

IL-2 突变体及其应用

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体而言，涉及 IL-2 突变体及其应用。

背景技术

白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2)，最初被鉴定为 T 细胞生长因子 (TCGF)，后续研究发现 IL-2 可结合其受体，并激活 T 细胞、NK 细胞等免疫细胞的增殖和活化。

IL-2 受体包括 IL-2R α 亚基 (CD25)、IL-2R β 亚基 (CD122) 和 IL-2R γ 亚基 (CD132)，不同的亚基之间可形成亲和力不同的受体复合物，包括高亲和力受体 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ ，中间亲和力受体 IL-2R $\beta\gamma$ ，低亲和力受体 IL-2R α 或 IL-2R $\alpha\beta$ 。不同细胞表达的 IL-2R 亚基类型有所不同，例如，静息条件下的传统 T 细胞 CD4⁺T、CD8⁺T 表面一般表达 IL-2 受体 β (IL-2R β , CD122)、IL-2 受体 γ (IL-2R γ , CD132)，几乎不表达 IL-2 受体 α (IL-2R α , CD25)，而调节性 T 细胞 (Treg) 除了表达 IL-2R β 、IL-2R γ 之外，组成性高表达 IL-2R α 。

目前，研究人员尝试借助 IL-2 或其突变体激活免疫细胞或某个亚群的免疫细胞，从而治疗肿瘤或者自身免疫性疾病。例如，高剂量的 IL-2 被批准用于治疗恶性黑色素瘤或转移性肾细胞癌，IL-2 聚乙二醇偶联药物 NKTR-358 被批准开展自身免疫性疾病的临床试验。

而提高 IL-2 的稳定性、产量和/或改变其与某类受体复合物的结合能力，对 IL-2 类型药物的开发具有重要意义。有鉴于此，特提出本发明。

发明内容

本发明公开提供 IL-2 突变体、融合蛋白、缀合物、核酸片段、载体、宿主细胞、制备突变体或融合蛋白的方法、根据所述方法制备而成的突变体或融合蛋白、药物组合物、制药用途、治疗方法和优先刺激调节性 T 细胞的方法。

在第一方面，本发明公开提供一种 IL-2 突变体，与野生型 IL-2 相比，所述 IL-2 突变体包括发生在 Q13、L18、G27、Y31、A73、H79、P82、I89、N90、V91、V93、F117 或 R120 的一个或多个突变。

在一些具体的实施方式中，所述突变为插入、缺失或替换，优选为替换。

在一些具体的实施方案中，所述 IL-2 突变体包括 Q13L、L18I、G27W、Y31V、A73L、H79Q、P82L、I89L、N90Y、V91A、V93I、F117W 或 R120F 的一个或多个突变。

在一些具体的实施方案中，所述 IL-2 突变体包括 (a) ~ (h) 组中至少一组突变：

(a) Y31/A73/H79 突变；优选地，Y31V/A73L/H79Q 突变；

- (b) Q13 突变; 优选地, Q13L 突变;
- (c) R120 突变, 优选地, R120F 突变;
- (d) L18/V91/F117 突变; 优选地, L18I/V91A/F117W 突变;
- (e) L18/I89/V93 突变; 优选地, L18I/I89L/V93I 突变;
- (f) G27/R120 突变; 优选地, G27W/R120F 突变;
- (g) P82/R120 突变; 优选地, P82L/R120F 突变;
- (h) N90/R120 突变; 优选地, N90Y/R120F 突变。

在一些具体的实施方案中, 所述 IL-2 突变具有如 SEQ ID NO: 2~9 任一项所示氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中, 所述 IL-2 突变体的 T_m 值高于野生型 IL-2。

在一些具体的实施方案中, 所述野生型 IL-2 具有如 SEQ ID NO: 60 或 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中, 所述 IL-2 突变体还包括选自下组的一个或多个突变: H16、D20、N88、V91 或 Q126 突变, 例如 H16E 突变, D20A、D20H 或 D20Y 突变, N88A、N88I、N88G、N88R 或 N88D 突变, V91R 或 V91K 突变, Q126L 或 Q126F 突变;

优选地, 所述 IL-2 突变体还包括选自 (i) ~ (iv) 中至少一组的突变:

- (i)、H16 突变, 优选 H16E 突变;
- (ii)、D20 突变, 优选 D20A 突变;
- (iii)、V91 突变, 优选 V91R 突变;
- (iv)、H16/V91 突变, 优选 H16E/V91R 突变。

在一些具体的实施方案中, 所述 IL-2 突变体包括 (a) ~ (n) 组中至少一组突变:

- (a)、H16/Y31/A73/H79 突变; 优选为 H16E/Y31V/A73L/H79Q 突变;
- (b)、H16/R120 突变; 优选 H16E/R120F 突变;
- (c)、H16/L18/V91/F117 突变; 优选 H16E/L18I/V91A/F117W 突变;
- (d)、H16/L18/I89/V93 突变; 优选 H16E/L18I/I89L/V93I 突变;
- (e)、H16/G27/R120 突变; 优选 H16E/G27W/R120F 突变;
- (f)、H16/P82/R120 突变; 优选 H16E/P82L/R120F 突变;
- (g)、D20/Y31/A73/H79 突变; 优选 D20A/Y31V/A73L/H79Q 突变;
- (h)、D20/R120 突变; 优选 D20A/R120F 突变;
- (i)、V91/Y31/A73/H79 突变; 优选 V91R/Y31V/A73L/H79Q 突变;

(j)、V91/Q13 突变；优选 V91R/Q13L 突变；

(k)、V91/R120 突变；优选 V91R/R120F 突变；

(l)、V91/L18/I89/V93 突变；优选 V91R/L18I/I89L/V93I 突变；

(m)、H16/V91/Y31/A73/H79 突变；优选 H16E/V91R/Y31V/A73L/H79Q 突变；

(n)、H16/V91/L18/I89/V93 突变；优选 H16E/V91R/L18I/I89L/V93I 突变。

在一些具体的实施方式中，所述 IL-2 突变体具有如 SEQ ID NO: 22~27、29~30、32~35 或 37~38 任一项所述的氨基酸序列。

在一些具体的实施方式中，所述 IL-2 突变体还包括选自下组的一个或多个突变：N26、N29、N30、N71、Q11、L132、L70、P82、G27 或 F28 突变；

优选地，所述 IL-2 突变体还包括选自下组的一个或多个突变：N26Q、N29S、N30S、N71Q、Q11C、L132C、L70C、P82C、G27C、F78C 突变；

更优选地，所述 IL-2 突变体还包括 (a) ~ (g) 组中至少一组突变：

(a)、N26Q 突变；

(b)、N29S 突变；

(c)、N30S 突变；

(d)、N71Q 突变；

(e)、Q11C/L132C 突变；

(f) L70C/P82C 突变；

(g) G27C/F78C 突变。

在一些具体的实施方式中，所述 IL-2 突变体还包括选自下组中的一个或多个突变：F42、Y45 或 L72 突变，优选 F42A、Y45A 或 L72G 突变。

在一些具体的实施方式中，与野生型 IL-2 相比，所述突变体与 IL-2R $\beta\gamma$ 亚基复合物的结合能力下降；优选地，结合力_{IL-2R $\beta\gamma$ 亚基复合物}/结合力_{IL-2 $\alpha\beta\gamma$ 亚基复合物}下降。

在一些具体的实施方式中，与野生型 IL-2 相比，所述突变体刺激非调节性 T 细胞或 NK（自然杀伤）细胞的能力下降，所述刺激可选自：胞内 STAT5 磷酸化或细胞增殖。

在一些具体的实施方式中，与非调节性 T 细胞或 NK（自然杀伤）细胞相比，所述突变体优先刺激外周血或 T 细胞群体中的调节性 T 细胞（Treg）；所述优先刺激可选自：优先刺激调节性 T 细胞内 STAT5 磷酸化、优先刺激调节性 T 细胞增殖、提高调节性 T 细胞与非调节性 T 细胞的比率，或提高调节性 T 细胞与 NK 细胞的比率。

在第二方面，本发明公开一种 IL-2 突变体，与野生型 IL-2 相比，所述 IL-2 突变体包括

发生在 H16、D20 或 V91 中的一个或多个突变；优选地，所述 IL-2 突变体包括选自下组的突变：

- (i)、H16 突变，优选 H16E 突变；
- (ii)、D20 突变，优选 D20A 突变；
- (iii)、V 91 突变，优选 V91R 突变；
- (iv)、H16/V91 突变，优选 H16E/V91R 突变。

在一些具体的实施方式中，所述 IL-2 突变体具有如 SEQ ID NO: 21、28、31 或 36 所示的氨基酸序列。

在一些具体的实施方式中，所述 IL-2 突变体还包括选自下组的一个或多个突变：N26、N29、N30、N71、Q11、L132、L70、P82、G27 或 F28 突变；

优选地，所述 IL-2 突变体还包括选自下组的一个或多个突变：N26Q、N29S、N30S、N71Q、Q11C、L132C、L70C、P82C、G27C 或 F78C 突变；

更优选地，所述 IL-2 突变体还包括 (a) ~ (g) 组中的至少一组突变：

- (a)、N26Q 突变；
- (b)、N29S 突变；
- (c)、N30S 突变；
- (d)、N71Q 突变；
- (e)、Q11C/L132C 突变；
- (f) L70C/P82C 突变；
- (g) G27C/F78C 突变。

在一些具体的实施方式中，与野生型 IL-2 相比，所述突变体与 IL-2R β γ 亚基复合物的结合能力下降；优选地，结合力 IL-2R β γ 亚基复合物/结合力 IL-2 α β γ 亚基复合物 下降。

在一些具体的实施方式中，与野生型 IL-2 相比，所述突变体刺激非调节性 T 细胞或 NK（自然杀伤）细胞的能力下降，所述刺激可选自：胞内 STAT5 磷酸化或细胞增殖。

在一些具体的实施方式中，与非调节性 T 细胞或 NK 细胞相比，所述突变体优先刺激外周血或 T 细胞群体中的调节性 T 细胞（Treg）；所述优先刺激可选自：优先刺激调节性 T 细胞内 STAT5 磷酸化、优先刺激调节性 T 细胞增殖、提高调节性 T 细胞与非调节性 T 细胞的比率，或提高调节性 T 细胞与 NK 细胞的比率。

