



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113383013 B

(45) 授权公告日 2022.11.04

(21) 申请号 201980072296.9
 (22) 申请日 2019.12.20
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 113383013 A
 (43) 申请公布日 2021.09.10
 (66) 本国优先权数据
 201811570930.5 2018.12.21 CN
 201910158957.1 2019.03.04 CN
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2021.04.30
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/CN2019/126901 2019.12.20
 (87) PCT国际申请的公布数据
 WO2020/125743 ZH 2020.06.25
 (73) 专利权人 江苏恒瑞医药股份有限公司
 地址 222047 江苏省连云港市经济技术开
 发区昆仑山路7号
 专利权人 上海恒瑞医药有限公司
 上海盛迪医药有限公司
 (72) 发明人 陈磊 胡齐悦 葛虎 林源
 王宏伟 欧阳超 孔祥林 廖成
 张连山
 (74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限
 公司 11314
 专利代理师 程伟

(51) Int.Cl.
 C07K 14/55 (2006.01)
 C07K 17/08 (2006.01)
 C07K 19/00 (2006.01)
 C12N 15/26 (2006.01)
 C12N 15/63 (2006.01)
 C12P 21/02 (2006.01)
 A61K 38/20 (2006.01)
 A61K 47/60 (2006.01)
 A61K 47/62 (2006.01)
 A61K 47/68 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
 A61P 37/00 (2006.01)
 (56) 对比文件
 WO 2005007121 A2,2005.01.27
 WO 2005007121 A2,2005.01.27
 WO 2005007121 A2,2005.01.27
 CN 103492411 A,2014.01.01
 CN 103492411 A,2014.01.01
 CN 103492411 A,2014.01.01
 CN 1599867 A,2005.03.23
 CN 1599867 A,2005.03.23
 审查员 马岚

权利要求书3页 说明书43页
 序列表26页 附图11页

(54) 发明名称
 一种人白细胞介素2变体或其衍生物

其衍生物、包含其的免疫缀合物或药物组合物的
 制药用途。

(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

CN 113383013 B

1. 一种IL-2变体,其相对于野生型IL-2的突变为如下21)、24)、29)任一项所示:
 - 21) N26Q、N29S、F42A、N71Q和L72G,
 - 24) N26Q、N30S、F42A和L72G,
 - 29) Q11C、29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL和L132C;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。
2. 如权利要求1所述的IL-2变体,其稳定性是较之野生型IL-2增加的。
3. 如权利要求1所述的IL-2变体,其还包括C125A的氨基酸突变。
4. 如权利要求1所述的IL-2变体,所述野生型IL-2的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。
5. 一种IL-2变体,其氨基酸序列如SEQ ID NO.22、SEQ ID NO.34或SEQ ID NO.36中任一项所示。
6. 如权利要求1-5任一项所述的IL-2变体,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。
7. 如权利要求6所述的IL-2变体,所述PEG连接至IL-2变体的N端。
8. 如权利要求7所述的IL-2变体,所述PEG分子量为5KD至50KD。
9. 如权利要求8所述的IL-2变体,所述PEG分子量为20KD。
10. 一种IL-2变体,其相对于野生型IL-2的突变为如下22)所示:
 - 22) N26Q、N29S和N88R,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。
11. 如权利要求10所述的IL-2变体,其稳定性是较之野生型IL-2增加的。
12. 如权利要求10所述的IL-2变体,其还包括C125A的氨基酸突变。
13. 如权利要求10所述的IL-2变体,所述野生型IL-2的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。
14. 一种IL-2变体,其氨基酸序列如SEQ ID NO.41所示。
15. 如权利要求10-14任一项所述的IL-2变体,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。
16. 如权利要求15所述的IL-2变体,所述PEG连接至IL-2变体的N端。
17. 如权利要求16所述的IL-2变体,所述PEG分子量为5KD至50KD。
18. 如权利要求17所述的IL-2变体,所述PEG分子量为20KD。
19. 一种缀合物,其包含如权利要求1-9任一项所述的IL-2变体,所述IL-2变体直接或通过接头间接地与非IL-2模块连接。
20. 如权利要求19所述的缀合物,所述非IL-2模块是抗原结合模块。
21. 如权利要求20所述的缀合物,所述抗原结合模块是抗体或其抗原结合片段。
22. 如权利要求21所述的缀合物,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。
23. 一种缀合物,其包含如权利要求10-18任一项所述的IL-2变体,所述IL-2变体直接或通过接头间接地与非IL-2模块连接。
24. 如权利要求23所述的缀合物,所述非IL-2模块是抗原结合模块。

25. 如权利要求24所述的缀合物,所述抗原结合模块是抗体或其抗原结合片段。
26. 一种药物组合物,其含有权利要求1-9任一项所述的IL-2变体或权利要求19-22任一项所述的缀合物,所述药物组合物含有药学上可接受的稀释剂、载体或助剂。
27. 一种药物组合物,其含有权利要求10-18任一项所述的IL-2变体或权利要求23-25任一项所述的缀合物,所述药物组合物含有药学上可接受的稀释剂、载体或助剂。
28. 一种核酸分子,其编码权利要求1-9中任一项所述的IL-2变体。
29. 如权利要求19所述的核酸分子,其包含选自SEQ ID NO.21、SEQ ID NO.33、SEQ ID NO.35中任一项所示的多核苷酸。
30. 一种核酸分子,其编码权利要求10-18中任一项所述的IL-2变体。
31. 如权利要求30所述的核酸分子,其包含选自SEQ ID NO.40所示的多核苷酸。
32. 一种表达载体,其包含权利要求28或29所述的核酸分子。
33. 一种表达载体,其包含权利要求30或31所述的核酸分子。
34. 一种宿主细胞,其包含权利要求32所述的表达载体,或表达权利要求1-9任一项所述的IL-2变体、权利要求19-22任一项所述的缀合物。
35. 如权利要求34所述的宿主细胞,其为原核或真核细胞。
36. 如权利要求35所述的宿主细胞,其为细菌或酵母菌或哺乳动物细胞。
37. 如权利要求36所述的宿主细胞,其为酿酒酵母或大肠杆菌。
38. 一种宿主细胞,其包含权利要求33所述的表达载体,或表达权利要求10-18任一项所述的IL-2变体、权利要求23-25任一项所述的缀合物。
39. 如权利要求38所述的宿主细胞,其为原核或真核细胞。
40. 如权利要求39所述的宿主细胞,其为细菌或酵母菌或哺乳动物细胞。
41. 如权利要求40所述的宿主细胞,其为酿酒酵母或大肠杆菌。
42. 如权利要求1-9中任一项所述的IL-2变体、权利要求19-22任一项所述的缀合物、权利要求26所述的药物组合物或权利要求28-29任一项所述的核酸分子在制备药物中的用途,所述药物用于治疗增生性疾病或转移性增生性疾病、刺激个体免疫系统。
43. 如权利要求42所述的用途,所述增生性疾病是肿瘤或癌。
44. 如权利要求43所述的用途,所述肿瘤或癌选自膀胱癌、脑癌、头颈癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、食道癌、结直肠癌、胃癌、前列腺癌、血液癌、皮肤癌、骨癌和肾癌。
45. 如权利要求10-18中任一项所述的IL-2变体、权利要求23-25任一项所述的缀合物、权利要求27所述的药物组合物或权利要求30-31任一项所述的核酸分子在制备药物中的用途,所述药物用于治疗自身免疫性疾病。
46. 如权利要求45所述的用途,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。
47. 一种制备如权利要求1-9中任一项所述的IL-2变体的方法,所述方法包括:
向野生型人IL-2中引入突变,或
使用权利要求28或29的核酸分子,或
使用权利要求32的表达载体,或
使用权利要求34-37任一项的宿主细胞进行重组表达。
48. 一种制备如权利要求10-18中任一项所述的IL-2变体的方法,所述方法包括:

向野生型人IL-2中引入突变,或
使用权利要求30或31的核酸分子,或
使用权利要求33的表达载体,或
使用权利要求38-41任一项的宿主细胞进行重组表达。

一种人白细胞介素2变体或其衍生物

技术领域

[0001] 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

[0002] 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。

[0003] 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。

[0004] 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。

[0005] 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。

[0006] 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。

[0007] 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。

[0008] 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。

发明内容

[0009] 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。

[0010] 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)。

[0011] 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(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)。

[0012] 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:

[0013] (1) N26Q,

[0014] (2) N29S,

[0015] (3) N30S,

[0016] (4) N71Q,

[0017] (5) Q11C和L132C,

[0018] (6) L70C和P82C,和

[0019] (7) G27C和F78C。

[0020] 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。

[0021] 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)。

[0022] 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:

[0023] (8) F42A,

[0024] (9) Y45A,

[0025] (10) L72G,和

[0026] (11) 29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL。

[0027] 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。

[0028] 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)。

[0029] 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:

[0030] (12) N88突变为A、R、E、L、F、G、I、M、S、Y、V或D,

[0031] (13) D20突变为A、H、I、M、E、S、V、W或Y,(2)

[0032] (14) Q126突变为N、L、P、F、G、I、M、R、S、T、Y、V。

[0033] 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和力比中等亲和力受体的亲和力降低得更多;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。

[0034] 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。

[0035] 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:

[0036] (15) N26Q和N29S,

[0037] (16) N26Q、N29S和N71Q,和

[0038] (17) N26Q和N30S;

[0039] 第二类突变选自(18)-(20)和(11)中的任一项:

[0040] (18) F42A和Y45A,

[0041] (19) F42A和L72G,和

[0042] (20) Y45A和L72G;

[0043] 第三类突变为N88R或N88G或N88I或N88D。

[0044] 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:

[0045] (21) N26Q、N29S、F42A、N71Q和L72G,

[0046] (22) N26Q、N29S和N88R,

[0047] (23) N26Q、N29S、F42A和L72G,

[0048] (24) N26Q、N30S、F42A和L72G,

[0049] (25) Q11C、N26Q、N30S、F42A、L72G和L132C,

[0050] (26) N26Q、N30S、F42A、L70C、L72G和P82C,

[0051] (27) N26Q、G27C、N30S、F42A、L72G和F78C,

[0052] (28) N29S、F42A和L72G,和

[0053] (29) Q11C、29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL和L132C。

[0054] 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):

[0055] (30) N26Q/Q11C/L132C;

[0056] (31) N26Q/L70C/P82C;

[0057] (32) N26Q/G27C/F78C;

[0058] (33) N26Q/29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL;

[0059] (34) N26Q/F42A/Y45A;

[0060] (35) N26Q/F42A/L72G;

[0061] (36) N26Q/Y45A/L72G;

[0062] (37) N26Q/F42A/Y45A/L72G;

[0063] (38) Q11C/N30S/L132C;

[0064] (39) N30S/L70C/P82C;

[0065] (40) G27C/N30S/F78C;

[0066] (41) N30S/F42A/Y45A;

[0067] (42) N30S/F42A/L72G;

[0068] (43) N30S/Y45A/L72G;

[0069] (44) N30S/F42A/Y45A/L72G;

- [0070] (45) N29S/N30S/F42A/L72G;
- [0071] (46) Q11C/F42A/Y45A;
- [0072] (47) Q11C/F42A/L72G/L132C;
- [0073] (48) Q11C/Y45A/L72G/L132C;
- [0074] (49) Q11C/F42A/Y45A/L72G/L132C;
- [0075] (50) Q11C/N29S/F42A/L72G/L132C;
- [0076] (51) 29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL/L70C/P82C;
- [0077] (52) F42A/Y45A/L70C/P82C;
- [0078] (53) F42A/L70C/L72G/P82C;
- [0079] (54) Y45A/L70C/L72G/P82C;
- [0080] (55) F42A/Y45A/L70C/L72G/P82C;
- [0081] (56) N29S/F42A/L70C/L72G/P82C;
- [0082] (57) G27C/29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL/F78C;
- [0083] (58) G27C/F42A/Y45A/F78C;
- [0084] (59) G27C/F42A/L72G/F78C;
- [0085] (60) G27C/Y45A/L72G/F78C;
- [0086] (61) G27C/F42A/Y45A/L72G/F78C;
- [0087] (62) G27C/N29S/F42A/L72G/F78C;
- [0088] (63) 29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL/Y45A;
- [0089] (64) 29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL/L72G;
- [0090] (65) 29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL/Y45A/L72G;
- [0091] (66) N26Q/N30S/Q11C/L132C;
- [0092] (67) N26Q/N30S/L70C/P82C;
- [0093] (68) N26Q/G27C/N30S/F78C;
- [0094] (69) N26Q/N30S/F42A/Y45A;
- [0095] (70) N26Q/N30S/F42A/L72G;
- [0096] (71) N26Q/N30S/Y45A/L72G;
- [0097] (72) N26Q/N30S/F42A/Y45A/L72G;
- [0098] (73) N26Q/N29S/N30S/F42A/L72G;
- [0099] (74) N26Q/N29S/N30S;
- [0100] (75) N26Q/N29S/Q11C/L132C;
- [0101] (76) N26Q/N29S/L70C/P82C;
- [0102] (77) N26Q/N29S/G27C/F78C;
- [0103] (78) N26Q/N29S/F42A/Y45A;
- [0104] (79) N26Q/N29S/Y45A/L72G;
- [0105] (80) N26Q/N29S/F42A/Y45A/L72G;
- [0106] (81) Q11C/N29S/N30S/L132C;
- [0107] (82) N29S/N30S/L70C/P82C;
- [0108] (83) G27C/N29S/N30S/F78C;

- [0109] (84) N29S/N30S/F42A/Y45A;
- [0110] (85) N29S/N30S/F42A/L72G;
- [0111] (86) N29S/N30S/Y45A/L72G;
- [0112] (87) N29S/N30S/F42A/Y45A/L72G;
- [0113] (88) Q11C/N29S/F42A/Y45A/L132C;
- [0114] (89) Q11C/N29S/F42A/L72G/L132C;
- [0115] (90) Q11C/N29S/Y45A/L72G/L132C;
- [0116] (91) Q11C/N29S/F42A/Y45A/L72G/L132C;
- [0117] (92) N29S/F42A/Y45A/L70C/P82C;
- [0118] (93) N29S/F42A/L70C/L72G/P82C;
- [0119] (94) N29S/Y45A/L70C/L72G/P82C;
- [0120] (95) N29S/F42A/Y45A/L70C/L72G/P82C;
- [0121] (96) G27C/N29S/F78C/F42A/Y45A;
- [0122] (97) G27C/N29S/F78C/F42A/L72G;
- [0123] (98) G27C/N29S/F78C/Y45A/L72G;
- [0124] (99) G27C/N29S/F78C/F42A/Y45A/L72G;
- [0125] (100) N29S/F42A/Y45A;
- [0126] (101) N29S/F42A/L72G;
- [0127] (102) N29S/Y45A/L72G;
- [0128] (103) N29S/F42A/Y45A/L72G;
- [0129] (104) Q11C/N29S/L132C;
- [0130] (105) N29S/L70C/P82C;
- [0131] (106) G27C/N29S/F78C;
- [0132] (107) N29S/N30S;
- [0133] (108) N26Q/N29S;
- [0134] (109) N26Q/N71Q;
- [0135] (110) N30S/N71Q;
- [0136] (111) Q11C/N71Q/L132C;
- [0137] (112) L70C/N71Q/P82C;
- [0138] (113) G27C/N71Q/F78C;
- [0139] (114) 29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL/N71Q;
- [0140] (115) F42A/Y45A/N71Q;
- [0141] (116) F42A/N71Q/L72G;
- [0142] (117) Y45A/N71Q/L72G;
- [0143] (118) N26Q/N30S/F42A/N71Q/L72G;
- [0144] (119) Q11C/N26Q/N30S/F42A/N71Q/L72G/L132C;
- [0145] (120) N26Q/N30S/F42A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
- [0146] (121) N26Q/G27C/N30S/F42A/N71Q/L72G/F78C;
- [0147] (122) N29S/F42A/N71Q/L72G;

