 2005007121 A2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY等) 2005年 1月 27日 (2005 - 01 - 27) 参见说明书第2页第1段-第4页第2段, 第14页第2段-29页第1段, 权利要求书	4-5																																	
X	CN 103492411 A (罗切格利卡特公司) 2014年 1月 1日 (2014 - 01 - 01) 参见说明书第0084-0239段, 权利要求书	9-16, 19																																	
Y	CN 103492411 A (罗切格利卡特公司) 2014年 1月 1日 (2014 - 01 - 01) 参见说明书第0084-0239段, 权利要求书	2-3, 7, 9, 13																																	
A	CN 103492411 A (罗切格利卡特公司) 2014年 1月 1日 (2014 - 01 - 01) 参见说明书第0084-0239段, 权利要求书	4-5																																	
* 引用文件的具体类型:	“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																																		
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“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																																		
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“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																																		
“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)	“&” 同族专利的文件																																		
“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																																			
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																																		
2020年 2月 10日	2020年 3月 13日																																		
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员																																		
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	马岚																																		
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(10)-62412181																																		

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 1599867 A (MERCK PATENT GMBH) 2005年 3月 23日 (2005 - 03 - 23) 参见说明书第2页第2段-第17页第5段, 权利要求书	2-3, 7, 9, 13
A	CN 1599867 A (MERCK PATENT GMBH) 2005年 3月 23日 (2005 - 03 - 23) 参见说明书第2页第2段-第17页第5段, 权利要求书	4-5

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： 17-18
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 疾病的治疗方法（PCT实施细则39.1(iv)）。
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/CN2019/126901

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2005007121	A2	2005年 1月 27日	WO	2005007121	A3	2006年 9月 14日
				US	2005142106	A1	2005年 6月 30日
				US	2011306752	A1	2011年 12月 15日
				US	2010036097	A1	2010年 2月 11日
				US	7569215	B2	2009年 8月 4日
				US	8349311	B2	2013年 1月 8日
				US	7951360	B2	2011年 5月 31日
<hr/>							
CN	103492411	A	2014年 1月 1日	TW	201718029	A	2017年 6月 1日
				KR	20130118363	A	2013年 10月 29日
				RS	57767	B1	2018年 12月 31日
				AU	2015249085	B2	2017年 12月 14日
				PL	3075745	T3	2019年 7月 31日
				PL	2673294	T3	2016年 11月 30日
				CN	105440123	A	2016年 3月 30日
				PE	03032014	A1	2014年 3月 22日
				PT	3075745	T	2018年 11月 14日
				CY	1117842	T1	2017年 5月 17日
				US	10184009	B2	2019年 1月 22日
				EA	201300896	A1	2014年 2月 28日
				IL	269687	D0	2019年 11月 28日
				AU	2012215573	A1	2013年 5月 2日
				MX	340671	B	2016年 7月 20日
				CN	103492411	B	2016年 12月 7日
				EP	3075745	A1	2016年 10月 5日
				ZA	201305282	B	2016年 7月 27日
				NZ	710742	A	2017年 4月 28日
				EP	2673294	A1	2013年 12月 18日
				CA	2824253	A1	2012年 8月 16日
				NZ	611749	A	2015年 8月 28日
				IL	252230	D0	2017年 7月 31日
				KR	20150092367	A	2015年 8月 12日
				TW	1666027	B	2019年 7月 21日
				DK	2673294	T3	2016年 5月 30日
				DK	3075745	T3	2018年 11月 26日
				US	2019077881	A1	2019年 3月 14日
				SG	10201604160W	A	2016年 7月 28日
				US	9266938	B2	2016年 2月 23日
				CL	2013001987	A1	2014年 1月 31日
				SI	2673294	T1	2016年 8月 31日
				SI	3075745	T1	2018年 12月 31日
				CR	20130314	A	2013年 8月 9日
				HK	1217020	A1	2016年 12月 16日
				PE	20140303	A1	2014年 3月 22日
				MA	35803	B1	2014年 12月 1日
				UA	117294	C2	2018年 7月 10日
				ES	2694564	T3	2018年 12月 21日
				EP	3489255	A1	2019年 5月 29日
				US	2016208017	A1	2016年 7月 21日
				EC	SP13012815	A	2013年 10月 31日
				PE	10772018	A1	2018年 7月 5日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/126901

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)
				JP	6155300	B2	2017年 6月 28日
				BR	112013018932	A2	2017年 5月 2日
				HU	E029139	T2	2017年 2月 28日
				IL	252230	A	2019年 10月 31日
				TW	201237165	A	2012年 9月 16日
				LT	3075745	T	2018年 11月 26日
CN	1599867	A	2005年 3月 23日	EP	1454138	A4	2007年 2月 21日
				RU	2312677	C2	2007年 12月 20日
				WO	03048334	A2	2003年 6月 12日
				MX	PA04005266	A	2004年 10月 11日
				US	2007036752	A1	2007年 2月 15日
				ZA	200405247	B	2005年 8月 31日
				PL	206975	B1	2010年 10月 29日
				CA	2469151	A1	2003年 6月 12日
				AU	2002357784	A1	2003年 6月 17日
				PT	1454138	E	2012年 3月 28日
				BR	0214650	A	2005年 5月 3日
				US	7888071	B2	2011年 2月 15日
				US	2003166163	A1	2003年 9月 4日
				EP	1454138	B1	2012年 1月 18日
				JP	2005511707	A	2005年 4月 28日
				RU	2312677	C9	2008年 3月 27日
				AU	2002357784	B2	2008年 7月 31日
				HU	229098	B1	2013年 7月 29日
				ES	2381025	T3	2012年 5月 22日
				CN	100390282	C	2008年 5月 28日
				KR	100988180	B1	2010年 10月 18日
				CA	2469151	C	2013年 8月 13日
				AT	542137	T	2012年 2月 15日
				HU	0402541	A2	2005年 3月 29日
				EP	2354791	A1	2011年 8月 10日
				DK	1454138	T3	2012年 2月 13日
				RU	2004119961	A	2005年 4月 20日
				US	2009098609	A1	2009年 4月 16日
				HU	0402541	A3	2010年 1月 28日
				PL	369741	A1	2005年 5月 2日
				EP	1454138	A2	2004年 9月 8日
				US	7186804	B2	2007年 3月 6日
				KR	20050044862	A	2005年 5月 13日
				WO	03048334	A3	2003年 9月 4日
				JP	4795640	B2	2011年 10月 19日
				US	7462350	B2	2008年 12月 9日