在一些具体的实施方式中，所述突变包括缺失、插入或替换，优选为替换。

在一些具体的实施方式中，所述野生型 IL-2 具有如 SEQ ID NO: 60 或 SEQ ID NO: 1

所示的氨基酸序列。

在第三方面，本发明公开一种融合蛋白，所述融合蛋白包括第一多肽和第二多肽，其中，所述第一多肽为前述 IL-2 突变体，所述第二多肽为非 IL-2 多肽。

在一些具体的实施方式中，所述第二多肽为 Fc、肿瘤抗原结合分子或 IL-2 受体亚基；

可选地，所述 Fc 为人 IgG Fc，例如人 IgG1 Fc；

优选地，所述人 IgG1 Fc 包括选自 (a) ~ (i) 组中的至少一组突变：

(a)、C220S；

(b)、N297G；

(c) C220S 和 N297G；

(d)、A327Q；

(e)、L234A 和 L235A；

(f)、A287C 和 L306C；

(g)、A259C 和 L306C；

(h)、R292C 和 V302C；

(i)、V323C 和 I332C；

更优选地，所述人 Ig G1 Fc 具有如 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；

可选地，所述肿瘤抗原包括：EDB-FN (extra domain of fibronectin)、Muc1、p53、FAP、GD2、EpCAM、tenascin-C、CD20、CEA、MAdCAM-1 或 WT1 (Wilms tumor protein1)；

可选地，所述肿瘤抗原结合分子为抗体，例如 scFv、sdFv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv；

可选地，所述 IL-2 受体亚基为 IL-2 受体 α 亚基。

在一些具体的实施方式中，所述第一多肽的 C 端通过或不通过连接肽与所述第二多肽的 N 端连接；或所述第一多肽的 N 端通过或不通过连接肽与所述第二多肽的 C 端连接；

所述连接肽优选选自：(G₄S)_n、(GGNGT)_n 或 (YGNGT)_n，所述 n 选自 1、2、3、4 或 5；

更优选地，所述第一多肽的 C 端与所述第二多肽的 N 端通过连接肽(G₄S)₃ 连接。

在一些具体的实施方式中，所述融合蛋白包括 SEQ ID NO: 13~20 或 SEQ ID NO: 39~56 任一项所述的氨基酸序列。

在第四方面，本发明公开一种缀合物，所述缀合物包括前述突变体或融合蛋白，还包括缀合至所述突变体或融合蛋白的稳定剂、药物或者示踪分子，其中所述稳定剂可选自聚乙二醇，例如单甲氧基聚乙二醇。

在第五方面，本发明公开一种分离的核酸片段，所述核酸片段编码前述突变体或融合蛋

白。

在第六方面，本发明公开一种载体，所述载体包括前述核酸片段。

在第七方面，本发明公开一种宿主细胞，所述宿主细胞包含前述载体。

在一些具体的实施方式中，所述宿主细胞是原核细胞或真核细胞；所述原核细胞或真核细胞可选自大肠杆菌、酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞，所述哺乳动物细胞可选自 CHO 细胞系或 HEK293 细胞系。

在第八方面，本发明公开一种制备前述 IL-2 突变体或融合蛋白的方法，所述方法包括培养前述宿主细胞，以及分离所述宿主细胞表达的 IL-2 突变体或融合蛋白。

在第九方面，本发明公开根据前述方法制备而成的 IL-2 突变体或融合蛋白。

在第十方面，本发明公开一种药物组合物，所述药物组合物包括前述突变体、融合蛋白、缀合物、核酸片段、载体或宿主细胞；以及药学上可接受的运载体、稀释剂或助剂；

优选地，所述药物组合物为可注射药物组合物，例如静脉注射药物组合物或皮下注射药物组合物；更优选地，每剂所述药物组合物包含能够给与受试者有效量的融合蛋白；最优选地，所述有效量为 0.001~10mpk，例如 0.001mpk、0.002mpk、0.003mpk、0.004mpk、0.005mpk、0.006mpk、0.007mpk、0.008mpk、0.009mpk、0.01mpk、0.02mpk、0.03mpk、0.04mpk、0.05mpk、0.06mpk、0.07mpk、0.08mpk、0.09mpk、0.1 mpk、0.2mpk、0.3mpk、0.4mpk、0.5mpk、0.6mpk、0.7mpk、0.8mpk、0.9mpk、1mpk、2mpk、3mpk、4mpk、5mpk、6mpk、7mpk、8mpk、9mpk 或 10mpk。

在第十一方面，本发明公开前述突变体、融合蛋白、缀合物、核酸片段、载体或宿主细胞在制备药物中的用途；

优选地，所述药物为注射药物，例如静脉注射药物或皮下注射药物；

优选地，每剂所述药物包含能够给与受试者有效量的融合蛋白；最优选地，所述有效量为 0.001~10mpk，例如 0.001mpk、0.002mpk、0.003mpk、0.004mpk、0.005mpk、0.006mpk、0.007mpk、0.008mpk、0.009mpk、0.01mpk、0.02mpk、0.03mpk、0.04mpk、0.05mpk、0.06mpk、0.07mpk、0.08mpk、0.09mpk、0.1 mpk、0.2mpk、0.3mpk、0.4mpk、0.5mpk、0.6mpk、0.7mpk、0.8mpk、0.9mpk、1mpk、2mpk、3mpk、4mpk、5mpk、6mpk、7mpk、8mpk、9mpk 或 10mpk；

优选地，所述药物用于治疗自身免疫性疾病，或增生性疾病，或病毒感染。

更优选地，所述自身免疫性疾病包括类风湿关节炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮、皮肤红斑狼疮、狼疮性肾炎、IgA 肾病、干燥综合征、多肌炎、皮肌炎、硬皮病、银屑病、斑块状银屑病、斑秃、多发性硬化症、肌萎缩侧索硬化症、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、移植物抗宿主病、器官移植排斥、自身免疫肝炎、I 型糖尿病、自身免疫性血管炎、湿

疹或哮喘；

更优选地，所述增生性疾病包括赘生物、实体瘤、血液瘤、恶性腹水或恶性胸水；其中，所述实体瘤可为良性或恶性，原发性或转移性，所述恶性实体瘤可为癌或肉瘤，例如，上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌、畸胎瘤、肺部肿瘤、乳头瘤病毒引起的癌、腺癌、癌肿、黑色素瘤、血管肉瘤、神经母细胞瘤、转移性肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、Merkel 细胞癌、卵巢癌、肾细胞癌、转移性肾癌、头颈癌、膀胱癌、非肌层浸润性膀胱癌；所述血液瘤可选自白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤，例如 B 细胞淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤、T 细胞大颗粒淋巴细胞白血病；

更优选地，所述病毒感染选自 HIV 感染、新型冠状病毒感染或 HPV 病毒感染。

在第十二方面，本发明公开一种治疗自身免疫性疾病，或增生性疾病，或病毒感染的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的前述 IL-2 突变体、融合蛋白、缀合物、核酸片段、载体、宿主细胞或药物组合物；

优选地，施用方式为注射，例如静脉注射或者皮下注射；

优选地，所述有效量为 0.001~10mpk，例如 0.001mpk、0.002mpk、0.003mpk、0.004mpk、0.005mpk、0.006mpk、0.007mpk、0.008mpk、0.009mpk、0.01mpk、0.02mpk、0.03mpk、0.04mpk、0.05mpk、0.06mpk、0.07mpk、0.08mpk、0.09mpk、0.1 mpk、0.2mpk、0.3mpk、0.4mpk、0.5mpk、0.6mpk、0.7mpk、0.8mpk、0.9mpk、1mpk、2mpk、3mpk、4mpk、5mpk、6mpk、7mpk、8mpk、9mpk 或 10mpk；

优选地，所述自身免疫性疾病包括类风湿关节炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮、皮肤红斑狼疮、狼疮性肾炎、IgA 肾病、干燥综合征、多肌炎、皮肌炎、硬皮病、银屑病、斑块状银屑病、斑秃、多发性硬化症、肌萎缩侧索硬化症、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、移植物抗宿主病、器官移植排斥、自身免疫肝炎、I 型糖尿病、自身免疫性血管炎、湿疹或哮喘；

优选地，所述增生性疾病包括赘生物、实体瘤、血液瘤、恶性腹水或恶性胸水；其中，所述实体瘤可为良性或恶性，原发性或转移性，所述恶性实体瘤可为癌或肉瘤，例如，上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌、畸胎瘤、肺部肿瘤、乳头瘤病毒引起的癌、腺癌、癌肿、黑色素瘤、血管肉瘤、神经母细胞瘤、转移性肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、Merkel 细胞癌、卵巢癌、肾细胞癌、转移性肾癌、头颈癌、膀胱癌、非肌层浸润性膀胱癌；所述血液瘤可选自白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤，例如 B 细胞淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤、T 细胞大颗粒淋巴细胞白血病；

更优选地，所述病毒感染选自 HIV 感染、新型冠状病毒感染或 HPV 病毒感染。

在第十三方面，本发明公开一种优先刺激 T 细胞群体或外周血中调节性 T 细胞的方法，

其中,所述方法包括将所述 T 细胞群体或外周血与前述的 IL-2 突变体或融合蛋白,或缀合物,或核酸片段,或载体,或宿主细胞,或的药物组合物接触;

优选地,所述所述优先刺激包括:

(a) 与非调节性 T 细胞或 NK 细胞相比,优先刺激调节性 T 细胞的 STAT5 磷酸化;

(b) 与非调节性 T 细胞或 NK 细胞相比,优先刺激调节性 T 细胞增殖;

和/或(c) 提高调节性 T 细胞与非调节性 T 细胞的比率,或提高调节性 T 细胞与 NK 细胞的比率。

术语定义和说明

除非本发明另外定义,与本发明相关的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员所理解的含义。

除非另有说明,本发明所述术语“IL2”或“IL-2”,是指来自任何脊椎动物源,包括哺乳动物例如灵长类(例如人)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)和驯养或农业哺乳动物的任何天然或重组 IL-2。本发明所述“IL2”或“IL-2”包括未加工成熟的 IL-2(例如包含 N 端信号肽的 IL-2)以及产生在细胞中加工成熟的 IL-2 的任何形式。本发明所述“IL2”或“IL-2”还包括 IL-2 的天然变体和片段,例如剪切变体或等位基因变体。本发明所述“IL2”或“IL-2”还包括非天然存在的突变体,例如通过基因工程人工改造的 IL-2 突变体。

“野生型 IL-2”是在其他方面与 IL-2 突变体相同,只是在 IL-2 突变体的每个突变氨基酸位置保持野生型氨基酸的 IL-2 形式。示例性地,如果 IL-2 突变体是未加工成熟的 IL-2,那么该突变体的野生型形式是未加工成熟的 IL-2;如果 IL-2 突变体是加工成熟的 IL-2,那么该突变体的野生型形式是加工成熟的 IL-2;如果 IL-2 突变体是 IL-2 的截短形式,那么该突变体的野生型形式是具有野生型序列的相应的 IL-2 截短形式。示例性地,本发明所述“野生型 IL-2”可具有如下所示氨基酸序列:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQC
LEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWI
TFXQSHSTLT (SEQ ID NO: 60); 其中第 125 位氨基酸残基“X”代表 C、S、A 或 V。