- [0148] (123) N26Q/N30S/N71Q;
- [0149] (124) N26Q/Q11C/N71Q/L132C;
- [0150] (125) N26Q/L70C/N71Q/P82C;
- [0151] (126) N26Q/G27C/N71Q/F78C;
- [0152] (127) N26Q/29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL/N71Q;
- [0153] (128) N26Q/F42A/Y45A/N71Q;
- [0154] (129) N26Q/F42A/N71Q/L72G;
- [0155] (130) N26Q/Y45A/N71Q/L72G;
- [0156] (131) N26Q/F42A/Y45A/N71Q/L72G;
- [0157] (132) Q11C/N30S/N71Q/L132C;
- [0158] (133) N30S/L70C/N71Q/P82C;
- [0159] (134) G27C/N30S/N71Q/F78C;
- [0160] (135) N30S/F42A/Y45A/N71Q;
- [0161] (136) N30S/F42A/N71Q/L72G;
- [0162] (137) N30S/Y45A/N71Q/L72G;
- [0163] (138) N30S/F42A/Y45A/N71Q/L72G;
- [0164] (139) N29S/N30S/F42A/N71Q/L72G;
- [0165] (140) Q11C/F42A/Y45A/N71Q;
- [0166] (141) Q11C/F42A/N71Q/L72G/L132C;
- [0167] (142) Q11C/Y45A/N71Q/L72G/L132C;
- [0168] (143) Q11C/F42A/Y45A/N71Q/L72G/L132C;
- [0169] (144) Q11C/N29S/F42A/N71Q/L72G/L132C;
- [0170] (145) 29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL/L70C/N71Q/P82C;
- [0171] (146) F42A/Y45A/L70C/N71Q/P82C;
- [0172] (147) F42A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
- [0173] (148) Y45A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
- [0174] (149) F42A/Y45A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
- [0175] (150) N29S/F42A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
- [0176] (151) G27C/29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL/N71Q/F78C;
- [0177] (152) G27C/F42A/Y45A/N71Q/F78C;
- [0178] (153) G27C/F42A/N71Q/L72G/F78C;
- [0179] (154) G27C/Y45A/N71Q/L72G/F78C;
- [0180] (155) G27C/F42A/Y45A/N71Q/L72G/F78C;
- [0181] (156) G27C/N29S/F42A/N71Q/L72G/F78C;
- [0182] (157) 29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL/Y45A/N71Q;
- [0183] (158) 29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL/N71Q/L72G;
- [0184] (159) 29-44位的NNYKNPKLTRMLTFKF突变为QSMHIDATL/Y45A/N71Q/L72G;
- [0185] (160) N26Q/N30S/Q11C/N71Q/L132C;
- [0186] (161) N26Q/N30S/L70C/N71Q/P82C;

- [0187] (162) N26Q/G27C/N30S/N71Q/F78C;
- [0188] (163) N26Q/N30S/F42A/Y45A/N71Q;
- [0189] (164) N26Q/N30S/F42A/N71Q/L72G;
- [0190] (165) N26Q/N30S/Y45A/N71Q/L72G;
- [0191] (166) N26Q/N30S/F42A/Y45A/N71Q/L72G;
- [0192] (167) N26Q/N29S/N30S/F42A/N71Q/L72G;
- [0193] (168) N26Q/N29S/N30S/N71Q;
- [0194] (169) N26Q/N29S/Q11C/N71Q/L132C;
- [0195] (170) N26Q/N29S/L70C/N71Q/P82C;
- [0196] (171) N26Q/N29S/G27C/N71Q/F78C;
- [0197] (172) N26Q/N29S/F42A/Y45A/N71Q;
- [0198] (173) N26Q/N29S/Y45A/N71Q/L72G;
- [0199] (174) N26Q/N29S/F42A/Y45A/N71Q/L72G;
- [0200] (175) Q11C/N29S/N30S/N71Q/L132C;
- [0201] (176) N29S/N30S/L70C/N71Q/P82C;
- [0202] (177) G27C/N29S/N30S/N71Q/F78C;
- [0203] (178) N29S/N30S/F42A/Y45A/N71Q;
- [0204] (179) N29S/N30S/F42A/N71Q/L72G;
- [0205] (180) N29S/N30S/Y45A/N71Q/L72G;
- [0206] (181) N29S/N30S/F42A/Y45A/N71Q/L72G;
- [0207] (182) Q11C/N29S/F42A/Y45A/N71Q/L132C;
- [0208] (183) Q11C/N29S/F42A/N71Q/L72G/L132C;
- [0209] (184) Q11C/N29S/Y45A/N71Q/L72G/L132C;
- [0210] (185) Q11C/N29S/F42A/Y45A/N71Q/L72G/L132C;
- [0211] (186) N29S/F42A/Y45A/L70C/N71Q/P82C;
- [0212] (187) N29S/F42A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
- [0213] (188) N29S/Y45A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
- [0214] (189) N29S/F42A/Y45A/L70C/N71Q/L72G/P82C;
- [0215] (190) G27C/N29S/F78C/F42A/Y45A/N71Q;
- [0216] (191) G27C/N29S/F78C/F42A/N71Q/L72G;
- [0217] (192) G27C/N29S/F78C/Y45A/N71Q/L72G;
- [0218] (193) G27C/N29S/F78C/F42A/Y45A/N71Q/L72G;
- [0219] (194) N29S/F42A/Y45A/N71Q;
- [0220] (195) N29S/F42A/N71Q/L72G;
- [0221] (196) N29S/Y45A/N71Q/L72G;
- [0222] (197) N29S/F42A/Y45A/N71Q/L72G;
- [0223] (198) Q11C/N29S/N71Q/L132C;
- [0224] (199) N29S/L70C/N71Q/P82C;
- [0225] (200) G27C/N29S/N71Q/F78C;

[0226] (201) N29S/N30S/N71Q;

[0227] (202) N26Q/N29S/N71Q;

[0228] (203) N26Q/N88R;

[0229] (204) N29S/N88R;

[0230] (205) N30S/N88R;

[0231] (206) N26Q/N88R/Q11C/L132C;

[0232] (207) N29S/N88R/L70C/P82C; 和

[0233] (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。

[0234] 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):

[0235] 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
[0236] IL-2-WT	野生型	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNG INNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:2)	SEQ ID NO:1
IL-2-01	N26Q	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL <u>Q</u> G INNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR	SEQ ID NO:3

[0237]

		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 LQCLEEELKPLEEV <u>C</u> NLAQSKNFHLR <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

[0238]

		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	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQG INSYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:22)	SEQ ID NO:21
IL-2-11	Q11C/N26Q/N 30S/F42A/ L72G/L132C	MAPTSSSTKKTCLQLEHLLLDLQMILQG INSYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTCT (SEQ ID NO:24)	SEQ ID NO:23
IL-2-12	N26Q/N30S/ F42A/L70C/ L72G/P82C	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQG INSYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVCNGAQSKNFHLRCR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:26)	SEQ ID NO:25

[0239]

IL-2-13	N26Q/G27C/ N30S/F42A/ L72G/F78C	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)	SEQ ID NO:27
IL-2-14	N29S/F42A /L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNG <u>I</u> SNYKNPKLTRMLT <u>A</u> KFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLN <u>G</u> AQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:30)	SEQ ID NO:29
IL-2-21	N26Q/N29S/F 42A/L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL <u>QG</u> <u>I</u> SNYKNPKLTRMLT <u>A</u> KFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLN <u>G</u> AQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:32)	SEQ ID NO:31
IL-2-22	N26Q/N29S/F 42A/N71Q/L7 2G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL <u>QG</u> <u>I</u> SNYKNPKLTRMLT <u>A</u> KFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVL <u>QG</u> AQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:34)	SEQ ID NO:33
IL-2-23	Q11C/29-44 位 的 NNYKNPKLT RMLTFKF 突 变 为 QSMHIDATL/ L132C	MAPTSSSTKKT <u>C</u> LQLEHLLLDLQMILNG <u>IQSMHIDATL</u> YMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFAQSIIST <u>CT</u> (SEQ ID NO:36)	SEQ ID NO:35
IL-2-24	N26Q/N29S/N 88R	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL <u>QG</u> <u>I</u> SNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELK HLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR RDLIS <u>R</u> INVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	SEQ ID NO:40

[0240]		(SEQ NO ID.41)	
--------	--	----------------	--

[0241] (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。)

[0242] 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,羧乙基化,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。

[0243] 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(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、50KD;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。

[0244] 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、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。

[0245] 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。

[0246] 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。

[0247] 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tetraabody、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。

[0248] 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、am11、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、lmp-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。

[0249] 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。

[0250] 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:

[0251] 1) N26Q,

[0252] 2) N29S,

[0253] 3) N30S,

[0254] 4) N71Q,

[0255] 5) Q11C和L132C,

[0256] 6) L70C和P82C,和

[0257] 7) G27C和F78C。

[0258] 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。

[0259] 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)。

[0260] 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、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。

[0261] 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。

[0262] 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,具体可以为巴斯德毕赤酵母或酿酒酵母。

[0263] 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Y0、NS0、Sp20细胞)、昆虫细胞等)。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)、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。

[0264] 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。

[0265] 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色素瘤)。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(例如肾细胞癌或黑色素瘤)、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,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的疾病是增殖性病征,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)。

[0266] 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(sirolimus); 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)。

[0267] 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。

[0268] 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。

[0269] 在进一步的方面,本公开提供制备IL-2变体或衍生物、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W02012/107417中的IL-2变体的制备方法。

附图说明

[0270] 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。

[0271] 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。

[0272] 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。

[0273] 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。

[0274] 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。

[0275] 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。

[0276] 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。

[0277] 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)。

[0278] 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。

[0279] 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。

[0280] 发明详述

[0281] 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。

[0282] 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。

[0283] 术语

[0284] “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W02012107417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。

[0285] “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。

[0286] “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。

[0287] “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。

[0288] “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。

[0289] “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 Monit 14, RA179-189 (2008))。

[0290] “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 $K_{解离}$ 和 $K_{结合}$)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。

[0291] “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。

[0292] “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。

[0293] “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”。

[0294] “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)),以及传统的结合测定法来测量(Heeley,Endocr Res28,217-229(2002))。

[0295] “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、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。

[0296] “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)。

[0297] “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))。

[0298] “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:HO-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-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。

[0299] “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。

[0300] “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。

[0301] “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。

[0302] “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。

[0303] 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。

[0304] “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

[0305] 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。

[0306] 实施例1:野生型IL-2及其变体的构建和表达

[0307] 1. 基因合成及重组表达载体构建

[0308] 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。

[0309] >野生型IL-2核酸序列

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACACTACAAAAATCCGAAACTGAC
[0310] CCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCA
GTGTCTGGAAGAAGAAGACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAA
AACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTGA
AAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAAT
TTCTGAATCGTTGGATTACCTTTTGCAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATCC
[0311] (SEQ ID NO.1)

[0312] >野生型IL-2氨基酸序列

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ
[0313] CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFCQSIHSTLT (SEQ ID NO.2)

[0314] 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BamHI两个酶切位点,得到野生型IL-2的表达载体。

[0315] 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。

[0316] 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。

[0317] 其中,斜体部分为酶切位点,下划线部分为突变位点,以下同。

[0318] >IL-2-01的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGCAGGGCATCAACAACACTACAAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCA
[0319] GTGTCTGGAAGAAGAAGACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAA
AACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTGA
AAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAAT
TTCTGAATCGTTGGATTACCTTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATC
C (SEQ NO ID.3)

[0320] >IL-2-01的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQC
[0321] LEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT
FAQSIHSTLT (SEQ NO ID.4)

[0322] 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。

[0323] >IL-2-02的核酸序列:

[0324] *CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAGCTACAAAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCA GTGTCTGGAAGAAGAAGACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAA AACTTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTGA AAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTTGTGGAAT TTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATC C* (SEQ NO ID.5)

[0325] > IL-2-02的氨基酸序列:

[0326] *MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINSYKKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQC LEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FAQSIISTLT* (SEQ NO ID.6)

[0327] 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。

[0328] > IL-2-03的核酸序列:

[0329] *CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCTGTCTGCAACTGGAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACA ACTACAAAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCA GTGTCTGGAAGAAGAAGACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAA AACTTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTGA AAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTTGTGGAAT TTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCTGTACCTAATGAGGATC C* (SEQ NO ID.7)

[0330] > IL-2-03的氨基酸序列:

[0331] *MAPTSSSTKKTCLQLEHLLLDLQMLNGINNYKKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA QSIISTCT* (SEQ ID NO:8)

[0332] 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。

[0333] > IL-2-04的核酸序列:

[0334] *CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCTGCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACA ACTACAAAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCA GTGTCTGGAAGAAGAAGACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTTGTAATCTGGCACAGAGCAAAA AACTTTTCATCTGCGTTGTCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGTGA AAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTTGTGGAAT TTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATC C* (SEQ NO ID.9)

[0335] > IL-2-04的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKIFYMPKKATELKHLQCLEE

[0336] ELKPLEEVCNLAQSKNFHLRCRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTLT (SEQ ID NO:10)

[0337] 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。

[0338] > IL-2-05的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
[0339] GCTGTTAGATCTGCAAAATGATTCTGAACTGTATCAACAACACTACAAAAATCCGAAACTGA
CCCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTG
CAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCA
AAAACTGTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAC
[0340] TGAAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTG
GAATTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGA
GGATCC (SEQ NO ID.11)

[0341] > IL-2-05的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNCINNYKNPKLTRMLTFKIFYMPKKATELKHLQCLEE

[0342] ELKPLEEVLNLAQSKNCHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTLT (SEQ ID NO:12)

[0343] 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85-132位处的密码子AACAACTACAAAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTC变为CAGAGCATGCATATTGATGCAACCCTG,获得变体IL-2-06。

[0344] > IL-2-06的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAAATGATTCTGAACGGCATCCAGAGCATGCATATTGATGCAACC
[0345] TGTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTG
AAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAAACCTTTCATCTGCGTCCGCG
TGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAACACTGAAAGGTAGCGAAACCACCTTT
ATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCT
TTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATGAGGATCC (SEQ NO ID.13)

[0346] > IL-2-06的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIQSMHIDATLYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE

[0347] VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
(SEQ ID NO:14)

[0348] 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。

[0349] > IL-2-07的核酸序列:

[0350] *CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACACTACAAAAATCCGAAACTGA
CCCGTATGCTGACCGCAAAATTCGCAATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCT
GCAGTGTCTGGAAGAAGAAGTAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGC
AAAAACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAA
CTGAAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGT
GGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTTGACCTAATG
AGGATCC (SEQ NO ID.15)*