本发明术语“突变”包含氨基酸取代、缺失、插入或其任意组合。本发明所述“突变”可以使用本领域公知的遗传学或化学方法生成氨基酸突变,包括但不限于定点诱变、PCR、基因合成等方法。

本发明所述 IL-2 突变体的“突变位点”编号从 SEQ ID NO: 60 所示“野生型 IL-2”的第 1 位氨基酸残基 A 开始计数。示例性地,本发明“Q13 突变”是指 IL-2 突变体在 SEQ ID NO: 60 所示野生型 IL-2 第 13 位氨基酸残基(Gln, Q)处发生突变。示例性地,本发明“Q13L 突变”

是指 IL-2 突变体在 SEQ ID NO: 60 所示野生型 IL-2 第 13 位处氨基酸残基由 Q (Gln) 突变位 L (Leu)。

本发明用于突变位点间的术语“/”表示“和”的意思,是指“/”前后的突变在同一个 IL-2 突变体中同时存在。示例性地,“Y31/A73/H79”是指在同一个 IL-2 突变体同时在 Y31 位点、A73 位点和 H79 位点发生突变,“Y31V/A73L/H79Q”是指在同一个 IL-2 突变体同时存在 Y31V、A73L 和 H79Q 突变。

本发明术语“Tm”(melting temperature, 熔点),是指 50%的蛋白质发生变性时的温度。本发明所述“Tm”可采用本领域公知的方法测定蛋白的 Tm 值,示例性地,可采用本发明实施例 3 或实施例 6 所示方法测定蛋白的 Tm 值。

本发明术语“融合蛋白”(fusion protein)是指,通过基因重组方法、化学方法或其它适当方法将两个或多个基因的编码区连接,在同一调控序列控制下表达基因重组所得的蛋白质产物。本发明的融合蛋白中,两个或多个基因的编码区之间可由编码连接肽的序列于一个或数个位置融合。连接肽可用于构建本发明的融合蛋白。

本发明术语“连接肽(Linker)”是指,在本发明中用于连接 IL-2 与另一蛋白分子或蛋白片段,以保证蛋白的正确折叠和稳定性的肽。所述另一分子包括但不限于 Fc。本发明的“连接肽”优选为(GGGGS)_n,其中 n 可以为 0、1、2、3、4、5。如果连接肽序列太短,可能影响两蛋白高级结构的折叠,从而相互干扰;如果连接肽序列太长,又涉及免疫原性的问题,因为连接肽序列本身就是新的抗原。

本发明术语“第二多肽”可为单链多肽,例如抗体中的 scFv。所述“第二多肽”还包括多链多肽,其中的至少一条多肽与 IL-2 或其突变体融合,其他多肽链通过共价键或非共价键连接至发生融合的所述至少一条多肽上,例如抗体中的 Fab,其中 Fab 的重链可与 IL-2 或其突变体融合,而轻链通过二硫键连接至所述重链上。

本发明术语“Fc”是指,免疫球蛋白链恒定区,特别是免疫球蛋白重链恒定区的羧基端或其中的一部分,无抗原结合活性,是抗体分子与效应分子或细胞相互作用的部位。本发明所述“Fc”可以是任何 Fc 或其变体,来源于人或非人哺乳动物。例如,免疫球蛋白 Fc 可包括重链 CH1、CH2、CH3、CH4 的两个或更多结构域与免疫球蛋白铰链区的组合。Fc 可以来源于不同的种属,优选人的免疫球蛋白。根据重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为不同的种类,主要有 5 类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。其中一些还可进一步分成亚类(同种型),如 IgG-1、IgG-2、IgG-3、IgG-4; IgA-1 和 IgA-2。“Fc”优选包括至少一个免疫球蛋白铰链区,以及 IgG 的 CH2 和 CH3 结构域。更优选包括 IgG1 的一个 CH2 结构域,一个 CH3 结构域和一个免疫球蛋白铰链区,铰链区起始氨基酸位置可以变动。除非另外说明,否则本发明所述 Fc、恒定区或抗体中的氨基酸残基根据如 Kabat 等人,Sequences of Proteins of

Immunological Interes, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述的 EU 编号体系, 也称作 EU 索引, 进行编号。

本发明“抗体”(antibody)在本发明中以最广义使用, 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。本发明所述“抗体”还包括 scFv, sdFv, Fab, Fab', F(ab')₂ 和 Fv。

本发明术语“分离的”指将材料由其原始或天然环境(例如其天然存在的自然环境)中取出。因此, 存在于活体动物中的天然多核苷酸或多肽不是分离的, 但通过人为干预由天然系统中某些或全部共存材料中分离的相同多核苷酸或多肽是分离的。

“分离的核酸片段”是 RNA 或 DNA 聚合物, 其为单链或双链, 任选含合成的、非天然或改变的核苷酸碱基。DNA 聚合物形式的分离核酸片段可由一个或多个 cDNA、基因组 DNA 或合成 DNA 片段组成。本发明所述“核酸片段”可为载体的一部分, 在异源位点整合入宿主细胞染色体。本发明所述“核酸片段”可为组合物的一部分。由于这种载体或组合物不是其天然存在环境的一部分, 所以仍然是分离的。

本发明术语“载体”包括核酸载体, 例如 DNA 载体(如质粒), RNA 载体, 病毒或其他适合的复制子(例如病毒载体)。已经开发了多种载体用于将编码外源蛋白质的多核苷酸递送到原核或真核细胞中。本发明所述“载体”可含有用于表达蛋白质和/或将这些多核苷酸序列整合到哺乳动物细胞基因组中的附加序列元件、用于指导基因转录的调控序列(如启动子和增强子区域)或用于增强基因的翻译速率或改善由基因转录产生的 mRNA 的稳定性或核输出的序列。这些序列元件包括例如 5' 和 3' 非翻译区、内部核糖体进入位点(IRES)和聚腺苷酸化信号位点, 以便指导表达载体上携带的基因的有效转录。本发明所述“载体”还可以含有以下多核苷酸, 该多核苷酸编码用于选择含有这种载体的细胞的标记。适合的标记的实例包括编码抗生素(如氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素或诺尔丝菌素)抗性的基因。

本发明术语“宿主细胞”是指已引入外源核酸的细胞, 包括这类细胞的后代。所述“后代”在核酸内容物上可与亲本完全相同, 也可含有突变, 与亲本细胞不完全相同。所述“后代”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。

本发明术语“药物组合物”是指含有一种或多种本发明所述 IL-2 突变体、融合蛋白、核酸片段、载体或宿主细胞的混合物，所述混合物还含有其他组分，所述其他组分包括但不限于其在药理学上可接受的运载体、稀释剂或助剂。本发明所述药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

本发明术语“治疗”是指外科手术或药物处理（surgical or therapeutic treatment），其目的是预防、减缓（减少）治疗对象中不希望的生理变化或病变，如细胞增殖性病症（如癌症或传染性疾病），如自身免疫性疾病（如系统性红斑狼疮）的进展。有益的或所希望的临床结果包括但不限于症状的减轻、疾病程度减弱、疾病状态稳定（即，未恶化）、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的改善或缓和、以及缓解（无论是部分缓解或完全缓解），无论是可检测的或不可检测的。需要治疗的对象包括已患有病症或疾病的对象以及易于患上病症或疾病的对象或打算预防病症或疾病的对象。当提到减缓、减轻、减弱、缓和、缓解等术语时，其含义也包括消除、消失、不发生等情况。

本发明术语“受试者”是指接受对如本发明所述的特定疾病或病症（如癌症或传染性疾病或自身免疫性疾病）的治疗的生物体。对象和患者的实例包括接受疾病或病症治疗的哺乳动物，如人、灵长类动物、猪、山羊、兔、仓鼠、猫、狗、豚鼠、牛或其他牛科家族成员、绵羊和马等。

本发明术语“有效量”指单独给予或与另一治疗剂组合给予细胞、组织或对象时能有效防止或缓解疾病病症或该疾病进展的治疗剂用量。“有效量”还指足以缓解症状，例如治疗、治愈、防止或缓解相关医学病症，或治疗、治愈、防止或缓解这些病症的速度增加的化合物用量。当将活性成分单独给予个体时，治疗有效剂量单指该成分。当应用某一组合时，治疗有效剂量指产生治疗作用的活性成分的组合用量，而无论是组合、连续或同时给予。

本发明术语“自身免疫病”指特征是对象对其自身的细胞、组织和/或器官产生免疫反应而引起的细胞、组织和/或器官损伤的对象病症。示例性地，自身免疫病包括但不限于类风湿关节炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮、皮肤红斑狼疮、狼疮性肾炎、IgA 肾病、干燥综合征、多肌炎、皮肌炎、硬皮病、银屑病、斑块状银屑病、斑秃、多发性硬化症、肌萎缩侧索硬化症、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、移植物抗宿主病、器官移植排斥、自身免疫肝炎、I 型糖尿病、自身免疫性血管炎、湿疹或哮喘。

本发明术语“增生性疾病”指细胞或组织的生长不受调节和/或异常生长，可导致发展不需要的病况或疾病的病况，可为或可不为癌性的，其包括但不限于赘生物、实体瘤、血液瘤、恶性腹水或恶性胸水。本发明“实体瘤”可为良性（benign）或恶性（malignant），原发性（Primary）

或转移性 (metastatic)；恶性实体瘤可为癌 (carcinomas) 或肉瘤 (sarcomas)。示例性地，本发明“实体瘤”包括但不限于上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌、畸胎瘤、肺部肿瘤、乳头瘤病毒引起的癌、腺癌、癌肿、黑色素瘤、血管肉瘤、神经母细胞瘤、转移性肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、Merkel 细胞癌、卵巢癌、肾细胞癌、转移性肾癌、头颈癌、膀胱癌、非肌层浸润性膀胱癌。示例性地，本发明“血液瘤”包括但不限于白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤，例如 B 细胞淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤、T 细胞大颗粒淋巴细胞白血病。

本发明术语“IL-2 受体 α 亚基” (IL-2R α)，又称“CD25”，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 IL-2 受体 α 亚基或其突变体，包括“全长”的未加工的 IL-2 受体 α 亚基以及源自细胞中的加工的任何形式的 IL-2 受体 α 亚基，还包括天然存在的 IL-2 受体 α 亚基变体，例如剪接变体或等位变体，还包括在天然 IL-2 受体 α 亚基基础上经过人工改造的突变体。在某些实施方案中，IL-2 受体 α 亚基是人 IL-2 受体 α 亚基，例示性序列如 SEQ ID NO: 57 所示。

本发明术语“IL-2 受体 β 亚基” (IL-2R β)，又称“CD122”，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 IL-2 受体 β 亚基或其突变体，包括“全长”的未加工的 IL-2 受体 β 亚基以及源自细胞中的加工的任何形式的 IL-2 受体 β 亚基，还包括天然存在的 IL-2 受体 β 亚基变体，例如剪接变体或等位变体，还包括在天然 IL-2 受体 β 亚基基础上经过人工改造的突变体。在某些实施方案中，IL-2 受体 β 亚基是人 IL-2 受体 β 亚基，例示性序列如 SEQ ID NO: 58 所示。

本发明术语“IL-2 受体 γ 亚基” (IL-2R γ)，又称“CD132”，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 IL-2 受体 γ 亚基或其突变体，包括“全长”的未加工的 IL-2 受体 γ 亚基以及源自细胞中的加工的任何形式的 IL-2 受体 γ 亚基，还包括天然存在的 IL-2 受体 γ 亚基变体，例如剪接变体或等位变体，还包括在天然 IL-2 受体 γ 亚基基础上经过人工改造的突变体。在某些实施方案中，IL-2 受体 γ 亚基是人 IL-2 受体 γ 亚基，例示性序列如 SEQ ID NO: 59 所示。

本发明术语“Treg”，又称“调节性 T 细胞”或“T_{调节细胞}”，是指一种能抑制其它 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 α 亚基(CD25)和转录因子叉头框 P3(Forkhead box protein P3, FOXP3)，并在诱导和维持对抗原的外周自体耐受中起着关键作用。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。

本发明术语“结合力”是指成对的分子之间表现出的相互间的结合或相互作用。常见的成对分子包括：配体与受体、抗原与抗体、酶和底物等，更具体地，例如本发明所示 IL-2 与 IL-2 $\beta\gamma$ 亚基复合物，或 IL-2 与 IL-2 $\alpha\beta\gamma$ 亚基复合物。本发明所述“结合力”可通过本领域已经的常规

方法进行检测，包括但不限于 ELISA 或 FACS。

附图说明

图 1、流式细胞分析（FACS）方法检测 CHO-K1 hIL2-R α 1A6 重组细胞系人源 IL-2 受体 α 蛋白表达水平的结果图，其中 IL-2 受体 α 抗体购自 BioLegend；阴性对照指同型抗体对照；

图 2、流式细胞分析（FACS）方法检测 CHO-K1 hIL-2R β 2A5 重组细胞系人源 IL-2 受体 β 蛋白表达水平的结果图，其中 IL-2 受体 β 抗体购自 BioLegend；阴性对照指同型抗体对照；

图 3、流式细胞分析（FACS）方法检测 CHO-K1 hIL-2R $\beta\gamma$ 2E6 重组细胞系人源 IL-2 受体 $\beta\gamma$ 蛋白表达水平的结果图，IL-2 受体 β 、 γ 抗体购自 BioLegend；阴性对照指同型抗体对照；

图 3A 为 IL2 受体 β 蛋白表达水平结果图；

图 3B 为 IL2 受体 γ 蛋白表达水平的结果图；

图 4、流式细胞分析（FACS）方法检测 CHO-K1 hIL-2R $\alpha\beta\gamma$ 2D6 重组细胞系人源 IL-2 受体 $\alpha\beta\gamma$ 蛋白表达水平的结果图，IL-2 受体 α 、 β 、 γ 抗体购自 BioLegend；对照为 CHO-K1 空细胞对应受体表达水平；

图 4A 为 IL2 受体 α 蛋白表达水平结果图；

图 4B 为 IL2 受体 β 蛋白表达水平结果图；

图 4C 为 IL2 受体 γ 蛋白表达水平的结果图；

图 5、流式细胞分析（FACS）方法检测 IL-2 突变蛋白与 CHO-K1 IL-2 受体 $\alpha\beta\gamma$ 、IL-2 受体 $\beta\gamma$ 重组细胞结合活性的结果图；

图 5A 为 mut7.36-linker2-hFc、mut11.08-linker2-hFc、mut61-linker2-hFc、mut61.08-linker2-hFc 或 mut61.46-linker2-hFc 与 CHO-K1 IL2 受体 $\alpha\beta\gamma$ 重组细胞结合活性的结果图；

图 5B 为 mut11.31-linker2-hFc、mut7.66-linker2-hFc 与 CHO-K1 IL2 受体 $\alpha\beta\gamma$ 重组细胞结合活性的结果图；

图 5C 为 mut7.36-linker2-hFc、mut11.08-linker2-hFc、mut61-linker2-hFc、mut61.08-linker2-hFc 或 mut61.46-linker2-hFc 与 CHO-K1 IL2 受体 $\beta\gamma$ 重组细胞结合活性的结果图；

图 5D 为 mut11.31-linker2-hFc、mut7.66-linker2-hFc 与 CHO-K1 IL2 受体 $\beta\gamma$ 重组细胞结合活性的结果图。

图 6、检测 IL-2 突变蛋白对 Treg（图 6A-图 6C）、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞（图 6D-图 6F）、CD8⁺T 细胞（图 6G-图 6I）STAT5 磷酸化水平的影响；

图 6A 为 mut7.36-linker2-hFc 对 Treg STAT5 磷酸化水平的影响;

图 6B 为 mut11.08-linker2-hFc 对 Treg STAT5 磷酸化水平的影响;

图 6C 为 mut11.31-linker2-hFc、mut7.66-linker2-hFc 对 Treg STAT5 磷酸化水平的影响;

图 6D 为 mut7.36-linker2-hFc 对 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T 细胞磷酸化水平的影响;

图 6E 为 mut11.08-linker2-hFc 对 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T 细胞磷酸化水平的影响;

图 6F 为 mut11.31-linker2-hFc、mut7.66-linker2-hFc 对 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T 细胞磷酸化水平的影响;

图 6G 为 mut7.36-linker2-hFc 对 $CD8^+$ T 细胞磷酸化水平的影响;

图 6H 为 mut11.08-linker2-hFc 对 $CD8^+$ T 细胞磷酸化水平的影响;

图 6I 为 mut11.31-linker2-hFc、mut7.66-linker2-hFc 对 $CD8^+$ T 细胞磷酸化水平的影响;

图 7、检测 IL-2 突变蛋白对 Treg (图 7A-图 7B)、 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T 细胞 (图 7C-图 7D)、 $CD8^+CD25^+$ T 细胞 (图 7E-图 7F) 增殖水平的影响;

图 7A 为 mut7.36-linker2-hFc、mut7.66-linker2-hFc 对 Treg 增殖水平的影响;

图 7B 为 mut11.08-linker2-hFc、mut11.31-linker2-hFc 对 Treg 增殖水平的影响;

图 7C 为 mut7.36-linker2-hFc、mut7.66-linker2-hFc 对 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T 细胞增殖水平的影响;

图 7D 为 mut11.08-linker2-hFc、mut11.31-linker2-hFc 对 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T 细胞增殖水平的影响;

图 7E 为 mut7.36-linker2-hFc、mut7.66-linker2-hFc 对 $CD8^+CD25^+$ T 细胞增殖水平的影响;

图 7F 为 mut11.08-linker2-hFc、mut11.31-linker2-hFc 对 $CD8^+CD25^+$ T 细胞增殖水平的影响;

图 8、检测 IL-2 突变蛋白对 NK 细胞增殖水平的影响;

图 9A、脾脏中 Treg 细胞在 $CD4^+$ T 细胞中的占比;

图 9B、脾脏中 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 细胞在 $CD4^+$ 细胞中的占比;

图 9C、脾脏中 $CD3^+CD4^+$ 细胞在 $CD3^+$ 细胞中的占比;

图 10A、外周血中 Treg 细胞在 $CD4^+$ 细胞中的占比;

图 10B、外周血中 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 细胞在 $CD4^+$ 细胞中的占比;

图 10C、外周血中 $CD3^+CD4^+$ 细胞在 $CD3^+$ 细胞中的占比;

图 11A、野生型小鼠 DTH 模型不同组别的 Δ 耳厚变化, Δ 耳厚是指刺激前后, 右耳片厚度变化;

图 11B、野生型小鼠 DTH 模型不同组别的体重变化;

图 12A、野生型小鼠 DTH 模型不同组别的 Δ 耳厚变化, Δ 耳厚是指刺激前后, 右耳片厚度变化;

图 12B、野生型小鼠 DTH 模型不同组别的体重变化;

图 13A、NOG 小鼠不同组别的 Treg/Tcon;

图 13B、NOG 小鼠不同组别的 Treg/CD8+;

图 14A、NOG 小鼠不同组别的 Treg 细胞数目;

图 14B、NOG 小鼠不同组别的 Tcon 细胞数目;

图 14C、NOG 小鼠不同组别的 CD8+ 细胞数目;

图 15A、NOG 小鼠不同组别的体重变化;

图 15B、NOG 小鼠不同组别的 GVHD 评分;

图 16A、野生型小鼠皮下给药后血药浓度;

图 16B、野生型小鼠皮下给药后血药浓度;

图 17、野生型小鼠静脉给药后血药浓度;

图 18、PBMC 接种小鼠皮下给药后血药浓度;

图 19、食蟹猴皮下给药后血药浓度;

图 20A、食蟹猴皮下给药后 Treg 数目;

图 20B、食蟹猴皮下给药后 Treg 数目变化倍数;

图 20C、食蟹猴皮下给药后 Treg 占 CD4⁺T 细胞比例;

图 20D、食蟹猴皮下给药后 Treg Ki67⁺ 细胞比例;

图 20E、食蟹猴皮下给药后 FoxP3 平均荧光强度变化倍数;

图 20F、食蟹猴皮下给药后 CD25 平均荧光强度变化倍数;

图 21A、食蟹猴皮下给药后 FoxP3⁺CD4⁺ 细胞数目;

图 21B、食蟹猴皮下给药后 FoxP3⁺CD4⁺ 细胞数目变化倍数;

图 21C、食蟹猴皮下给药后 CD8⁺T 细胞数目;

图 21D、食蟹猴皮下给药后 CD8⁺T 细胞数目变化倍数;

图 21E、食蟹猴皮下给药后 NK 细胞数目;

图 21F、食蟹猴皮下给药后 NK 细胞数目变化倍数。

具体实施方式

下面结合具体实施例来进一步描述本发明，本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

本发明实施例仅是范例性的，并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

实施例 1 IL-2 热稳定性突变的设计与表达质粒构建

使用多种算法获得热稳定性提高的 IL-2 突变，设计合成相应序列，将编码野生型 IL2 和前述突变型 IL2 的核酸片段克隆至带有 Fc 标签的 pTT5 载体上，并按已建立的标准分子生物学方法制备质粒，所述质粒编码以下融合蛋白：IL2-linker2-hFc、mut0.08-linker2-hFc、mut0.31-linker2-hFc、mut0.36-linker2-hFc、mut0.39-linker2-hFc、mut0.46-linker2-hFc、mut0.57-linker2-hFc、mut0.66-linker2-hFc 和 mut0.68-linker2-hFc。