[0351] > IL-2-07的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPKKATELKHLQCLEE

[0352] ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTLT (SEQ ID NO:16)

[0353] 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。

[0354] > IL-2-08的核酸序列:

[0355] *CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACACTACAAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACCGCAAAATTTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGC
AGTGTCTGGAAGAAGAAGTAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATGGCGCACAGAGCAA
AAACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGT
AAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAA
TTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTTGACCTAATGAGGATC
C (SEQ NO ID.17)*

[0356] > IL-2-08的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEE

[0357] ELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTLT (SEQ ID NO:18)

[0358] 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。

[0359] > IL-2-09的核酸序列:

[0360] *CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATCAACAACACTACAAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACCTTCAAATTCGCAATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGC
AGTGTCTGGAAGAAGAAGTAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATGGCGCACAGAGCAA
AAACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAAGT
AAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAA
TTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTTGACCTAATGAGGATC
C (SEQ NO ID.19)*

[0361] > IL-2-09的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFAAMPPKKATELKHLQCLEE

[0362] ELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTLT (SEQ ID NO:20)

[0363] 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。

[0364] > IL-2-10的核酸序列:

[0365] CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGCAGGGGCATCAACAGCTTACAAAAATCCGAAACTGA
CCCGTATGCTGACCGCAAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTG
CAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATGGCGCACAGAGC
[0366] AAAA ACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAA
CTGAAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGT
GGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATG
AGGATCC (SEQ NO ID.21)

[0367] > IL-2-10的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGINSYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEE

[0368] ELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTLT (SEQ ID NO:22)

[0369] 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。

[0370] > IL-2-11的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCTGTCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGCAGGGGCATCAACAGCTTACAAAAATCCGAAACTGA
CCCGTATGCTGACCGCAAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTG
CAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATGGCGCACAGAGC
[0371] AAAA ACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAA
CTGAAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGT
GGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTTGTACCTAATG
AGGATCC (SEQ NO ID.23)

[0372] > IL-2-11的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTCLQLEHLLLDLQMILQGINSYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEE

[0373] ELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTCT (SEQ ID NO:24)

[0374] 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。

[0375] >IL-2-12的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTG**CAGGG**CATCAAC**AGCT**TACAAAAATCCGAAACTGA
CCCGTATGCTGACC**GCA**AAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTG
[0376] CAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTT**TGTAATGGCG**CACAGAGC
AAAAACTTTCATCTGCGT**TGTC**GTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAA
CTGAAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGT
GGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATG
AGGATCC (SEQ NO ID:25)

[0377] >IL-2-12的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILO**Q**GIN**S**YKNPKLTRMLT**A**KFYMPKKATELKHLQCLEE

[0378] ELKPLEEV**C**NGAQSKNFHLR**C**RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTLT (SEQ ID NO:26)

[0379] 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。

[0380] >IL-2-13的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTG**CAGTGT**ATCAAC**AGCT**TACAAAAATCCGAAACTGA
CCCGTATGCTGACC**GCA**AAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTG
[0381] CAGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAAT**GGCG**CACAGAGC
AAAAACT**TGT**CATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAA
CTGAAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGT
GGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCCCTGACCTAATG
AGGATCC (SEQ NO ID:27)

[0382] >IL-2-13的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILO**Q**CIN**S**YKNPKLTRMLT**A**KFYMPKKATELKHLQCLEE

[0383] ELKPLEEVLN**G**AQSKN**C**HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTLT (SEQ ID NO:28)

[0384] 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。

[0385] > IL-2-14的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATC**AGCA**ACTACAAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACC**GCA**AAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGC
AGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAAT**GGCG**CACAGAGCAA
AAACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAACTG
AAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAA
TTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATGAGGATC
C (SEQ NO ID.29)

[0386] > IL-2-14的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGISNYKNPKLTRMLT**A**KFYMPKKATELKHLQCLEE

[0387] ELKPLEEVLN**G**AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTLT (SEQ ID NO:30)

[0388] 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。

[0389] > IL-2-21的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTG**CAG**GGCATC**AGCA**ACTACAAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACC**GCA**AAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGC
AGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAAT**GGCG**CACAGAGCAA
AAACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAACTG
AAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAA
TTTCTGAATCGTTGGATTACCTTT**GCA**CAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATGAGGAT
CC (SEQ NO ID.31)

[0390] > IL-2-21的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQML**Q**GISNYKNPKLTRMLT**A**KFYMPKKATELKHLQCLEE

[0391] ELKPLEEVLN**G**AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTLT (SEQ ID NO:32)

[0392] 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。

[0393] > IL-2-22的核酸序列:

[0396] CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTG**CAGGGGCATCAGCA**ACTACAAAAATCCGAAACTGAC
CCGTATGCTGACCG**CA**AAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGC
AGTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTG**CAGGGC**GCACAGAGCAA
AAACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAACTG
AAAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAA
TTTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATGAGGATC
C (SEQ NO ID.33)

[0397] > IL-2-22的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ**MILQGIS**NYKNPKLTRMLT**A**KFYMPKKATELKHLQCLEE

[0398] ELKPLEEV**LQGA**QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA
QSIISTLT (SEQ ID NO:34)

[0399] 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AACAACTACAAAAATCCGAAACTGACCCGTATGCTGACCTTCAAATTC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。

[0400] > IL-2-23的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACC**TGT**CTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTGAACGGCATC**CAGAGCATGCATATTGATGCAACCC**
TGTTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGTCTGGAAGAAGAACTG
[0401] AAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAAACCTTTCATCTGCGTCCGCG
TGATCTGATTAGCAATATTAACGTTATTGTGCTGGAACTGAAAGGTAGCGAAACCACCTTT
ATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAATTTCTGAATCGTTGGATTACCT
TTGCACAGAGCATTATTAGCACCT**TGT**ACCTAATGAGGATCC (SEQ NO ID.35)

[0402] > IL-2-23的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKT**CL**QLEHLLLDLQ**MILNGIQSMHIDATL**YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE

[0403] VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST**CT**
(SEQ ID NO:36)

[0404] 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。

[0405] > IL-2-24的核酸序列:

CATATGGCACCGACCAGCAGCAGCACCAAAAAAACCAGCTGCAACTGGAACATCT
GCTGTTAGATCTGCAAATGATTCTG**CAGGGGCATCAGCA**ACTACAAAAATCCGAAACTGAC
[0406] CCGTATGCTGACCTTCAAATTCTACATGCCGAAAAAAGCAACCGAGCTGAAACATCTGCA
GTGTCTGGAAGAAGAACTGAAACCGCTGGAAGAGGTTCTGAATCTGGCACAGAGCAAAA
AACTTTCATCTGCGTCCGCGTGATCTGATTAGC**CGT**ATTAACGTTATTGTGCTGGAACTGA
AAGGTAGCGAAACCACCTTTATGTGTGAATATGCCGATGAAACCGCAACCATTGTGGAAT
[0407] TTCTGAATCGTTGGATTACCTTTGCACAGAGCATTATTAGCACCTGACCTAATGAGGATC
C (SEQ NO ID.40)

[0408] >IL-2-24的氨基酸序列:

MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLIQGISNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ

[0409] CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFAQSIISTLT (SEQ NO ID.41)

[0410] 上述变体的基因序列经合成后,连接至pET-9a的Nde I和BamH I两个酶切位点,得到IL-2各变体的重组表达载体。

[0411] 3.野生型IL-2及变体的重组表达与制备

[0412] 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。

[0413] 挑取Kan筛选后的单菌落于10mL LB培养基,37℃,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℃。

[0414] 取冻存的甘油管1支,于37℃水浴中复苏,接种至1L的LB培养基中,37℃,220rpm培养至OD₆₀₀为0.6~1.0,加入1M的IPTG使其终浓度为1mM,37℃,220rpm诱导培养4h。诱导结束后,收集菌体。

[0415] 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。

[0416] 实施例2:PEG化的IL-2及其变体的制备

[0417] 取IL-2蛋白,蛋白浓度为2mg/mL,所处的缓冲体系为10mM乙酸-乙酸钠缓冲液,pH 5.0,向IL-2蛋白溶液中加入20kDa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℃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30mM。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。收集目的组分,置换缓冲液并进行活性、结合能力分析。

[0418] 经检测,获得PEG化的IL-2及其变体。

[0419] 实施例3:IL-2及其变体的稳定性研究

[0420] 1、野生型IL-2及其变体的化学稳定性

[0421] 野生型IL-2样品(缓冲体系为10mM Tris-HCl,50mg/ml甘露醇,0.18mg/ml SDS,pH 8.5),置于40℃、30天进行稳定性研究,取样液质肽图分析降解情况。

[0422] 检测方法:取样品0.5mL加入0.5mL变性溶液(8mol/L盐酸胍,0.2mol/L Tris-HCl,pH 9.0),加入8μl 1mol/L DTT(二硫苏糖醇)混匀,25℃水浴1小时。然后加入35μl 0.5mol/L IAC,25℃水浴1小时。经PD-10柱将样品置换在酶解缓冲液(2mol/L尿素,50mmol/L Tris-HCl,pH 8.3)中。取置换缓冲液后的样品0.5mL加入12.5μg胰蛋白酶,25℃水浴18小时,加盐酸终止反应,进行液质肽图分析。

[0423] 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。

[0424] 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。

[0425] 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/N71 Q/L72G)	9-32	Q11/Q13/Q22/Q26/N30	/
IL-2-24 (N26Q/N29S/N88R)	9-32	Q11/Q13/Q22/Q26/N30	/

[0427] 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。

[0428] 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%

[0430] 2、野生型IL-2及变体的热稳定性

[0431] 用Uncle (Unchained labs) 仪器对1mg/mL IL-2样品(缓冲体系为10mM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℃/分钟的速度从25℃升至95℃,同时以266nm光激发样品中的色氨酸,并观测样品在300-400nm下的发射光(emission)。按照下面的公式计算溶解温度(T_m),其中λ为波长(300-400nm),I(λ)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。

[0432]
$$BCM = \frac{\sum I(\lambda) \times \lambda}{\sum I(\lambda)}$$

$$[0433] \quad T_m = \max \frac{dBCM}{dT}$$

[0434] 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。

[0435] 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。

[0436] 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

[0438] 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

[0439] 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。

[0440] 用2 μ 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°C孵育过夜。洗液洗三遍,每孔250 μ l。每次洗涤震荡10秒以保证充分清洗。加入200 μ l/孔封闭液室温孵育2小时。洗液洗三遍,每孔250 μ l。每次洗涤震荡10秒以保证充分清洗。每孔加100 μ l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 μ l。每孔加入100 μ l用稀释液按0.1 μ 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 μ l。每孔加入100 μ l TMB,避光反应15分钟。加入50 μ l每孔的0.16M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。

[0441] 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。

[0442] > IL-2R α (His标签)

ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWD
 NQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEAT
 [0443] ERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQF
 PGEKPKQASPEGRPESETSCHHHHHH (SEQ ID NO.37)

[0444] 表5.ELISA检测IL-2变体与低亲合力受体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
[0445] 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.
[0446] IL-2-13	N26Q/ N30S/G27C/F78C/F42A/L72G (SEQ NO ID.28)	N.A.

[0447] (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。)

[0448] 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。

[0449] 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 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133.3nM。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 1X 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、PEG-IL-2-23不结合IL-2R α 。

[0450] 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
[0451] 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.

[0452] (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。)

[0453] 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

[0454] 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。

[0455] 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。

[0456] >IL-2R β (Fc hole)

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARCAVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQD GALQDTSCQVH
AWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLLIGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQD
FKPFENLRMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTL
[0457] KQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTGAQDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQ
VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ NO ID. 38)

[0458] >IL-2R γ (Fc knob)

MLKPSLPFTSLLFLQLPLLGVGLNTTILTPNGNEDTTADFFLTMTPTDLSVSTLPLPEVQC
FVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLTLYHYWYKNSDNDKVQKCSHYLFSSEEITSGCQLQKKEIHL
YQTFVVLQDPPREPRQATQMLKLQNLVIPWAPENLTLHKLSESQLELNWNNRFLNHCLEHL
VQYRTDWDHSWTEQSVDYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFPNLCGSAQHWSEWSHPIHW
[0459] GSNTSKENPFLFALEAGAQDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ NO ID. 39)

[0460] 用Biacore仪器 (Biacore T200,GE)的ProteinA传感芯片 (GE,Cat#29127556)捕获IL-2R β / γ -Fc,其中IL-2R β / γ -Fc用1 \times HBS-EP稀释至1 μ g/mL,以10 μ L/min的流速持续30秒。然后,在芯片表面以30 μ L/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10mM 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-2R β / γ 的结合力数值,见表7。

[0461] 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,包括突变之间的组合,均对IL-2与IL-2R β / γ 的结合影响不大。

[0462] 表7. IL-2及其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)
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

[0465] 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)。

[0466] 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

[0468] 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

[0469] 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。

[0470] 完全培养液:RPMI 1640+2mM L-谷氨酰胺+1mM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+2mM L-谷氨酰胺+1mM丙酮酸钠+10%胎牛血清。

[0471] CTLL-2细胞增殖实验:CTLL-2细胞用完全培养液于37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 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 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 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。

[0472] 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:

[0473] 供试品相对生物学活性(%) = 对照品EC $_{50}$ /供试品EC $_{50}$ (EC $_{50}$:半最大效应浓度)。

[0474] 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。

[0475] 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%

[0477] 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.

[0479] (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。)

[0480] 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

[0481] 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。

[0482] 完全培养液:RPMI 1640+2mM L-谷氨酰胺+1mM丙酮酸钠+10%胎牛血清+15ng/mL GM-CSF;基础培养基:RPMI 1640+2mM L-谷氨酰胺+1mM丙酮酸钠+10%胎牛血清。

[0483] 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 μ L细胞。加入10 μ L 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 μ L 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。用实施例6中相同方法计算相对生物学活性。

[0484] 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-2R β / 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。

[0485] 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 %
[0486] 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%

[0487] 实施例8: IL-2及变体对CTLL2细胞STAT5磷酸化活性的测定

[0488] 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。

[0489] 完全培养液:RPMI 1640+2mM L-谷氨酰胺+1mM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+2mM L-谷氨酰胺+1mM丙酮酸钠+10%胎牛血清。

[0490] 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mL 2.0×10^5 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 1.0×10^6 个细胞,按每管500 μ L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1mL PBS,4℃、1400rpm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℃、1400rpm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3mL 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。

[0491] 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 α / β / γ 的结合,而F42A/Y45A,F42A/L72G,Y45A/L72G会降低IL-2与高亲和力受体IL-2R α / β / γ 的结合。

[0492] 表12. IL-2野生型及其变体的CTLL2-细胞STAT5磷酸化活性

[0493]	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%

[0494] 实施例9: IL-2及变体对人外周血(PBMC) STAT5磷酸化活性的测定

[0495] 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。

[0496] 基础培养基: RPMI 1640+10%胎牛血清。

[0497] 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)。

[0498] 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1000nM, 100nM, 10nM, 1nM, 0.1nM, 0.01nM, 取10 μ L加入90 μ L PBMC中, 37 $^{\circ}$ C刺激15分钟。之后立即用预热的BD Cytotfix缓冲液 (BD, Cat No. 554655) 在37 $^{\circ}$ C固定细胞10分钟。350g 4 $^{\circ}$ C离心7分钟。去除上清液, 加入200 μ L在-20 $^{\circ}$ C预冷的BD Phosflow Perm Buffer III (BD, Cat No. 558050) 在冰上破膜30分钟。450g 4 $^{\circ}$ C离心7分钟。去除上清液, 加入200 μ L PBS, pH 7.4洗涤两次。加入100 μ L按1:200稀释的FcR blocker, 在4 $^{\circ}$ C下温育20分钟。450g 4 $^{\circ}$ C离心7分钟。去除上清液, 加入100 μ L抗体混合物, 对细胞在室温下染色40分钟。450g 4 $^{\circ}$ C离心7分钟。去除上清液, 加入200 μ L PBS, pH 7.4洗涤一次, 用200 μ L 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。

[0499] 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。

[0500] 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。

[0501] 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。

[0502] 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 %

[0504] 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.