前述融合蛋白及各元件的具体序列信息如表 1 所示，其中，“IL2”表示野生型 IL2，“mutXX”表示与野生型相比，发生突变的突变型 IL2。

表 1 IL-2 稳定性突变序列

突变号	序列编号	序列信息
IL2	SEQ ID NO: 1	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut0.08 (Y31V/A73L/H79Q)	SEQ ID NO: 2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN V KNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLN L L Q SKNF Q LRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut0.31 (Q13L)	SEQ ID NO: 3	APTSSSTKKTQL L LEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut0.36 (R120F)	SEQ ID NO: 4	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLN F WITFAQSIISTLT
mut0.39 (L18I/V91A/F117W)	SEQ ID NO: 5	APTSSSTKKTQLQLEHL I LDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN A IVLELK GSETTFMCEYADETATIVE W LNRWITFAQSIISTLT
mut0.46 (L18I/I89L/V93I)	SEQ ID NO: 6	APTSSSTKKTQLQLEHL I LDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN L NV I I LELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut0.57 (G27W/R120F)	SEQ ID NO: 7	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN W INNYKNPKLTRMLTFKFYMP KKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLN F WITFAQSIISTLT
mut0.66 (P82L/R120F)	SEQ ID NO: 8	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR L RDLISNINVIVLELK

突变号	序列编号	序列信息
		GSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIISTLT
mut0.68 (N90Y/R120F)	SEQ ID NO: 9	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI <u>Y</u> VIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIISTLT
linker2	SEQ ID NO: 10	GGGGSGGGSGGGGS
hFc (C220S/N297G)	SEQ ID NO: 11	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IL2-linker2-hFc, 又称 WT IL-2-linker2-hFc (C220S/N297G)	SEQ ID NO: 12	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT <u>GGGGSGGGSGG</u> <u>GG</u> SEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
mut0.08-linker2-hFc (Y31V/A73L/H79Q)	SEQ ID NO: 13	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNL <u>L</u> QSKNF <u>Q</u> LRPRDLISNINIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT <u>GGGGSGGGSGG</u> <u>GG</u> SEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
mut0.31-linker2-hFc (Q13L)	SEQ ID NO: 14	APTSSSTKKTQL <u>L</u> LEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT <u>GGGGSGGGSGG</u> <u>GG</u> SEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
mut0.36-linker2-hFc (R120F)	SEQ ID NO: 15	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>F</u> WITFAQSIISTLT <u>GGGGSGGGSGG</u> <u>GG</u> SEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
mut0.39-linker2-hFc (L18I/V91A/F117W)	SEQ ID NO: 16	APTSSSTKKTQLQLEHL <u>I</u> LDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI <u>A</u> IVLELK

突变号	序列编号	序列信息
		GSETTFMCEYADETATIVE <u>W</u> LNRWITFAQSIISTLT <u>GGGGSGGGSG</u> <u>GGGSEPKSS</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
mut0.46-linker2-hFc (L18I/I89L/V93I)	SEQ ID NO: 17	APTSSSTKKTQLQLEHL <u>I</u> LDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN <u>L</u> NVI <u>I</u> LELK GSETTFMCEYADETATIVEEFLNRWITFAQSIISTLT <u>GGGGSGGGSGG</u> <u>GGSEPKSS</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
mut0.57-linker2-hFc (G27W/R120F)	SEQ ID NO: 18	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN <u>W</u> INNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEEFLN <u>F</u> WITFAQSIISTLT <u>GGGGSGGGSGG</u> <u>GGGSEPKSS</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
mut0.66-linker2-hFc (P82L/R120F)	SEQ ID NO: 19	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR <u>R</u> LDLISNINIVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEEFLN <u>F</u> WITFAQSIISTLT <u>GGGGSGGGSGG</u> <u>GGSEPKSS</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
mut0.68-linker2-hFc (N90Y/R120F)	SEQ ID NO: 20	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNI <u>Y</u> VIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEEFLN <u>F</u> WITFAQSIISTLT <u>GGGGSGGGSGG</u> <u>GGSEPKSS</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>G</u> STYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

实施例 2 IL-2 热稳定性突变的生产与纯化

对 HEK293 细胞（购自中国科学院细胞库）瞬时转染实施例 1 构建的质粒（PEI，Polysciences）并使用 FreeStyle™ 293 Expression Medium（购自 Gibco）在 37℃ 下进行扩大培养。7 天后收集细胞培养液，离心去除细胞成分，获得含 IL-2-hFc 融合蛋白的培养上清液。

用 10 mL 蛋白 A 柱(购自博格隆)纯化细胞培养上清液中的融合蛋白。蛋白 A 柱先用 3~5 倍柱体积的平衡缓冲液 (PBS 磷酸缓冲液, pH7.4) 平衡, 然后将澄清的培养上清液上样到蛋白 A 柱, 控制流速在 10 mL/分钟。上样完毕后用平衡缓冲液清洗蛋白 A 柱, 平衡缓冲液的体积为蛋白 A 柱柱床体积的 3~5 倍。用洗脱液 (0.02 M 柠檬酸缓冲液, 0.1M 甘氨酸, 0.1M 氯化钠, pH3.0) 洗脱结合在蛋白 A 柱上的蛋白, 用核酸蛋白检测仪监测洗脱情况 (A280 紫外吸收峰)。收集洗脱的蛋白, 加入 1M 精氨酸, 0.4M 丁二酸, pH9.0 的缓冲液中中和 pH。然后过分子筛 (购自博格隆), 缓冲体系为 20mM PB, 200mM 氯化钠, pH6.0-6.5, 收集目的蛋白。用 0.22 μm 的滤器进行无菌过滤, 无菌保存, 即得纯化的 IL-2 突变融合蛋白。

将纯化的 IL-2 突变融合蛋白进行蛋白产量、蛋白浓度 (A280/1.4)、SEC 纯度等检测分析, 纯化后的 IL-2 稳定性突变融合蛋白的质量合格, 同时 IL-2 稳定性突变(mutXX-linker2-hFc) 的产量也较野生型 IL-2 (IL2-linker2-hFc) 有显著提高。其中关于蛋白产量、蛋白浓度和纯度的检测信息参见表 2。

表 2 IL-2 稳定性突变融合蛋白的检测分析

突变号	蛋白产量 (mg/L)	蛋白 SEC 纯度	蛋白浓度 (mg/mL)
IL2-linker2-hFc	0.95	97.25%	1.11
mut0.08-linker2-hFc	8.95	99.85%	1.79
mut0.31-linker2-hFc	1.54	98.49%	2.20
mut0.36-linker2-hFc	2.98	99.99%	1.49
mut0.39-linker2-hFc	43.10	99.58%	2.13
mut0.46-linker2-hFc	13.82	99.92%	1.22
mut0.57-linker2-hFc	1.25	99.91%	0.89
mut0.66-linker2-hFc	7.39	99.90%	1.12
mut0.68-linker2-hFc	11.90	99.99%	1.19

实施例 3 IL-2 热稳定性突变 DSF 检测

将 Protein Thermal Shift Dye Kit (购自 Applied Biosystems, 货号 4461146) 中的缓冲液稀释成 50×, 稀释通过实施例 2 所述方法纯化所得 IL-2 突变蛋白至 0.5mg/mL, 染料 2×浓度, 补充至 20μL 反应体系。混匀后加入到 8 连管中, 每个样品 2 个复孔, 盖上管盖, 离心 5-10 秒, 放置到检测仪器 (Applied Biosystems 7500) 检测, Boltzmann 分析法分析熔解曲线, 获得 Tm 值。结果如表 3 所示, 稳定性 IL-2 突变 (mutXX-linker2-hFc) 与野生型 IL-2 (IL2-linker2-hFc) 相比, Tm 提高 3℃以上, 热稳定性有显著提高。

表 3 IL-2 稳定性突变 DSF 分析

突变号	Tm (°C)
-----	---------

突变号	Tm (°C)
IL2-linker2-hFc	46.74
mut0.08-linker2-hFc	54.91
mut0.31-linker2-hFc	57.53
mut0.36-linker2-hFc	56.59
mut0.39-linker2-hFc	55.93
mut0.46-linker2-hFc	53.83
mut0.57-linker2-hFc	57.98
mut0.66-linker2-hFc	57.24
mut0.68-linker2-hFc	54.77

实施例 4 IL-2 突变（与 $\beta\gamma$ 亚基相互作用减弱的 IL2 突变及在此基础上组合热稳定性突变）
的设计与表达质粒构建

使用包括 MOE 软件在内的多种算法模拟人的 IL-2 与相应的受体 α 、 β 、 γ 亚基的相互作用界面，获得与 $\beta\gamma$ 亚基相互作用减弱的突变位点。设计合成与 $\beta\gamma$ 亚基相互作用减弱的 IL-2 突变体序列及其与热稳定突变组合后的 IL-2 突变体序列。将编码野生型 IL-2 和前述 IL-2 突变体的核酸片段克隆到带有 Fc 标签的 pTT5 载体上，并按已建立的标准分子生物学方法制备质粒，所述质粒编码以下融合蛋白：IL2-linker2-hFc、mut7-linker2-hFc、mut7.08-linker2-hFc、mut7.36-linker2-hFc、mut7.39-linker2-hFc、mut7.46-linker2-hFc、mut7.57-linker2-hFc、mut7.66-linker2-hFc、mut8-linker2-hFc、mut8.08-linker2-hFc、mut8.36-linker2-hFc、mut11-linker2-hFc、mut11.08-linker2-hFc、mut11.31-linker2-hFc、mut11.36-linker2-hFc、mut11.46-linker2-hFc、mut61-linker2-hFc、mut61.08-linker2-hFc 和 mut61.46-linker2-hFc。所述融合蛋白及其组成元件的具体序列信息如表 4 所示，其中，“IL2”表示野生型 IL2，“mutXX”表示与野生型相比，发生突变的突变型 IL2。

表 4 IL-2 突变序列

突变号	序列编号	序列
IL2	SEQ ID NO: 1	参见表1
mut7 (H16E)	SEQ ID NO: 21	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKIFYM PKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut7.08 (H16E/Y31V/A73L/H79Q)	SEQ ID NO: 22	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGINNYVKNPKLTRMLTFKIFYMPK KATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLLQSKNFQLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut7.36 (H16E/R120F)	SEQ ID NO: 23	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKIFYM PKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNFWITFAQSIISTLT
mut7.39	SEQ ID	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKIFYMP KKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINAIIVL

突变号	序列编号	序列
(H16E/L18I/V91A/F117W)	NO: 24	ELKGSETTFMCEYADETATIVE <u>W</u> LNRWITFAQSIISTLT
mut7.46 (H16E/L18I/I89L/V93I)	SEQ ID NO: 25	APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> LLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN <u>L</u> NV <u>I</u> L ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut7.57 (H16E/G27W/R120F)	SEQ ID NO: 26	APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMLN <u>W</u> INNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>E</u> WITFAQSIISTLT
mut7.66 (H16E/P82L/R120F)	SEQ ID NO: 27	APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK PKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR <u>R</u> LDLISNINVIV LELKGETTFMCEYADETATIVEFLN <u>E</u> WITFAQSIISTLT
mut8 (D20A)	SEQ ID NO: 28	APTSSSTKKTQLQLEHLL <u>L</u> ALQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut8.08 (D20A/Y31V/A73L/H79Q)	SEQ ID NO: 29	APTSSSTKKTQLQLEHLL <u>L</u> ALQMLNGINNY <u>V</u> KNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEEELKPLEEVLN <u>L</u> LQSKNF <u>Q</u> LRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut8.36 (D20A/R120F)	SEQ ID NO: 30	APTSSSTKKTQLQLEHLL <u>L</u> ALQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>E</u> WITFAQSIISTLT
mut11 (V91R)	SEQ ID NO: 31	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK PKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN <u>R</u> IV LELKGETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut11.08 (V91R/Y31V/A73L/H79Q)	SEQ ID NO: 32	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNY <u>V</u> KNPKLTRMLTFKFYMPK PKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLN <u>L</u> LQSKNF <u>Q</u> LRPRDLISNIN <u>R</u> IV LELKGETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut11.31 (V91R/Q13L)	SEQ ID NO: 33	APTSSSTKKTQL <u>L</u> LEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK PKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN <u>R</u> IV LELKGETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut11.36 (V91R/R120F)	SEQ ID NO: 34	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN <u>R</u> IVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLN <u>E</u> WITFAQSIISTLT
mut11.46 (V91R/L18I/I89L/V93I)	SEQ ID NO: 35	APTSSSTKKTQLQLEH <u>L</u> LDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN <u>L</u> N <u>R</u> I <u>L</u> ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut61 (H16E/V91R)	SEQ ID NO: 36	APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK PKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN <u>R</u> IV LELKGETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut61.08	SEQ ID	APTSSSTKKTQLQLE <u>E</u> LLLDLQMLNGINNY <u>V</u> KNPKLTRMLTFKFYMPK

突变号	序列编号	序列
(H16E/V91R/Y31V/A73L/H79Q)	NO:37	PKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLQSKNFQLRPRDLISNINRIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
mut61.46 (H16E/V91R/L18I/I89L/V93I)	SEQ ID NO:38	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP KKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLQSKNFHLRPRDLISNLNRIIL ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
linker2	SEQ ID NO:10	参见表1
hFc (C220S/N297G)	SEQ ID NO:11	参见表1
IL2-linker2-hFc	SEQ ID NO: 12	参见表1
mut7-linker2-hFc (H16E)	SEQ ID NO:39	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP PKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLTGGGSGGG GGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
mut7.08-linker2-hFc (H16E/Y31V/A73L/H79Q)	SEQ ID NO:40	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLQSKNFQLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLTGGGSGGGGGSGG GGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
mut7.36-linker2-hFc (H16E/R120F)	SEQ ID NO: 41	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP PKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNFWITFAQSIISTLTGGGSGGG GGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
mut7.39-linker2-hFc (H16E/L18I/V91A/F117W)	SEQ ID NO: 42	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP KKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLQSKNFHLRPRDLISNINIVL ELKGSETTFMCEYADETATIVEWLNWRWITFAQSIISTLTGGGSGGG GGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
mut7.46-linker2-hFc (H16E/L18I/I89L/V93I)	SEQ ID NO: 43	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP KKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLQSKNFHLRPRDLISNLNVIIIL ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLTGGGSGGG GGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR

突变号	序列编号	序列
		TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
mut7.57-linker2-hFc (H16E/G27W/R120F)	SEQ ID NO:44	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNWINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNFWITFAQSIISTLTGGGSGGGSGG GGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
mut7.66-linker2-hFc (H16E/P82L/R120F)	SEQ ID NO: 45	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRLRDLISININVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNFWITFAQSIISTLTGGGSGG GGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGST TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
mut8-linker2-hFc (D20A)	SEQ ID NO:46	APTSSSTKKTQLQLEHLLLAQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLTGGGSGGGGSGG GGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
mut8.08-linker2-hFc (D20A/Y31V/A73L/H79 Q)	SEQ ID NO:47	APTSSSTKKTQLQLEHLLLAQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLTGGGSGGGGSGG GGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
mut8.36-linker2-hFc (D20A/R120F)	SEQ ID NO:48	APTSSSTKKTQLQLEHLLLAQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNFWITFAQSIISTLTGGGSGGGGSGG GGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
mut11-linker2-hFc	SEQ ID	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK PKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISINRIV

突变号	序列编号	序列
(V91R)	NO:49	LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT GGGGSGG GGSGGGGSEPKSS DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
mut11.08-linker2-hFc (V91R/Y31V/A73L/H79 Q)	SEQ ID NO: 50	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK PKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN RIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT GGGGSGG GGSGGGGSEPKSS DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
mut11.31-linker2-hFc (V91R/Q13L)	SEQ ID NO: 51	APTSSSTKKTQL L LEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK PKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN RIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT GGGGSGG GGSGGGGSEPKSS DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
mut11.36-linker2-hFc (V91R/R120F)	SEQ ID NO:52	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN RIV LEL GSETTFMCEYADETATIVEFLN F WITFAQSIISTLT GGGGSGGGSGG GGSEPKSS DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
mut11.46-linker2-hFc (V91R/L18I/I89L/V93I)	SEQ ID NO: 53	APTSSSTKKTQLQLEH L LDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP KKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN RIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT GGGGSGGG GGSGGGGSEPKSS DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
mut61-linker2-hFc (H16E/V91R)	SEQ ID NO:54	APTSSSTKKTQLQLE E LLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP PKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNIN RIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT GGGGSGG GGSGGGGSEPKSS DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY GS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK

突变号	序列编号	序列
mut61.08-linker2-hFc (H16E/V91R/Y31V/A73L/H79Q)	SEQ ID NO:55	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGINNVKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLLQSKNFQLRPRDLISNINRIVLELKGETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSYRQVVSIVLTIVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
mut61.46-linker2-hFc (H16E/V91R/L18I/I89L/V93I)	SEQ ID NO:56	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGINNVKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINRIILELKGETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLTGGGGSGGGGGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRQVVSIVLTIVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

实施例 5 IL-2 突变的生产与纯化

对 HEK293 细胞（购自中国科学院细胞库）瞬时转染（PEI，Polysciences）实施例 4 构建的质粒并使用 FreeStyle™ 293 Expression Medium（购自 Gibco）在 37℃ 下进行扩大培养。7 天后收集细胞培养液，离心去除细胞成分，获得含 IL-2-hFc 融合蛋白的培养上清液。

用 10 mL 蛋白 A 柱（购自博格隆）纯化细胞培养上清液中的融合蛋白。蛋白 A 柱先用 3～5 倍柱体积的平衡缓冲液（PBS 磷酸缓冲液，pH7.4）平衡，然后将澄清的培养上清液上样到蛋白 A 柱，控制流速在 10 mL/分钟。上样完毕后用平衡缓冲液清洗蛋白 A 柱，平衡缓冲液的体积为蛋白 A 柱柱床体积的 3～5 倍。用洗脱液（0.02 M 柠檬酸缓冲液，0.1M 甘氨酸，0.1M 氯化钠，pH3.0）洗脱结合在蛋白 A 柱上的蛋白，用核酸蛋白检测仪监测洗脱情况（A280 紫外吸收峰）。收集洗脱的蛋白，加入 1M 精氨酸，0.4M 丁二酸，pH9.0 的缓冲液中中和 pH。然后过分子筛（购自博格隆），缓冲体系为 20mM PB，200mM 氯化钠，pH6.0-6.5，收集目的蛋白。用 0.22 μm 的滤器进行无菌过滤，无菌保存，即得纯化的 IL-2 突变融合蛋白。

对纯化的 IL-2 突变融合蛋白（mutXX-linker2-hFc）进行蛋白浓度（A280/1.4）、SEC 纯度等检测分析，纯化后的 IL-2 突变融合蛋白的质量合格。其中，关于蛋白纯度和浓度的检测信息参见表 5。

表 5 IL-2 突变融合蛋白的检测分析

突变号	蛋白 SEC 纯度	蛋白浓度 (mg/mL)
IL2-linker2-hFc	97.25%	1.11
mut7-linker2-hFc	100%	0.97
mut7.08-linker2-hFc	99.84%	1.73

突变号	蛋白 SEC 纯度	蛋白浓度 (mg/mL)
mut7.36-linker2-hFc	99.94%	2.40
mut7.39-linker2-hFc	99.77%	1.16
mut7.46-linker2-hFc	99.90%	1.28
mut7.57-linker2-hFc	99.89%	1.37
mut7.66-linker2-hFc	99.89%	1.92
mut8-linker2-hFc	97.19%	0.98
mut8.08-linker2-hFc	-	0.82
mut8.36-linker2-hFc	-	1.65
mut11-linker2-hFc	99.13%	1.65
mut11.08-linker2-hFc	99.88%	1.29
mut11.31-linker2-hFc	100.00%	1.37
mut11.36-linker2-hFc	99.97%	1.15
mut11.46-linker2-hFc	99.90%	1.52
mut61-linker2-hFc	99.93%	1.36
mut61.08-linker2-hFc	99.99%	1.15
mut61.46-linker2-hFc	99.99%	1.30

实施例 6 IL-2 突变 DSF 检测

将 Protein Thermal Shift Dye Kit（购自 Applied Biosystems，货号 4461146）中的缓冲液稀释成 50×，稀释实施例 5 纯化的 IL-2 突变蛋白至 0.5mg/mL，染料 2×浓度，补充至 20μL 反应体系。混匀后加入到 8 连管中，每个样品 2 个复孔，盖上管盖，离心 5-10 秒，放置到检测仪器（Applied Biosystems 7500）检测，Boltzmann 分析法分析熔解曲线，获得 Tm 值。具体 Tm 值如表 6 所示。