[0506] (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)

[0507] 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%

[0509] 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

[0510] 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,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℃,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325mm×210mm×180mm,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、体重改变、毛发光泽和其他一些异常情况的监测和记录。

[0511] 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。

[0512] 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 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 μ L混合染色液,4度温育30分钟。用含有1%FBS的PBS洗两次。用True-NuclearTM Transcription Factor Buffer Set (Biolegend 424401) 进行固定破膜60分钟,100 μ L抗小鼠Foxp3抗体 (Biolegend 126405) 室温孵育60分钟。用PBS, pH 7.4洗液洗两次,最后用500 μ L PBS, 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。

[0513] 表16. PEG-IL-2-22治疗的给药方案

[0514]	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)
[0515]	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

[0516] 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。

[0517] 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。

[0518] 表17. PEG-IL-2-24给药和治疗

[0519]	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)
[0519]	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

[0520] (注:i.v.,尾静脉注射;s.c.,皮下注射;i.p.,腹腔注射)

[0521] 结果显示,PEG-IL-2-24给药第三天,在高(5mg/kg)、中(1mg/kg)、低(0.2mg/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。

[0522] 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

[0523] 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 1×10^6 /mL,无菌条件下,移植于BALB/c小鼠皮下,每只小鼠接种 1×10^5 个细胞。当瘤体积达到80-100mm³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。

[0524] 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

[0526] (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))

[0527] 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)= $0.5 \times (\text{肿瘤长径} \times \text{肿瘤短径}^2)$ 计算。相对肿瘤抑制率TGI(%): $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ 。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。

[0528] 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

[0530] 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 $1297.5 \pm 263.52\text{mm}^3$,显著低于对照组同日肿瘤体积($2577.6 \pm 360.91\text{mm}^3$, $TGI=51\%$, $p=0.0168$)。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 $1168.6 \pm 352.3\text{mm}^3$,显著低于对照组同日肿瘤体积($2577.6 \pm 360.91\text{mm}^3$, $TGI=56\%$, $p=0.0190$)。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 ($2577.6 \pm 360.91 \text{mm}^3$, $\text{TGI} = 58\%$, $p = 0.0265$)。

[0531] 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

[0532] NCG小鼠, 雌性, 4-8周, 体重约18-22g, 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。

[0533] 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2h后, PBS洗三次。取正常人外周血, 用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: 0.2ml/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。

[0534] 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
	PBS	6	--	Q3D	i.v.
[0535]	PEG-IL-2-22	6	0.03	Q3D	i.v.
		6	0.1	Q3D	i.v.
		6	0.03	Q3D	s.c.
		6	0.1	Q3D	s.c.

[0536] (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))

[0537] 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。

[0538] 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
	0±0	1558.55±320.54			
[0539]	0±0	175.75±64.16	88.72	11.28	<0.001
	0±0	55.62±15.18	96.43	3.57	<0.001
	0±0	95.08±37.27	93.90	6.10	<0.001
	0±0	232.23±35.68	85.10	14.90	<0.001

[0540] 实验结束时 (给药后第27天), 与PBS组相比, PEG-IL-2-22 (0.03mg/kg, 尾静脉注射) 给药组、PEG-IL-2-22 (0.1mg/kg, 尾静脉注射) 给药组、PEG-IL-2-22 (0.03mg/kg, 皮下注射) 给药组、PEG-IL-2-22 (0.1mg/kg, 皮下注射) 给药组的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。

[0541] 实施例13: IL-2及其变体的免疫原性分析

[0542] 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 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。

[0543] 表22. IL-2变体的T细胞表位

[0544]

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	

[0039] 35 40 45
 [0040] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 [0041] 50 55 60
 [0042] Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 [0043] 65 70 75 80
 [0044] Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 [0045] 85 90 95
 [0046] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 [0047] 100 105 110
 [0048] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser
 [0049] 115 120 125
 [0050] Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 [0051] 130
 [0052] <210> 3
 [0053] <211> 417
 [0054] <212> DNA/RNA
 [0055] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0056] <220>
 [0057] <221> gene
 [0058] <222> (1) .. (417)
 [0059] <223> IL-2-01的核酸序列
 [0060] <400> 3
 [0061] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccaccgc tgcaactgga acatctgctg 60
 [0062] ttagatctgc aatgattct gcagggcatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccctg 120
 [0063] atgctgacct tcaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 [0064] ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatc tggcacagag caaaaacttt 240
 [0065] catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
 [0066] agcgaacca cttttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
 [0067] aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcacc tgacctaatg aggatcc 417
 [0068] <210> 4
 [0069] <211> 134
 [0070] <212> PRT
 [0071] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0072] <220>
 [0073] <221> PEPTIDE
 [0074] <222> (1) .. (134)
 [0075] <223> IL-2-01的氨基酸序列
 [0076] <400> 4
 [0077] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu

[0078]	1	5	10	15
[0079]	His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Gln Gly Ile Asn Asn Tyr			
[0080]		20	25	30
[0081]	Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro			
[0082]		35	40	45
[0083]	Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu			
[0084]		50	55	60
[0085]	Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His			
[0086]		65	70	75
[0087]	Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu			
[0088]		85	90	95
[0089]	Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr			
[0090]		100	105	110
[0091]	Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser			
[0092]		115	120	125
[0093]	Ile Ile Ser Thr Leu Thr			
[0094]		130		
[0095]	<210> 5			
[0096]	<211> 417			
[0097]	<212> DNA/RNA			
[0098]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0099]	<220>			
[0100]	<221> gene			
[0101]	<222> (1) .. (417)			
[0102]	<223> IL-2-02的核酸序列			
[0103]	<400> 5			
[0104]	catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccgcagc tgcaactgga acatctgctg 60			
[0105]	ttagatctgc aatgattct gaacggcatc aacagctaca aaaatccgaa actgaccctg 120			
[0106]	atgctgacct tcaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180			
[0107]	ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatc tggcacagag caaaaacttt 240			
[0108]	catctgctgc cgcgtgatct gattagcaat attaacgta ttgtgctgga actgaaaggt 300			
[0109]	agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360			
[0110]	aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcacc tgacctaatg aggatcc 417			
[0111]	<210> 6			
[0112]	<211> 134			
[0113]	<212> PRT			
[0114]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0115]	<220>			
[0116]	<221> PEPTIDE			

- [0117] <222> (1) .. (134)
- [0118] <223> IL-2-02的氨基酸序列
- [0119] <400> 6
- [0120] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 [0121] 1 5 10 15
 [0122] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Ser Tyr
 [0123] 20 25 30
 [0124] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
 [0125] 35 40 45
 [0126] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 [0127] 50 55 60
 [0128] Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 [0129] 65 70 75 80
 [0130] Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 [0131] 85 90 95
 [0132] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 [0133] 100 105 110
 [0134] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
 [0135] 115 120 125
 [0136] Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 [0137] 130
- [0138] <210> 7
- [0139] <211> 417
- [0140] <212> DNA/RNA
- [0141] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0142] <220>
- [0143] <221> gene
- [0144] <222> (1) .. (417)
- [0145] <223> IL-2-03的核酸序列
- [0146] <400> 7
- [0147] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaacctgtc tgcaactgga acatctgctg 60
 [0148] ttagatctgc aaatgattct gaacggcatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccctg 120
 [0149] atgctgacct tcaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 [0150] ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatc tggcacagag caaaaacttt 240
 [0151] catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
 [0152] agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
 [0153] aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcacct gtacctaatg aggatcc 417
- [0154] <210> 8
- [0155] <211> 134

[0156] <212> PRT
 [0157] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0158] <220>
 [0159] <221> PEPTIDE
 [0160] <222> (1) .. (134)
 [0161] <223> IL-2-03的氨基酸序列
 [0162] <400> 8
 [0163] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Cys Leu Gln Leu Glu
 [0164] 1 5 10 15
 [0165] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
 [0166] 20 25 30
 [0167] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
 [0168] 35 40 45
 [0169] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 [0170] 50 55 60
 [0171] Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 [0172] 65 70 75 80
 [0173] Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 [0174] 85 90 95
 [0175] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 [0176] 100 105 110
 [0177] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
 [0178] 115 120 125
 [0179] Ile Ile Ser Thr Cys Thr
 [0180] 130
 [0181] <210> 9
 [0182] <211> 417
 [0183] <212> DNA/RNA
 [0184] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0185] <220>
 [0186] <221> allele
 [0187] <222> (1) .. (417)
 [0188] <223> IL-2-04的核酸序列
 [0189] <400> 9
 [0190] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccaccagc tgcaactgga acatctgctg 60
 [0191] ttagatctgc aaatgattct gaacggcatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccctg 120
 [0192] atgctgacct tcaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 [0193] ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gtttgtaatc tggcacagag caaaaacttt 240
 [0194] catctgcggtt gtcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300

[0195] agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
 [0196] aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcaccc tgacctaatg aggatcc 417
 [0197] <210> 10
 [0198] <211> 134
 [0199] <212> PRT
 [0200] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0201] <220>
 [0202] <221> PEPTIDE
 [0203] <222> (1) .. (134)
 [0204] <223> IL-2-04的氨基酸序列
 [0205] <400> 10
 [0206] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 [0207] 1 5 10 15
 [0208] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
 [0209] 20 25 30
 [0210] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
 [0211] 35 40 45
 [0212] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 [0213] 50 55 60
 [0214] Lys Pro Leu Glu Glu Val Cys Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 [0215] 65 70 75 80
 [0216] Leu Arg Cys Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 [0217] 85 90 95
 [0218] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 [0219] 100 105 110
 [0220] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
 [0221] 115 120 125
 [0222] Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 [0223] 130
 [0224] <210> 11
 [0225] <211> 417
 [0226] <212> DNA/RNA
 [0227] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0228] <220>
 [0229] <221> gene
 [0230] <222> (1) .. (417)
 [0231] <223> IL-2-05的核酸序列
 [0232] <400> 11
 [0233] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccgcag tgcaactgga acatctgctg 60

[0234] ttagatctgc aaatgattct gaactgtatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccggt 120
 [0235] atgctgacct tcaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 [0236] ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatc tggcacagag caaaaactgt 240
 [0237] catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
 [0238] agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
 [0239] aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcaccg tgacctaatg aggatcc 417
 [0240] <210> 12
 [0241] <211> 134
 [0242] <212> PRT
 [0243] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0244] <220>
 [0245] <221> PEPTIDE
 [0246] <222> (1) .. (134)
 [0247] <223> IL-2-05的氨基酸序列
 [0248] <400> 12
 [0249] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 [0250] 1 5 10 15
 [0251] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Cys Ile Asn Asn Tyr
 [0252] 20 25 30
 [0253] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
 [0254] 35 40 45
 [0255] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 [0256] 50 55 60
 [0257] Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Cys His
 [0258] 65 70 75 80
 [0259] Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 [0260] 85 90 95
 [0261] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 [0262] 100 105 110
 [0263] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
 [0264] 115 120 125
 [0265] Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 [0266] 130
 [0267] <210> 13
 [0268] <211> 396
 [0269] <212> DNA/RNA
 [0270] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0271] <220>
 [0272] <221> gene

- [0273] <222> (1) .. (396)
- [0274] <223> IL-2-06的核酸序列
- [0275] <400> 13
- [0276] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccgcagc tgcaactgga acatctgctg 60
- [0277] ttagatctgc aatgattct gaacggcatc cagagcatgc atattgatgc aaccctgtac 120
- [0278] atgccgaaaa aagcaaccga gctgaaacat ctgcagtgtc tggaagaaga actgaaaccg 180
- [0279] ctggaagagg ttctgaatct ggcacagagc aaaaactttc atctgcgtcc gcgtgatctg 240
- [0280] attagcaata ttaacgttat tgtgctggaa ctgaaaggta gcgaaaccac ctttatgtgt 300
- [0281] gaatatgccg atgaaaccgc aaccattgtg gaatttctga atcgttggat tacctttgca 360
- [0282] cagagcatta ttagcaccct gacctaata gaatcc 396
- [0283] <210> 14
- [0284] <211> 127
- [0285] <212> PRT
- [0286] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0287] <220>
- [0288] <221> PEPTIDE
- [0289] <222> (1) .. (124)
- [0290] <223> IL-2-06的氨基酸序列
- [0291] <400> 14
- [0292] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
- [0293] 1 5 10 15
- [0294] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Gln Ser Met
- [0295] 20 25 30
- [0296] His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
- [0297] 35 40 45
- [0298] His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
- [0299] 50 55 60
- [0300] Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile
- [0301] 65 70 75 80
- [0302] Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr
- [0303] 85 90 95
- [0304] Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu
- [0305] 100 105 110
- [0306] Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
- [0307] 115 120 125
- [0308] <210> 15
- [0309] <211> 417
- [0310] <212> DNA/RNA
- [0311] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0312] <220>
 [0313] <221> gene
 [0314] <222> (1) .. (417)
 [0315] <223> IL-2-07的核酸序列
 [0316] <400> 15
 [0317] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccgcagc tgcaactgga acatctgctg 60
 [0318] ttagatctgc aatgattct gaacggcatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccctg 120
 [0319] atgctgaccg caaaattcgc aatgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 [0320] ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatc tggcacagag caaaaacttt 240
 [0321] catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
 [0322] agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
 [0323] aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcaccg tgacctaatg aggatcc 417
 [0324] <210> 16
 [0325] <211> 134
 [0326] <212> PRT
 [0327] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0328] <220>
 [0329] <221> PEPTIDE
 [0330] <222> (1) .. (134)
 [0331] <223> IL-2-07的氨基酸序列
 [0332] <400> 16
 [0333] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 [0334] 1 5 10 15
 [0335] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
 [0336] 20 25 30
 [0337] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro
 [0338] 35 40 45
 [0339] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 [0340] 50 55 60
 [0341] Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 [0342] 65 70 75 80
 [0343] Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 [0344] 85 90 95
 [0345] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 [0346] 100 105 110
 [0347] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
 [0348] 115 120 125
 [0349] Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 [0350] 130