根据表 6 所示结果可知，实施例 4-5 所示 IL-2 突变体（mutXX-linker2-hFc）与野生型 IL-2（IL2-linker2-hFc）相比，Tm 均提高 5℃以上，其中部分 IL-2 突变体的 Tm 提高 9℃以上，所有突变体的热稳定性均有显著提高。

令人意外，与 βγ 亚基相互作用减弱的 IL-2 突变体，较之野生型 IL-2，其 Tm 值升高，热稳定性得到提升；在此基础上，进一步组合热稳定性突变的组合型突变体，均保持高 Tm 值，其中部分组合了热稳定突变的组合突变，与仅发生 βγ 亚基相互作用减弱的突变相比，Tm 仍提高 2℃以上，最高可以提高 6℃以上，热稳定性获得进一步的提高。

表 6 IL-2 突变 DSF 分析

突变号	Tm (°C)
IL2-linker2-hFc	45.95
mut7-linker2-hFc	51.08
mut7.08-linker2-hFc	54.70
mut7.36-linker2-hFc	56.95
mut7.57-linker2-hFc	57.54
mut7.66-linker2-hFc	56.64

突变号	Tm (°C)
mut8-linker2-hFc	55.24
mut8.08-linker2-hFc	55.32
mut8.36-linker2-hFc	56.84
mut11-linker2-hFc	56.63
mut11.08-linker2-hFc	58.80
mut11.31-linker2-hFc	59.37
mut11.36-linker2-hFc	57.56
IL2-linker2-hFc	46.74
mut7-linker2-hFc	51.05
mut7.39-linker2-hFc	56.30
mut7.46-linker2-hFc	54.84
mut11-linker2-hFc	57.17
mut11.46-linker2-hFc	57.02
IL-2-linker2-hFc	46.86
mut61-linker2-hFc	56.84
mut61.08-linker2-hFc	57.71
mut61.46-linker2-hFc	56.84

实施例 7 过表达人或小鼠 IL-2 受体的稳转细胞株的构建

A. 过表达人源 IL-2 受体 α 的稳转细胞株构建

将人的 IL-2 受体 α 亚基的氨基酸序列(NCBI 中的基因登陆号为 P01589,具体序列如 SEQ ID NO: 57 所示)克隆到 pLVX-IRES-Puro 载体(购自优宝生物,货号: VT1464)中,进行慢病毒包装,随后感染 CHO-K1 细胞系(购自中国科学院细胞库)。病毒感染 CHO-K1 细胞 72 个小时后,用已知的 IL-2 受体 α 亚基抗体(货号 302606,购自 BioLegend)经流式细胞分析法进行检测。当确定转染后的细胞开始表达人 IL-2 受体 α 亚基,加入 Puromycin(购自 Gibco)进行筛选,待细胞恢复后用有限稀释法在 96 孔培养板中进行亚克隆,并置于 37°C、5% (v/v) CO₂ 条件下培养,大约 2 周后选择部分单克隆孔扩增到 6 孔板中。对扩增后的克隆再用已知的 IL-2 受体 α 亚基抗体经流式细胞分析法进行筛选。选择长势较好、荧光强度较高、单克隆的细胞系继续扩大培养,用流式细胞分析法再次复测后并液氮冻存,即获得表达人 IL-2 受体 α 亚基的稳转细胞株。具体选择结果如表 7 和图 1 所示,表 7 中阳性细胞(%)指阳性细胞占总细胞数目的百分比。表 7 说明,已经制得一系列 IL-2 受体 α 亚基过表达的 CHO-K1 细胞系。

表 7 表达人源 IL-2 受体 α 的 CHO-K1 细胞 FACS 筛选检测结果

序号	转染细胞克隆号	IL-2 受体 α 抗体		IgG 亚型对照	
		阳性细胞(%)	平均荧光强度	阳性细胞(%)	平均荧光强度
1	CHO-K1 hIL-2Rα 1A6	100.00	38168	-	-
2	CHO-K1 hIL-2Rα 2D2	100.00	21817	-	-
3	CHO-K1 hIL-2Rα 2D5	100.00	18111	-	-

	转染细胞克隆号	IL-2 受体 α 抗体		IgG 亚型对照	
4	CHO-K1 hIL-2R α 2B8	99.80	19018	0.04	80.70

B. 过表达人源 IL-2 受体 β 的稳转细胞株构建

将人的 IL-2 受体 β 亚基的氨基酸序列(NCBI 中的基因登陆号为 P14784,具体序列如 SEQ ID NO: 58 所示)克隆到 pLVX-IRES-Puro 载体(购自优宝生物,货号: VT1464)中,进行慢病毒包装,随后感染 CHO-K1 细胞系(购自中国科学院细胞库)。病毒感染 CHO-K1 细胞 72 个小时后,用已知的 IL-2 受体 β 亚基抗体(货号 339010,购自 BioLegend)经流式细胞分析法进行检测。当确定转染后的细胞开始表达人 IL-2 受体 β 亚基,加入 Puromycin(购自 Gibco)进行筛选,待细胞恢复后用有限稀释法在 96 孔培养板中进行亚克隆,并置于 37°C、5% (v/v) CO₂ 条件下培养,大约 2 周后选择部分单克隆孔扩增到 6 孔板中。对扩增后的克隆再用已知的 IL-2 受体 β 亚基抗体经流式细胞分析法进行筛选。选择长势较好、荧光强度较高、单克隆的细胞系继续扩大培养,用流式细胞分析法再次复测后并液氮冻存,即获得表达人 IL-2 受体 β 亚基的稳转细胞株。具体选择结果如表 8 和图 2 所示,表 8 中阳性细胞(%)指阳性细胞占总细胞数目的百分比。表 8 说明,已经制得一系列 IL-2 受体 β 亚基过表达的 CHO-K1 细胞系。

表 8 表达人源 IL-2 受体 β 的 CHO-K1 细胞 FACS 筛选检测结果

序号	转染细胞克隆号	IL-2 受体 β 抗体		IgG 亚型对照	
		阳性细胞 (%)	平均荧光强度	阳性细胞 (%)	平均荧光强度
1	CHO-K1 hIL-2R β 2A5	100.00	7905	-	-
2	CHO-K1 hIL-2R β 2B3	99.40	5081	0.03	41.50
3	CHO-K1 hIL-2R β 2H4	99.40	1226	-	-

C. 过表达人源 IL-2 受体 $\beta\gamma$ 的稳转细胞株构建

将人的 IL-2 受体 γ 亚基的氨基酸序列(NCBI 中的基因登陆号为 P31785,具体序列如 SEQ ID NO: 59 所示)克隆到 pLVX-IRES-Hygro 载体中,进行慢病毒包装,随后感染 CHO-K1 IL2 受体 β 亚基细胞系过表达细胞系(CHO-K1 hIL-2R β 2A5)。病毒感染 CHO-K1 细胞 72 个小时后,用已知的 IL-2 受体 β 、 γ 亚基抗体(货号 339010、338608,购自 BioLegend)经流式细胞分析法进行检测。当确定转染后的细胞开始表达人 IL-2 受体 $\beta\gamma$ 亚基,加入 Puromycin、Hygromycin(购自 Gibco、Thermo)进行筛选,待细胞恢复后用有限稀释法在 96 孔培养板中进行亚克隆,并置于 37°C、5% (v/v) CO₂ 条件下培养,大约 2 周后选择部分单克隆孔扩增到 6 孔板中。对扩增后的克隆再用已知的 IL-2 受体 β 、 γ 亚基抗体经流式细胞分析法进行筛选。选择长势较好、荧光强度较高、单克隆的细胞系继续扩大培养,用流式细胞分析法再次复测后并液氮冻存,即获得表达人 IL-2 受体 $\beta\gamma$ 亚基的稳转细胞株。具体选择结果如表 9 和

图 3A-图 3B 所示，表 9 中阳性细胞（%）指阳性细胞占总细胞数目的百分比。表 9 说明，已经制得一系列 IL-2 受体 $\beta\gamma$ 亚基过表达的 CHO-K1 细胞系。

表 9 表达人源 IL-2 受体 $\beta\gamma$ 的 CHO-K1 细胞 FACS 筛选检测结果

序号	转染细胞克隆号	IL-2 受体 β 抗体		IgG 亚型对照		IL-2 受体 γ 抗体		IgG 亚型对照	
		阳性细胞 (%)	平均荧光强度	阳性细胞 (%)	平均荧光强度	阳性细胞 (%)	平均荧光强度	阳性细胞 (%)	平均荧光强度
1	CHO-K1 IL-2R $\beta\gamma$ 2D3	100.00	4569	0.65	115	98.90	8932	23.30	1070
2	CHO-K1 hIL-2R $\beta\gamma$ 2C11	99.70	2111	-	-	99.00	31664	-	-
3	CHO-K1 IL-2R $\beta\gamma$ 2E6	100.00	2909	-	-	98.80	11764	-	-

D. 过表达人源 IL-2 受体 $\alpha\beta\gamma$ 的稳转细胞株构建

将人 IL-2 受体 α 亚基的氨基酸序列克隆到 pLVX-IRES-zsGreen 载体中，进行慢病毒包装，随后感染 IL-2 受体 $\beta\gamma$ 亚基过表达的 CHO-K1 细胞系。病毒感染 CHO-K1 细胞 72 个小时后，用已知的 IL-2 受体 α 、 β 、 γ 亚基抗体（同上，购自 BioLegend）经流式细胞分析法进行检测。当确定转染后的细胞开始表达人 IL-2 受体 $\alpha\beta\gamma$ 亚基，加入 Puromycin、Hygromycin（购自 Gibco、Thermo）、GFP 荧光表达进行筛选，待细胞恢复后用有限稀释法在 96 孔培养板中进行亚克隆，并置于 37℃、5%（v/v）CO₂ 条件下培养，大约 2 周后选择部分单克隆孔扩增到 6 孔板中。对扩增后的克隆再用已知的 IL-2 受体 α 、 β 、 γ 亚基抗体经流式细胞分析法进行筛选。选择长势较好、荧光强度较高、单克隆的细胞系继续扩大培养，用流式细胞分析法再次复测后并液氮冻存，即获得表达人 IL-2 受体 $\alpha\beta\gamma$ 亚基的稳转细胞株。具体选择结果如表 10 和图 4A-图 4C 所示，表 10 中阳性细胞（%）指阳性细胞占总细胞数目的百分比。表 10 说明，已经制得一系列 IL-2 受体 $\alpha\beta\gamma$ 亚基过表达的 CHO-K1 细胞系。