[0351] <210> 17
 [0352] <211> 417
 [0353] <212> DNA/RNA
 [0354] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0355] <220>
 [0356] <221> gene
 [0357] <222> (1) .. (417)
 [0358] <223> IL-2-08的核酸序列
 [0359] <400> 17
 [0360] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccaccagc tgcaactgga acatctgctg 60
 [0361] ttagatctgc aaatgattct gaacggcatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccctg 120
 [0362] atgctgaccg caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 [0363] ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatg gcgcacagag caaaaacttt 240
 [0364] catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
 [0365] agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
 [0366] aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcacc c tgacctaatg aggatcc 417
 [0367] <210> 18
 [0368] <211> 134
 [0369] <212> PRT
 [0370] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0371] <220>
 [0372] <221> PEPTIDE
 [0373] <222> (1) .. (134)
 [0374] <223> IL-2-08的氨基酸序列
 [0375] <400> 18
 [0376] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 [0377] 1 5 10 15
 [0378] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
 [0379] 20 25 30
 [0380] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro
 [0381] 35 40 45
 [0382] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 [0383] 50 55 60
 [0384] Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 [0385] 65 70 75 80
 [0386] Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 [0387] 85 90 95
 [0388] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 [0389] 100 105 110

[0390] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
 [0391] 115 120 125
 [0392] Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 [0393] 130
 [0394] <210> 19
 [0395] <211> 417
 [0396] <212> DNA/RNA
 [0397] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0398] <220>
 [0399] <221> gene
 [0400] <222> (1) .. (417)
 [0401] <223> IL-2-09的核酸序列
 [0402] <400> 19
 [0403] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccaccagc tgcaactgga acatctgctg 60
 [0404] ttagatctgc aatgattct gaacggcatc aacaactaca aaaatccgaa actgaccctg 120
 [0405] atgctgacct tcaaattcgc aatgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 [0406] ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatg gcgcacagag caaaaacttt 240
 [0407] catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
 [0408] agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
 [0409] aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcaccc tgacctaatg aggatcc 417
 [0410] <210> 20
 [0411] <211> 134
 [0412] <212> PRT
 [0413] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0414] <220>
 [0415] <221> PEPTIDE
 [0416] <222> (1) .. (134)
 [0417] <223> IL-2-09的氨基酸序列
 [0418] <400> 20
 [0419] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 [0420] 1 5 10 15
 [0421] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
 [0422] 20 25 30
 [0423] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Ala Met Pro
 [0424] 35 40 45
 [0425] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 [0426] 50 55 60
 [0427] Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 [0428] 65 70 75 80

[0429] Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 [0430] 85 90 95
 [0431] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 [0432] 100 105 110
 [0433] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
 [0434] 115 120 125
 [0435] Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 [0436] 130
 [0437] <210> 21
 [0438] <211> 417
 [0439] <212> DNA/RNA
 [0440] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0441] <220>
 [0442] <221> gene
 [0443] <222> (1) .. (417)
 [0444] <223> IL-2-10的核酸序列
 [0445] <400> 21
 [0446] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccacgc tgcaactgga acatctgctg 60
 [0447] ttagatctgc aaatgattct gcaggcatc aacagctaca aaaatccgaa actgaccctg 120
 [0448] atgctgaccg caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 [0449] ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatg gcgcacagag caaaaacttt 240
 [0450] catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
 [0451] agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
 [0452] aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcacc tgacctaatg aggatcc 417
 [0453] <210> 22
 [0454] <211> 134
 [0455] <212> PRT
 [0456] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0457] <220>
 [0458] <221> PEPTIDE
 [0459] <222> (1) .. (134)
 [0460] <223> IL-2-10的氨基酸序列
 [0461] <400> 22
 [0462] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 [0463] 1 5 10 15
 [0464] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Gln Gly Ile Asn Ser Tyr
 [0465] 20 25 30
 [0466] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro
 [0467] 35 40 45

[0468]	Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
[0469]	50 55 60
[0470]	Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
[0471]	65 70 75 80
[0472]	Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
[0473]	85 90 95
[0474]	Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
[0475]	100 105 110
[0476]	Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
[0477]	115 120 125
[0478]	Ile Ile Ser Thr Leu Thr
[0479]	130
[0480]	<210> 23
[0481]	<211> 417
[0482]	<212> DNA/RNA
[0483]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0484]	<220>
[0485]	<221> gene
[0486]	<222> (1) .. (417)
[0487]	<223> IL-2-11的核酸序列
[0488]	<400> 23
[0489]	catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaacctgtc tgcaactgga acatctgctg 60
[0490]	ttagatctgc aaatgattct gcagggcatc aacagctaca aaaatccgaa actgaccctg 120
[0491]	atgctgaccg caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
[0492]	ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatg gcgcacagag caaaaacttt 240
[0493]	catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
[0494]	agcgaaacca cttttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
[0495]	aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcacct gtacctaatg aggatcc 417
[0496]	<210> 24
[0497]	<211> 134
[0498]	<212> PRT
[0499]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0500]	<220>
[0501]	<221> PEPTIDE
[0502]	<222> (1) .. (134)
[0503]	<223> IL-2-11的氨基酸序列
[0504]	<400> 24
[0505]	Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Cys Leu Gln Leu Glu
[0506]	1 5 10 15

[0507] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Gln Gly Ile Asn Ser Tyr
 [0508] 20 25 30
 [0509] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro
 [0510] 35 40 45
 [0511] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 [0512] 50 55 60
 [0513] Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 [0514] 65 70 75 80
 [0515] Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 [0516] 85 90 95
 [0517] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 [0518] 100 105 110
 [0519] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
 [0520] 115 120 125
 [0521] Ile Ile Ser Thr Cys Thr
 [0522] 130
 [0523] <210> 25
 [0524] <211> 417
 [0525] <212> DNA/RNA
 [0526] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0527] <220>
 [0528] <221> gene
 [0529] <222> (1) .. (417)
 [0530] <223> IL-2-12的核酸序列
 [0531] <400> 25
 [0532] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccagc tgcaactgga acatctgctg 60
 [0533] ttagatctgc aatgattct gcaggcatc aacagctaca aaaatccgaa actgaccgct 120
 [0534] atgctgaccg caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 [0535] ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gtttgtaatg gcgcacagag caaaaacttt 240
 [0536] catctgcggtt gtcgtgatct gattagcaat attaacgta ttgtgctgga actgaaaggt 300
 [0537] agcgaaacca cttttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
 [0538] aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcacc tgacctaatg aggatcc 417
 [0539] <210> 26
 [0540] <211> 134
 [0541] <212> PRT
 [0542] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0543] <220>
 [0544] <221> PEPTIDE
 [0545] <222> (1) .. (134)

- [0546] <223> IL-2-12的氨基酸序列
- [0547] <400> 26
- [0548] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 [0549] 1 5 10 15
 [0550] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Gln Gly Ile Asn Ser Tyr
 [0551] 20 25 30
 [0552] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro
 [0553] 35 40 45
 [0554] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 [0555] 50 55 60
 [0556] Lys Pro Leu Glu Glu Val Cys Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 [0557] 65 70 75 80
 [0558] Leu Arg Cys Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 [0559] 85 90 95
 [0560] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 [0561] 100 105 110
 [0562] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
 [0563] 115 120 125
 [0564] Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 [0565] 130
- [0566] <210> 27
- [0567] <211> 417
- [0568] <212> DNA/RNA
- [0569] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0570] <220>
- [0571] <221> gene
- [0572] <222> (1) .. (417)
- [0573] <223> IL-2-13的核酸序列
- [0574] <400> 27
- [0575] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccagc tgcaactgga acatctgctg 60
 [0576] ttagatctgc aatgattct gcagtgtatc aacagctaca aaaatccgaa actgaccgct 120
 [0577] atgctgaccg caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 [0578] ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatg gcgcacagag caaaaactgt 240
 [0579] catctgcgctc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
 [0580] agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
 [0581] aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcacc tgacctaatg aggatcc 417
- [0582] <210> 28
- [0583] <211> 134
- [0584] <212> PRT

[0585] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0586] <220>
 [0587] <221> PEPTIDE
 [0588] <222> (1) .. (134)
 [0589] <223> IL-2-13的氨基酸序列
 [0590] <400> 28
 [0591] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 [0592] 1 5 10 15
 [0593] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Gln Cys Ile Asn Ser Tyr
 [0594] 20 25 30
 [0595] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro
 [0596] 35 40 45
 [0597] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 [0598] 50 55 60
 [0599] Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Cys His
 [0600] 65 70 75 80
 [0601] Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 [0602] 85 90 95
 [0603] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 [0604] 100 105 110
 [0605] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
 [0606] 115 120 125
 [0607] Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 [0608] 130
 [0609] <210> 29
 [0610] <211> 417
 [0611] <212> DNA/RNA
 [0612] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0613] <220>
 [0614] <221> gene
 [0615] <222> (1) .. (417)
 [0616] <223> IL-2-14的核酸序列
 [0617] <400> 29
 [0618] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccagc tgcaactgga acatctgctg 60
 [0619] ttagatctgc aatgattct gaacggcatc agcaactaca aaaatccgaa actgaccctg 120
 [0620] atgctgaccg caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 [0621] ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatg gcgcacagag caaaaacttt 240
 [0622] catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
 [0623] agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360

[0624] aatcgttggg ttacctttgc acagagcatt attagcaccc tgacctaatg aggatcc 417
 [0625] <210> 30
 [0626] <211> 134
 [0627] <212> PRT
 [0628] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0629] <220>
 [0630] <221> PEPTIDE
 [0631] <222> (1) .. (134)
 [0632] <223> IL-2-14的氨基酸序列
 [0633] <400> 30
 [0634] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 [0635] 1 5 10 15
 [0636] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Ser Asn Tyr
 [0637] 20 25 30
 [0638] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro
 [0639] 35 40 45
 [0640] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 [0641] 50 55 60
 [0642] Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 [0643] 65 70 75 80
 [0644] Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 [0645] 85 90 95
 [0646] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 [0647] 100 105 110
 [0648] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
 [0649] 115 120 125
 [0650] Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 [0651] 130
 [0652] <210> 31
 [0653] <211> 417
 [0654] <212> DNA/RNA
 [0655] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0656] <220>
 [0657] <221> gene
 [0658] <222> (1) .. (417)
 [0659] <223> IL-2-21的核酸序列
 [0660] <400> 31
 [0661] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccaccgc tgcaactgga acatctgctg 60
 [0662] ttagatctgc aatgattct gcaggcatc agcaactaca aaaatccgaa actgaccctg 120

[0663] atgctgaccg caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
 [0664] ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatg gcgcacagag caaaaacttt 240
 [0665] catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
 [0666] agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
 [0667] aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcaccc tgacctaatg aggatcc 417
 [0668] <210> 32
 [0669] <211> 134
 [0670] <212> PRT
 [0671] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0672] <220>
 [0673] <221> PEPTIDE
 [0674] <222> (1) .. (134)
 [0675] <223> IL-2-21的氨基酸序列
 [0676] <400> 32
 [0677] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 [0678] 1 5 10 15
 [0679] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 [0680] 20 25 30
 [0681] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro
 [0682] 35 40 45
 [0683] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 [0684] 50 55 60
 [0685] Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 [0686] 65 70 75 80
 [0687] Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 [0688] 85 90 95
 [0689] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 [0690] 100 105 110
 [0691] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
 [0692] 115 120 125
 [0693] Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 [0694] 130
 [0695] <210> 33
 [0696] <211> 417
 [0697] <212> DNA/RNA
 [0698] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0699] <220>
 [0700] <221> gene
 [0701] <222> (1) .. (417)

- [0702] <223> IL-2-22的核酸序列
- [0703] <400> 33
- [0704] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaacccagc tgcaactgga acatctgctg 60
- [0705] ttagatctgc aatgattct gcaggcatc agcaactaca aaaatccgaa actgacccgt 120
- [0706] atgctgaccg caaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
- [0707] ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgcagg gcgcacagag caaaaacttt 240
- [0708] catctgcgtc cgcgtgatct gattagcaat attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
- [0709] agcgaaacca cttttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
- [0710] aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcaccc tgacctaatg aggatcc 417
- [0711] <210> 34
- [0712] <211> 134
- [0713] <212> PRT
- [0714] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0715] <220>
- [0716] <221> PEPTIDE
- [0717] <222> (1) .. (134)
- [0718] <223> IL-2-22的氨基酸序列
- [0719] <400> 34
- [0720] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
- [0721] 1 5 10 15
- [0722] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
- [0723] 20 25 30
- [0724] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro
- [0725] 35 40 45
- [0726] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
- [0727] 50 55 60
- [0728] Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Gln Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
- [0729] 65 70 75 80
- [0730] Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
- [0731] 85 90 95
- [0732] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
- [0733] 100 105 110
- [0734] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
- [0735] 115 120 125
- [0736] Ile Ile Ser Thr Leu Thr
- [0737] 130
- [0738] <210> 35
- [0739] <211> 396
- [0740] <212> DNA/RNA

[0741] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0742] <220>
 [0743] <221> allele
 [0744] <222> (1) .. (396)
 [0745] <223> IL-2-23的核酸序列
 [0746] <400> 35
 [0747] catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaacctgtc tgcaactgga acatctgctg 60
 [0748] ttagatctgc aatgattct gaacggcatc cagagcatgc atattgatgc aaccctgtac 120
 [0749] atgccgaaaa aagcaaccga gctgaaacat ctgcagtgtc tggaagaaga actgaaaccg 180
 [0750] ctggaagagg ttctgaatct ggcacagagc aaaaactttc atctgcgtcc gcgtgatctg 240
 [0751] attagcaata ttaacgttat tgtgctggaa ctgaaaggta gcgaaaccac ctttatgtgt 300
 [0752] gaatatgccg atgaaaccgc aaccattgtg gaatttctga atcgttggat tacctttgca 360
 [0753] cagagcatta ttagcacctg tacctaata g gatcc 396
 [0754] <210> 36
 [0755] <211> 127
 [0756] <212> PRT
 [0757] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0758] <220>
 [0759] <221> PEPTIDE
 [0760] <222> (1) .. (127)
 [0761] <223> IL-2-23的氨基酸序列
 [0762] <400> 36
 [0763] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Cys Leu Gln Leu Glu
 [0764] 1 5 10 15
 [0765] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Gln Ser Met
 [0766] 20 25 30
 [0767] His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
 [0768] 35 40 45
 [0769] His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
 [0770] 50 55 60
 [0771] Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile
 [0772] 65 70 75 80
 [0773] Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr
 [0774] 85 90 95
 [0775] Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu
 [0776] 100 105 110
 [0777] Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Cys Thr
 [0778] 115 120 125
 [0779] <210> 37

[0780] <211> 198
 [0781] <212> PRT
 [0782] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0783] <220>
 [0784] <221> DOMAIN
 [0785] <222> (1) .. (198)
 [0786] <223> IL-2R α (His标签)
 [0787] <400> 37
 [0788] Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys
 [0789] 1 5 10 15
 [0790] Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg
 [0791] 20 25 30
 [0792] Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly
 [0793] 35 40 45
 [0794] Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser
 [0795] 50 55 60
 [0796] Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln
 [0797] 65 70 75 80
 [0798] Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp
 [0799] 85 90 95
 [0800] Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn
 [0801] 100 105 110
 [0802] Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr
 [0803] 115 120 125
 [0804] Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu
 [0805] 130 135 140
 [0806] Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln
 [0807] 145 150 155 160
 [0808] Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln Phe Pro Gly Glu Glu
 [0809] 165 170 175
 [0810] Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu Ser Glu Thr Ser Cys
 [0811] 180 185 190
 [0812] His His His His His His
 [0813] 195
 [0814] <210> 38
 [0815] <211> 466
 [0816] <212> PRT
 [0817] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0818] <220>

[0819] <221> DOMAIN
 [0820] <222> (1) .. (466)
 [0821] <223> IL-2R β (Fc hole)
 [0822] <400> 38
 [0823] Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 [0824] 1 5 10 15
 [0825] Phe Pro Gly Ala Arg Cys Ala Val Asn Gly Thr Ser Gln Phe Thr Cys
 [0826] 20 25 30
 [0827] Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly
 [0828] 35 40 45
 [0829] Ala Leu Gln Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg
 [0830] 50 55 60
 [0831] Arg Trp Asn Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp
 [0832] 65 70 75 80
 [0833] Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ala Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Thr
 [0834] 85 90 95
 [0835] Val Asp Ile Val Thr Leu Arg Val Leu Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp
 [0836] 100 105 110
 [0837] Arg Val Met Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu
 [0838] 115 120 125
 [0839] Met Ala Pro Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys
 [0840] 130 135 140
 [0841] Asn Ile Ser Trp Glu Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His
 [0842] 145 150 155 160
 [0843] Leu Glu Phe Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu
 [0844] 165 170 175
 [0845] Ala Pro Leu Leu Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu
 [0846] 180 185 190
 [0847] Thr Leu Thr Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro
 [0848] 195 200 205
 [0849] Leu Gln Gly Glu Phe Thr Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala
 [0850] 210 215 220
 [0851] Phe Arg Thr Lys Pro Ala Ala Leu Gly Lys Asp Thr Gly Ala Gln Asp
 [0852] 225 230 235 240
 [0853] Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 [0854] 245 250 255
 [0855] Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 [0856] 260 265 270
 [0857] Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

[0858]	275	280	285
[0859]	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
[0860]	290	295	300
[0861]	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
[0862]	305	310	315
[0863]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
[0864]	325	330	335
[0865]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
[0866]	340	345	350
[0867]	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys		
[0868]	355	360	365
[0869]	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
[0870]	370	375	380
[0871]	Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
[0872]	385	390	395
[0873]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
[0874]	405	410	415
[0875]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp		
[0876]	420	425	430
[0877]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
[0878]	435	440	445
[0879]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
[0880]	450	455	460
[0881]	Gly Lys		
[0882]	465		
[0883]	<210> 39		
[0884]	<211> 492		
[0885]	<212> PRT		
[0886]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0887]	<220>		
[0888]	<221> DOMAIN		
[0889]	<222> (1) .. (492)		
[0890]	<223> IL-2R γ (Fc knob)		
[0891]	<400> 39		
[0892]	Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu		
[0893]	1	5	10
[0894]	Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly		
[0895]	20	25	30
[0896]	Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp		

[0897]	35	40	45
[0898]	Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val		
[0899]	50	55	60
[0900]	Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro		
[0901]	65	70	75
[0902]	Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn		
[0903]	85	90	95
[0904]	Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr		
[0905]	100	105	110
[0906]	Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe		
[0907]	115	120	125
[0908]	Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln		
[0909]	130	135	140
[0910]	Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu		
[0911]	145	150	155
[0912]	Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn		
[0913]	165	170	175
[0914]	Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp		
[0915]	180	185	190
[0916]	Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe		
[0917]	195	200	205
[0918]	Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg		
[0919]	210	215	220
[0920]	Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp		
[0921]	225	230	235
[0922]	Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe		
[0923]	245	250	255
[0924]	Leu Phe Ala Leu Glu Ala Gly Ala Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
[0925]	260	265	270
[0926]	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
[0927]	275	280	285
[0928]	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
[0929]	290	295	300
[0930]	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe		
[0931]	305	310	315
[0932]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
[0933]	325	330	335
[0934]	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
[0935]	340	345	350

[0936]	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
[0937]	355 360 365
[0938]	Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
[0939]	370 375 380
[0940]	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
[0941]	385 390 395 400
[0942]	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
[0943]	405 410 415
[0944]	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
[0945]	420 425 430
[0946]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
[0947]	435 440 445
[0948]	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
[0949]	450 455 460
[0950]	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
[0951]	465 470 475 480
[0952]	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0953]	485 490
[0954]	<210> 40
[0955]	<211> 417
[0956]	<212> DNA/RNA
[0957]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0958]	<220>
[0959]	<221> gene
[0960]	<222> (1) .. (417)
[0961]	<223> IL-2-24的核酸序列
[0962]	<400> 40
[0963]	catatggcac cgaccagcag cagcaccaaa aaaaccagc tgcaactgga acatctgctg 60
[0964]	ttagatctgc aatgattct gcagggcatc agcaactaca aaaatccgaa actgacccgt 120
[0965]	atgctgacct tcaaattcta catgccgaaa aaagcaaccg agctgaaaca tctgcagtgt 180
[0966]	ctggaagaag aactgaaacc gctggaagag gttctgaatc tggcacagag caaaaacttt 240
[0967]	catctgcgtc cgcgtgatct gattagccgt attaacgtta ttgtgctgga actgaaaggt 300
[0968]	agcgaaacca cctttatgtg tgaatatgcc gatgaaaccg caaccattgt ggaatttctg 360
[0969]	aatcgttgga ttacctttgc acagagcatt attagcacc tgacctaatg aggatcc 417
[0970]	<210> 41
[0971]	<211> 134
[0972]	<212> PRT
[0973]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0974]	<220>

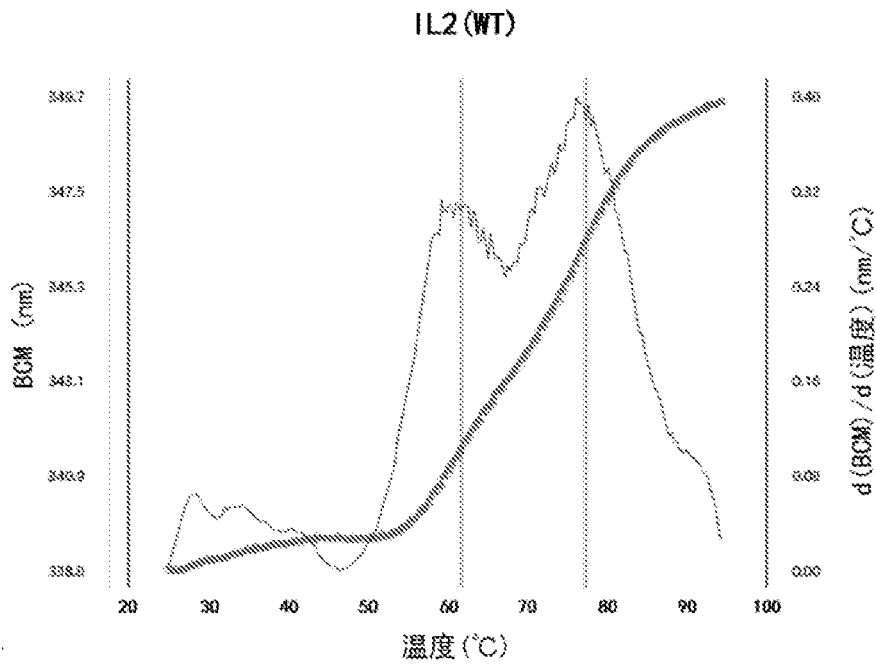


图1A

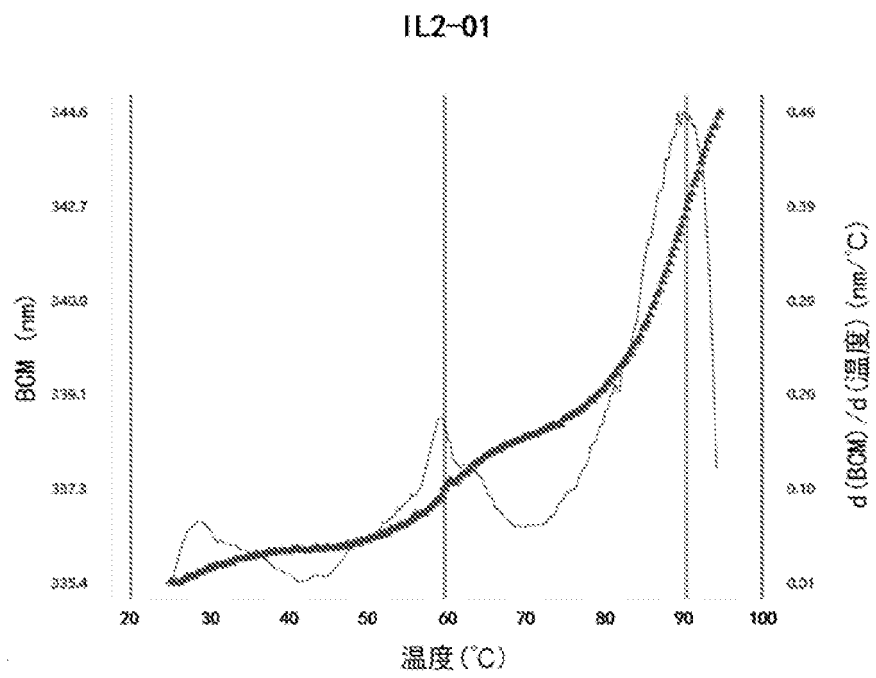


图1B

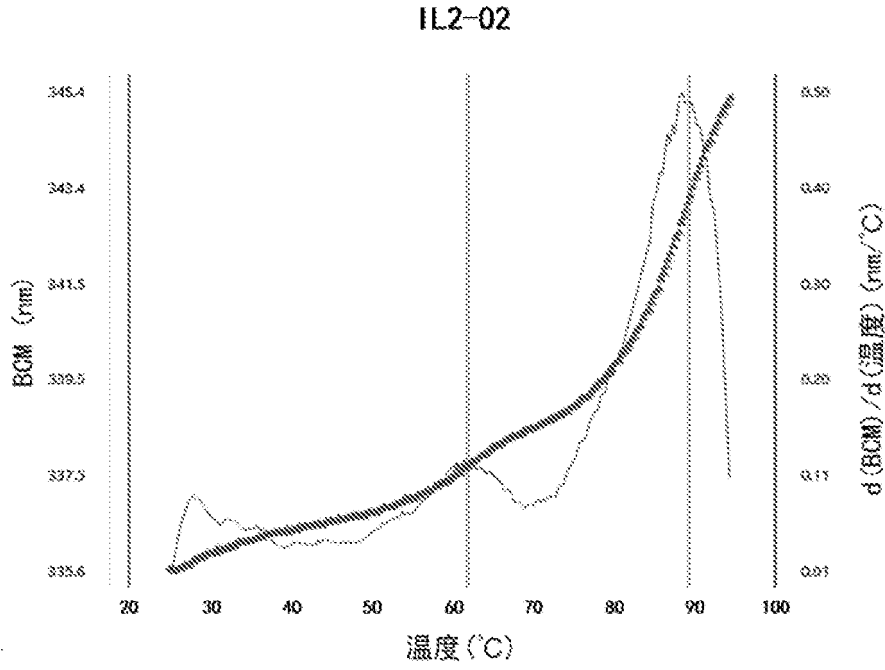


图1C

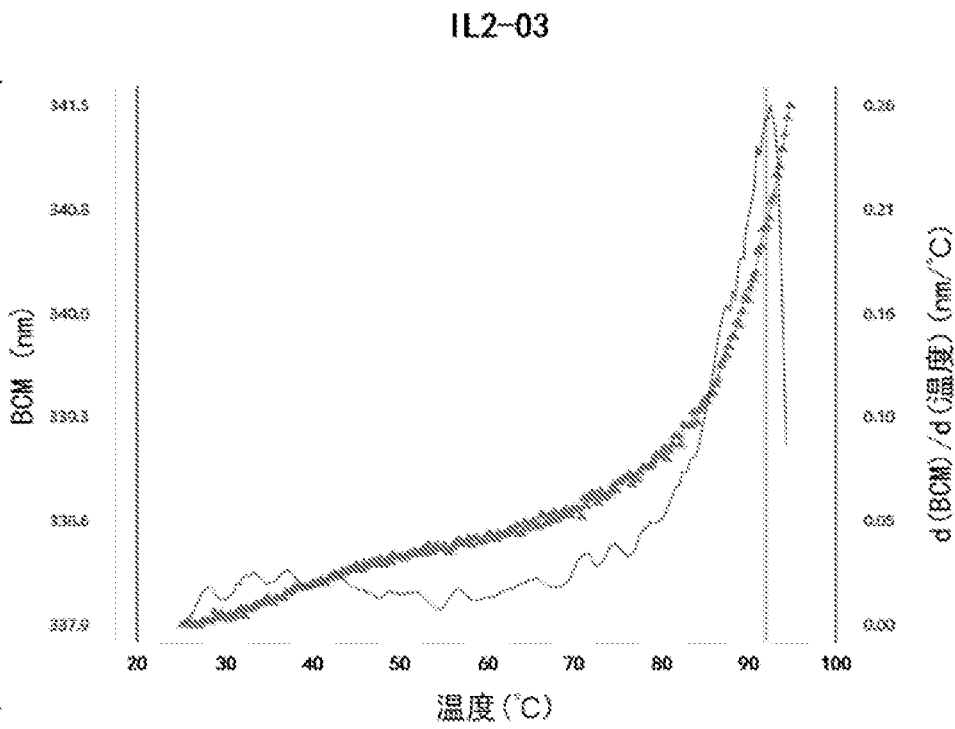


图1D

IL2-04

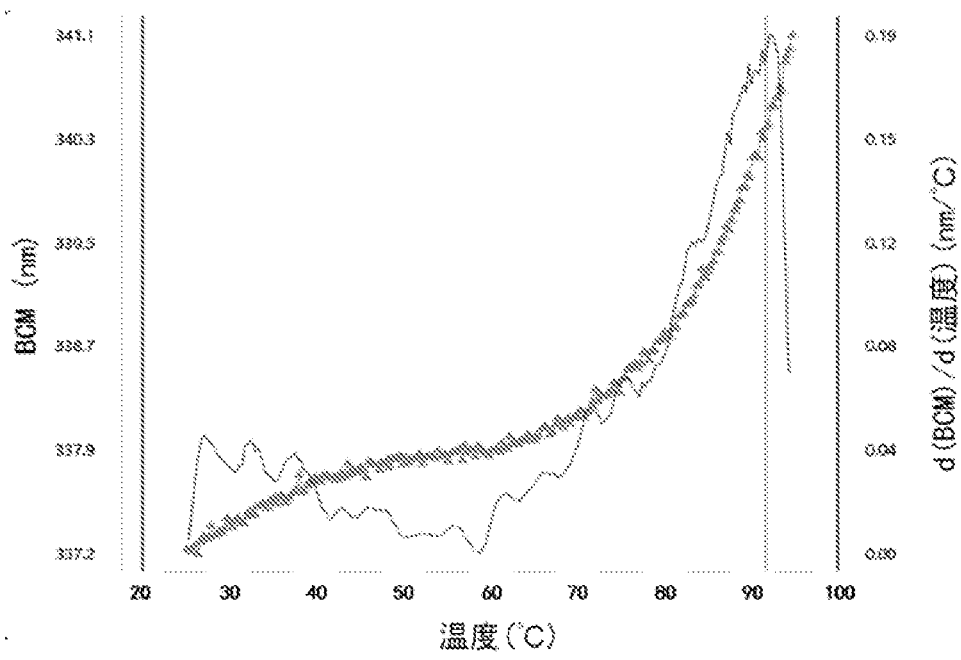


图1E

IL2-05

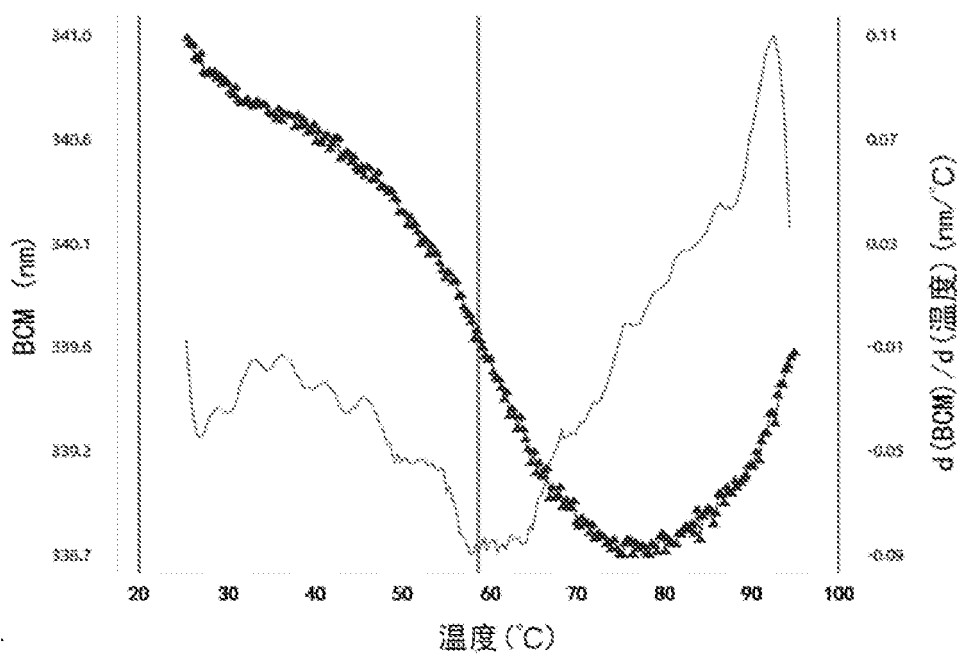


图1F

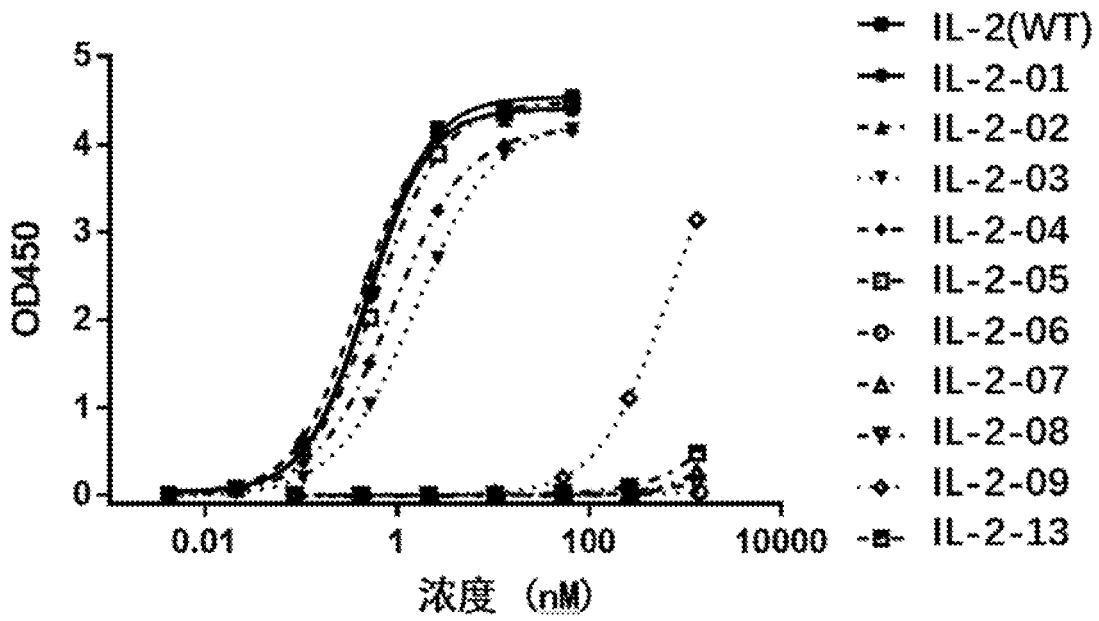


图2

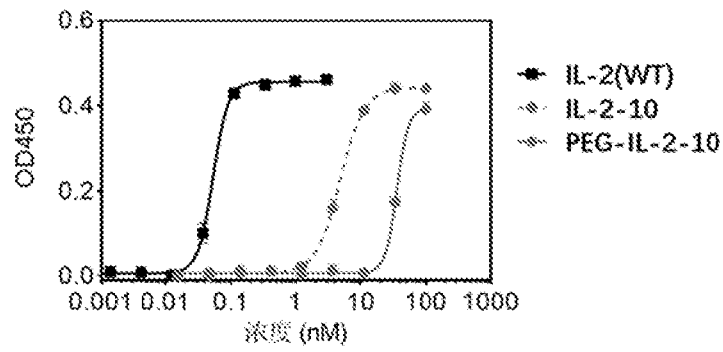


图3A

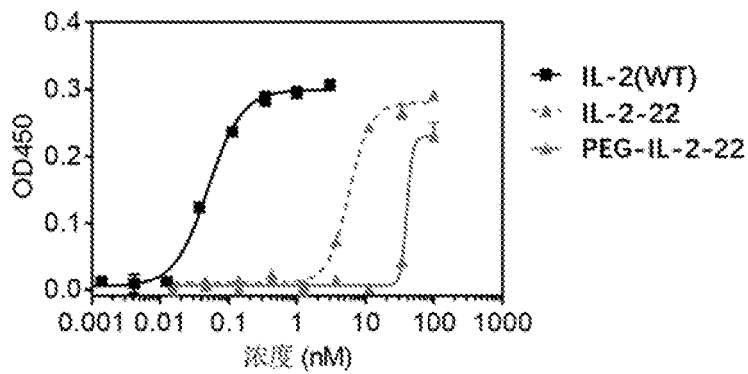


图3B

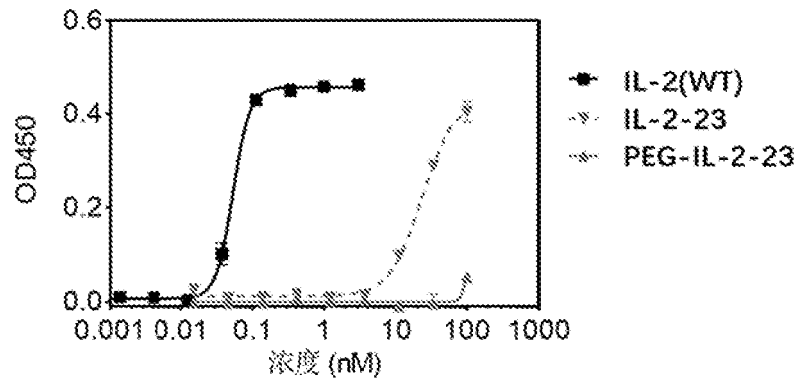


图3C

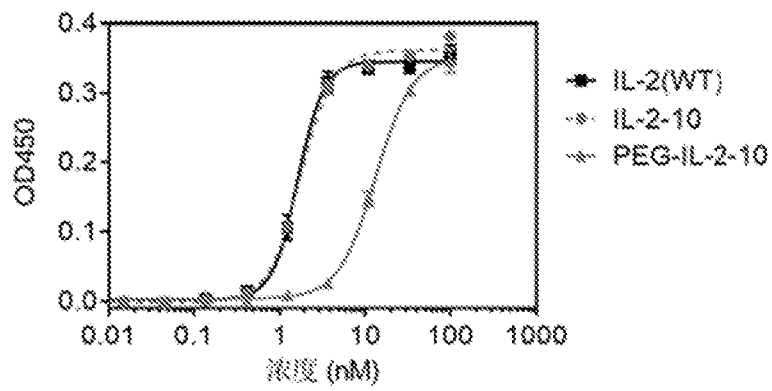


图4A

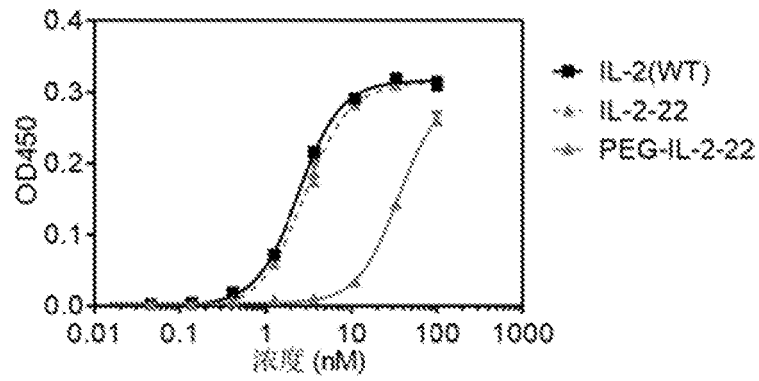


图4B

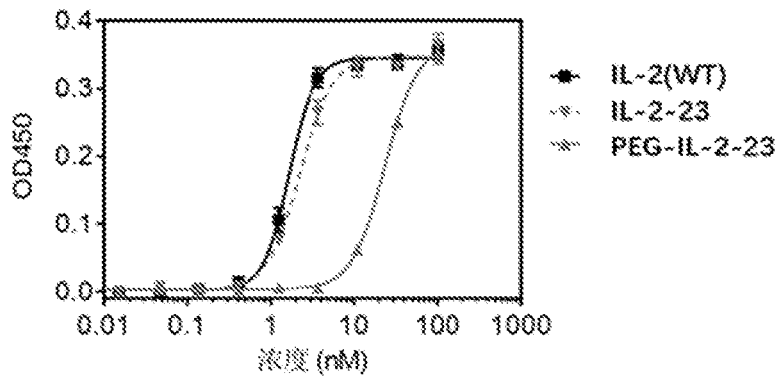


图4C

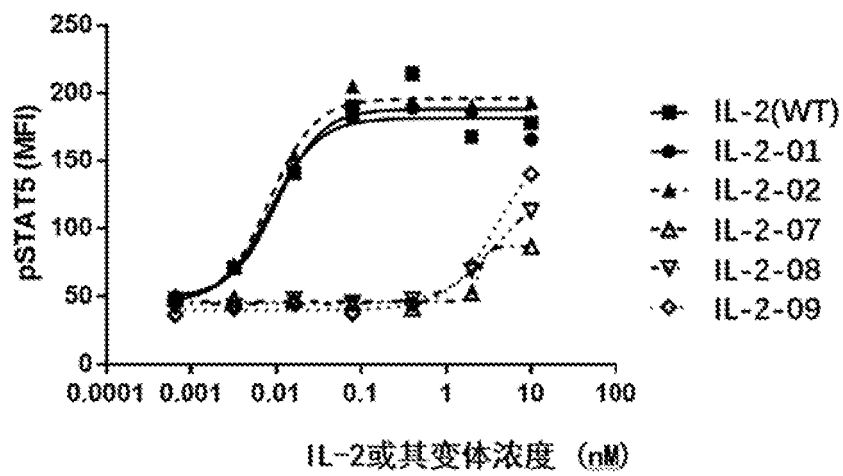


图5

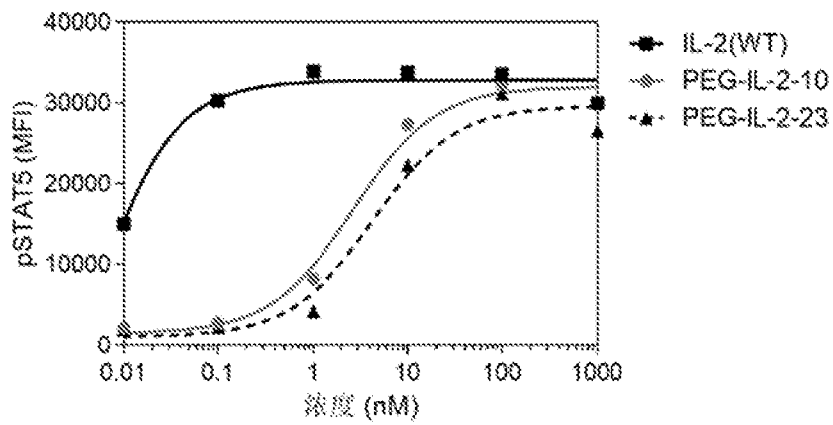


图6A

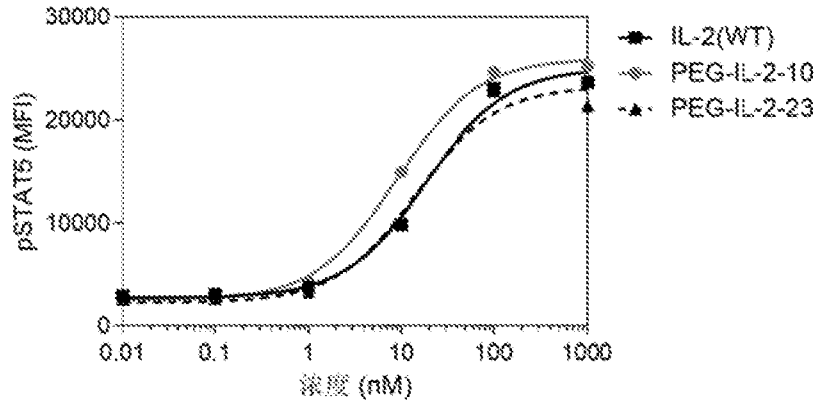


图6B

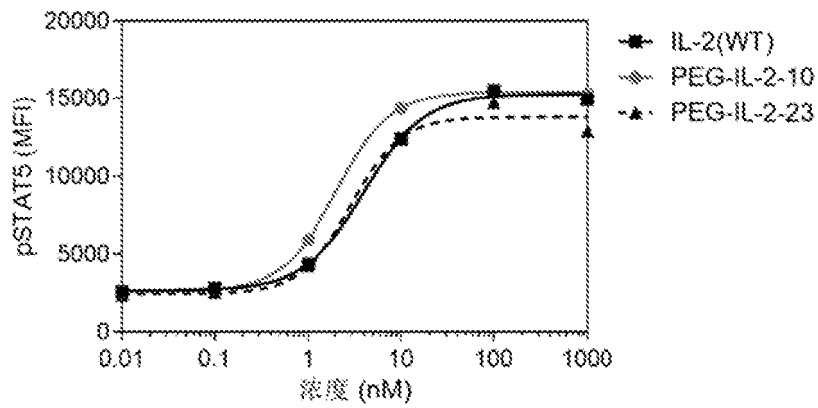


图6C

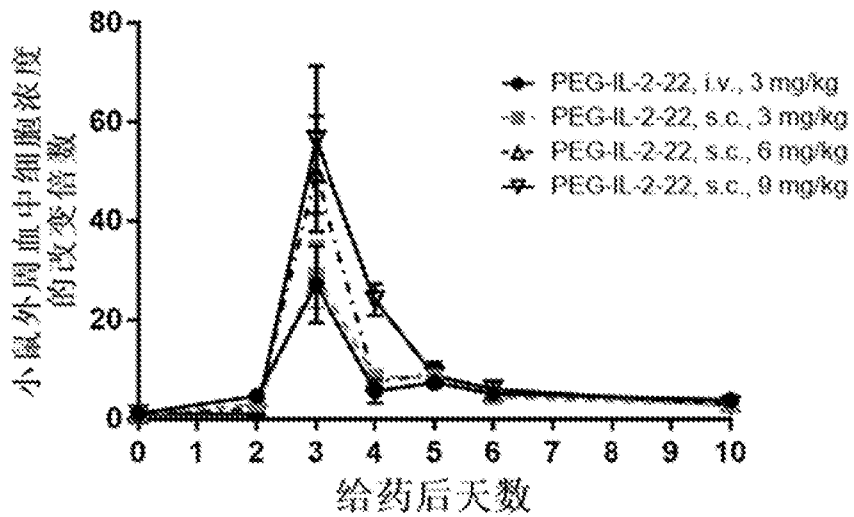


图7A

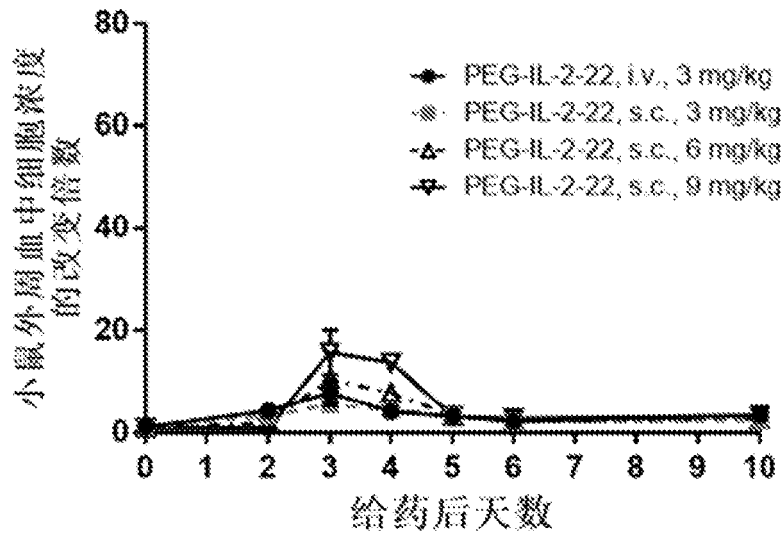


图7B

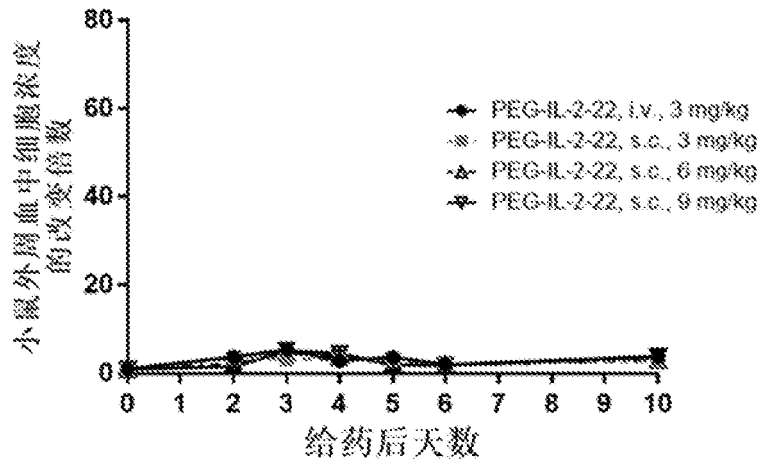


图7C

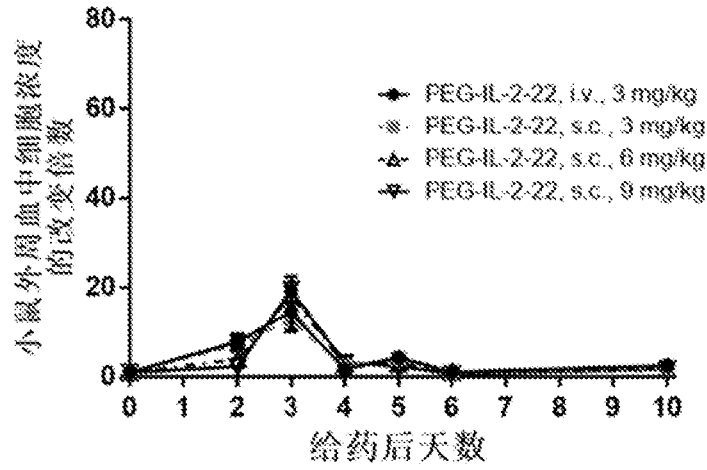


图7D

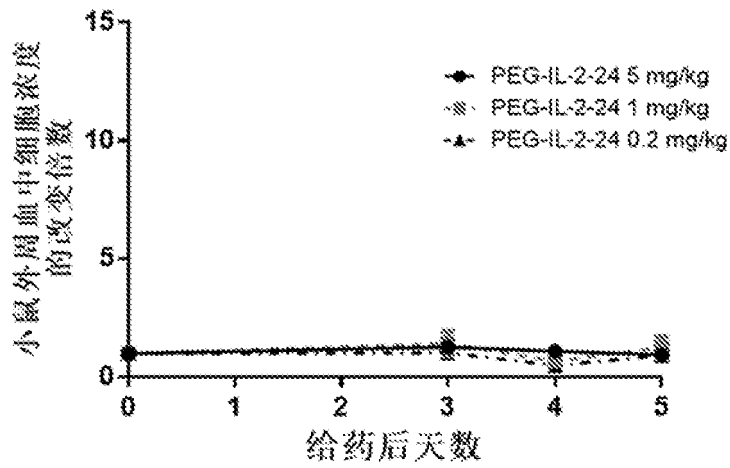


图8A

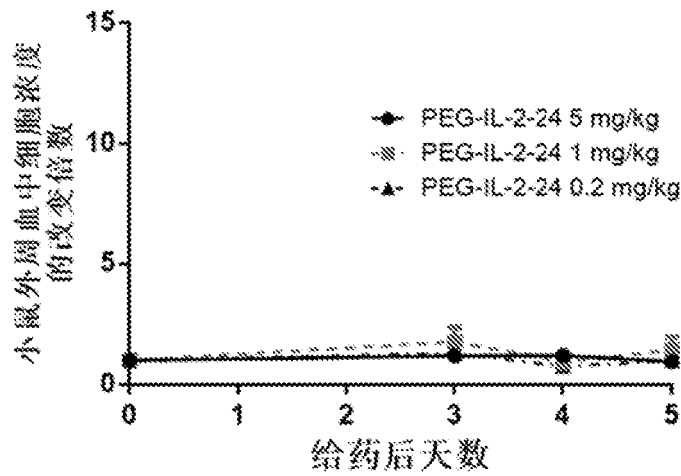


图8B

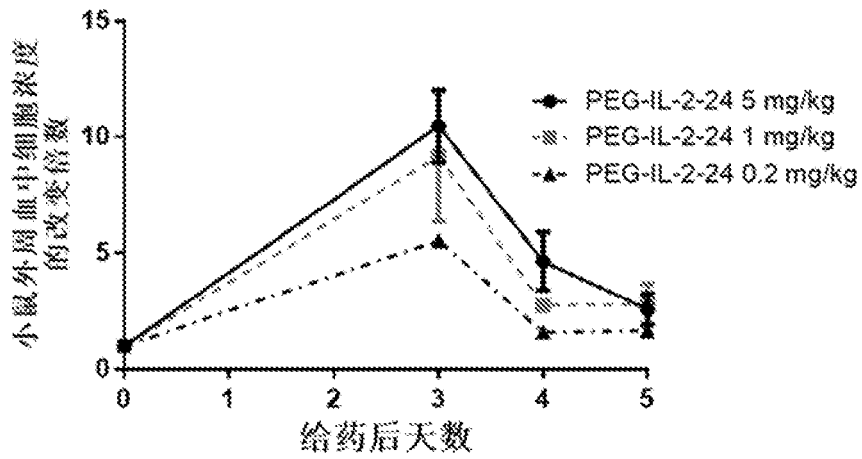


图8C

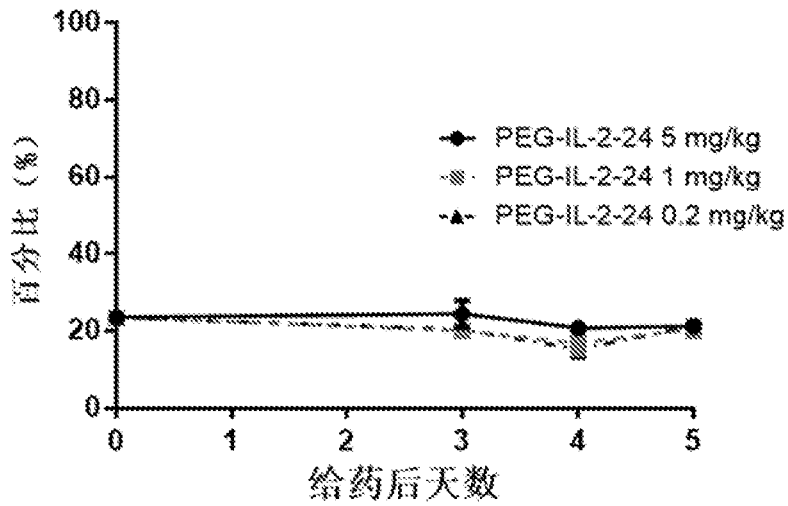


图8D

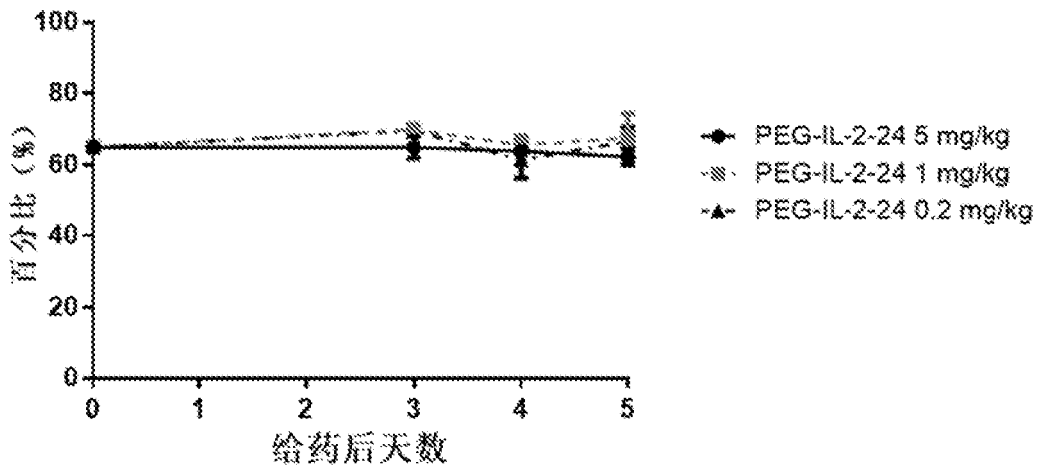


图8E

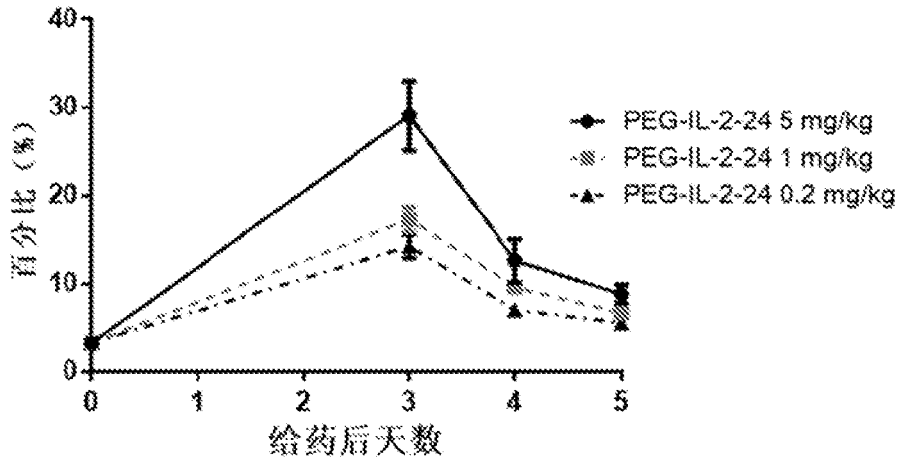


图8F

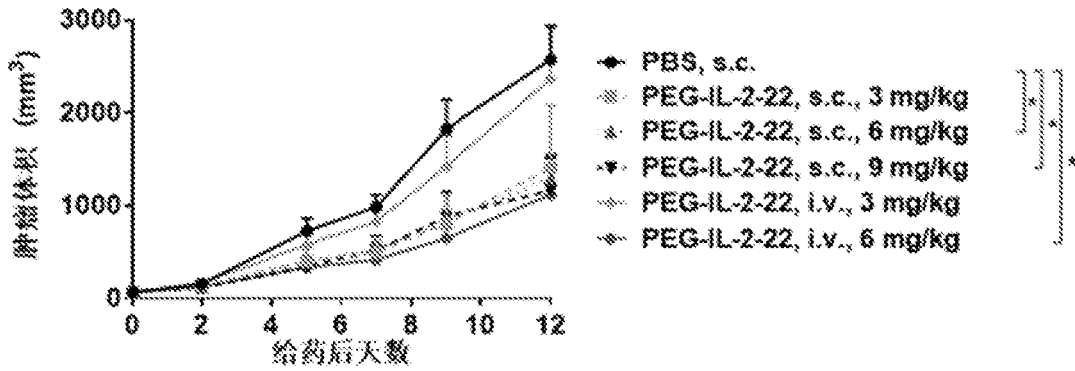


图9

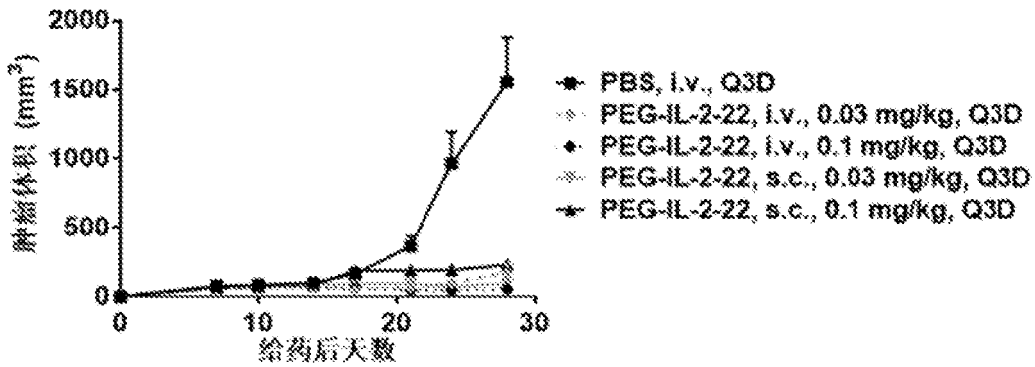


图10