表 10 表达人源 IL-2 受体 $\alpha\beta\gamma$ 的 CHO-K1 细胞 FACS 筛选检测结果

序号	转染细胞克隆号	IL-2 受体 α 抗体		IL-2 受体 β 抗体		IL-2 受体 γ 抗体	
		阳性细胞 (%)	平均荧光强度	阳性细胞 (%)	平均荧光强度	阳性细胞 (%)	平均荧光强度
1	CHO-K1 hIL-2R $\alpha\beta\gamma$ 1E3	99.90	10667	100.00	3002	99.90	14863
2	CHO-K1 hIL-2R $\alpha\beta\gamma$ 2D6	99.90	5265	99.90	1324	99.80	2575
3	CHO-K1 hIL-2R $\alpha\beta\gamma$ 1A10	100.00	12255	88.60	465	99.60	4106

表 11 实施例 7 A-D 构建稳转细胞株使用的基因名称及其编码蛋白的序列信息

基因名称	序列编号	序列信息
hIL2R α	SEQ ID NO: 57	MDSYLLMWGLLTFFIMVPGCQAELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKE

基因名称	序列编号	序列信息
		RKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAVAGCVFLLISVLLLSGLTWQRRQRKSRRTI
hIL2Rβ	SEQ ID NO: 58	MAAPALSWRLPLLILLPLATSWASAAVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGLQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTIPWLGHLVGLSGAFGFIIIVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGDDVQKWLSSFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGSPSPSTAPGSGGAGEERMPPSLQERVPRDWDPPQLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGVSFPSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLV
hIL2Rγ	SEQ ID NO: 59	MLKPSLPFTSLLFLQLPLLGVLNNTILTTPNGNEDTTADFFLTMTPTDSLVSSTLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLTLYWYKNSDNDKVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHLQYTFVVQLQDPREPRRQATQMLKLQNLVIPWAPENLTLHKLSESQLELNWNRNFLNHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSVDYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFNPLCGSAQHWSEWSPHGWGNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVS KGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCTLKP ET

实施例 8 流式细胞实验（FACS）检测 IL-2 突变与受体表达细胞的结合

将 CHO-K1 IL2 受体 αβγ 或 CHO-K1 IL2 受体 βγ 细胞(CHO-K1 hIL-2R αβγ 2D6、CHO-K1 hIL-2R βγ 2E6) 在 T-75 细胞培养瓶中扩大培养至 90%汇合度。移除培养基，用 PBS 缓冲液（购自 Hyclone，货号 SH30256.01）洗涤一次，然后用 2mL 含有 0.25% EDTA 的胰酶（购自 Invitrogen，货号 25200072）处理细胞 2-3 分钟，加入 8mL 含有 10%（w/w）胎牛血清（购自 Gibco，货号 10099-141C）的 DMEM/F-12（购自 Gibco，货号 12634-010）进行中和，用移液器吹打 3-4 次，将吹散后的细胞收集到 15 毫升离心管中，进行细胞计数后，室温条件下 1000rpm 离心 5 分钟，弃去培养基。将细胞用含有 2%（w/w）胎牛血清的 RPMI-1640（购自 Gibco，货号 A10491-01）重悬并稀释至 1.43×10⁶ 个细胞每毫升，按每孔 70μL 加入到 U 型底 96 孔 FACS 反应板中，放在 4℃或者冰上备用。用含有 2%（w/w）胎牛血清的 RPMI-1640 稀释待测 IL-2 突变，按每孔 30μL 加入细胞中混匀，冰上孵育 1 小时。用 FACS 缓冲液[含有 2%（w/w）牛血清蛋白的 PBS 缓冲液]离心洗涤 2 次，加入每孔 100μL 荧光标记的二抗（购自 Biolegend，货号 409306），冰上孵育 30 分钟。用 FACS 缓冲液离心洗涤 2 次。用 FACS（FACS Canto II，购自 BD 公司）检测和分析结果。或者用 100μL 含有 2%（w/w）多聚甲醛（购自 DingGuo，货号 AR-0211）的 FACS 缓冲液悬浮细胞，放于 4℃保存至上机检测，检测前每孔加入 100μL PBS 缓冲液，用 FACS 检测和分析结果。结果如图 5A-图 5D 和表 12-13 示。

结果显示，IL-2 突变可结合细胞表面的人源 IL2 受体 $\alpha\beta\gamma$ 三聚体。IL-2 突变与细胞表面的人源 IL2 受体 $\beta\gamma$ 二聚体的结合活性与野生型相比较弱，其中，mut61-linker2-hFc、mut61.08-linker2-hFc 和 mut61.46-linker2-hFc 与 CHO-K1 IL2R $\beta\gamma$ 二聚体的结合活性受到极大抑制。表中数据 MFI 为所测细胞群的平均荧光强度值。

表12 FACS检测IL-2突变与CHO-K1 IL2受体 $\alpha\beta\gamma$ 重组细胞

(CHO-K1 IL2R $\alpha\beta\gamma$) 的结合活性								
蛋白浓度(nM)	23.529	4.7059	0.9412	0.1882	0.0376	0.0075	0.0015	0.0003
IL2-linker2-hFc(MFI)	25072	22623	22295	9026	1728	457	161	251
mut7.36-linker2-hFc(MFI)	23892	19565	18132	9608	2416	570	272	171
mut11.08-linker2-hFc(MFI)	22230	17370	14857	8713	2736	621	268	251
mut61-linker2-hFc(MFI)	23858	18259	16403	9188	2307	544	224	194
mut61.08-linker2-hFc(MFI)	22558	19652	18992	9557	2131	575	303	190
mut61.46-linker2-hFc(MFI)	24244	19701	19386	10124	2384	521	280	186
蛋白浓度(nM)	26.667	5.3333	1.0667	0.2133	0.0427	0.0085	0.0017	0.0003
人IgG对照	118	124	157	181	274	119	120	146
蛋白浓度(nM)	23.529	4.7059	0.9412	0.1882	0.0376	0.0075	0.0015	0.0003
IL2-linker2-hFc(MFI)	17021	16362	15503	9402	1983	423	188	156
mut7.66-linker2-hFc(MFI)	15503	11604	9659	7683	2485	568	227	177
mut11.31-linker2-hFc(MFI)	13449	10906	9502	7521	2181	553	214	172
蛋白浓度(nM)	26.667	5.3333	1.0667	0.2133	0.0427	0.0085	0.0017	0.0003
人IgG对照(MFI)	187	136	138	139	144	145	140	146

表13 FACS检测IL-2突变与CHO-K1 IL2受体 $\beta\gamma$ 重组细胞

(CHO-K1 IL2R $\beta\gamma$) 的结合活性								
蛋白浓度(nM)	117.65	39.216	13.072	4.357	1.452	0.484	0.161	0.054
IL2-linker2-hFc(MFI)	1210	1226	1162	980	904	603	325	191
mut7.36-linker2-hFc(MFI)	615	438	318	250	210	165	156	153
mut11.08-linker2-hFc(MFI)	854	645	447	342	232	178	160	144
mut61-linker2-hFc(MFI)	169	155	142	142	145	146	148	142
mut61.08-linker2-hFc(MFI)	164	163	144	144	157	144	146	141
mut61.46-linker2-hFc(MFI)	148	159	132	131	134	133	136	134
蛋白浓度(nM)	133.33	44.444	14.815	4.938	1.646	0.549	0.183	0.061
人IgG对照(MFI)	130	130	136	134	139	141	141	146
蛋白浓度(nM)	117.65	39.216	13.072	4.357	1.452	0.484	0.161	0.054
IL2-linker2-hFc(MFI)	2694	2703	2518	2170	1729	831	363	177
mut7.66-linker2-hFc(MFI)	905	597	357	216	157	136	124	118
mut11.31-linker2-hFc(MFI)	1320	950	560	285	180	134	121	115
蛋白浓度(nM)	133.33	44.444	14.815	4.938	1.646	0.549	0.183	0.061
人IgG对照(MFI)	259	100	101	107	101	102	104	109

实施例 9 STAT5 磷酸化实验检测 IL-2 突变对不同细胞的信号通路激活作用

将冷冻的 PBMC（购自 Allcells）复苏，每孔加入 50 μ l 的 5 $\times 10^5$ 个细胞 PBMC，以及 50 μ l

IL-2 突变蛋白，二氧化碳培养箱中反应 15 分钟。反应结束后，每孔加 100μl 预冷的 DPBS 终止反应，离心后分别进行 Livedead Violet 染色 (Invitrogen-L34964)，Fix I (BD-557870) 37°C 固定 10 分钟，PermIII (BD-558050) 冰上破膜 30 分钟。用 CD3-AF700 (BD-557943)，CD4-PerCPcy5.5 (BD-560650)，CD8-FTIC (BD-555366)，CD25-PE (BD-557138)，FoxP3-AF647 (BD-560045)，pSTAT5-PE Cy7 (Invitrogen-25-9010-42) 室温染色 1 小时，洗涤两遍后上机检测。结果如图 6A-图 6I 和表 14-16 所示。结果显示，与野生型 IL-2 相比，IL-2 突变激活 Treg 细胞内 STAT5 磷酸化的水平相近，但是激活 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T 细胞或者 CD8⁺T 细胞内的 STAT5 磷酸化水平显著降低。其中表中的数据 MFI 为所测细胞群内 STAT5 磷酸化的平均荧光强度值。

表 14 FACS 检测 IL-2 突变激活 Treg STAT5 磷酸化信号

蛋白浓度 (pM)	10000	1000	100	10	1	0.1	0.01
IL2-linker2-hFc(MFI)	3706	3498	3607	3440	2554	680	662
mut7.36-linker2-hFc(MFI)	3463	3498	3498	3139	1250	735	522
IL2-linker2-hFc(MFI)	3371	3451	3382	3619	1909	464	415
mut11.08-linker2-hFc(MFI)	3451	3440	3668	3558	1365	462	366
IL2-linker2-hFc(MFI)	3807	3731	3706	3833	1955	561	467
mut7.66-linker2-hFc(MFI)	3718	3743	3280	2323	668	544	419
mut11.31-linker2-hFc(MFI)	3570	3522	3428	2149	680	465	473

表 15 FACS 检测 IL-2 突变激活 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T 细胞 STAT5 磷酸化信号

蛋白浓度 (pM)	10000	1000	100	10	1	0.1
IL2-linker2-hFc(MFI)	1601	1370	1130	612	377	333
mut7.36-linker2-hFc(MFI)	527	473	388	371	368	336
IL2-linker2-hFc(MFI)	1111	960	833	485	362	370
mut11.08-linker2-hFc(MFI)	718	584	496	382	355	354
IL2-linker2-hFc(MFI)	1532	1361	1205	789	529	501
mut7.66-linker2-hFc(MFI)	592	564	481	496	496	501
mut11.31-linker2-hFc(MFI)	612	582	557	481	481	467

表 16 FACS 检测 IL-2 突变激活 CD8⁺ T 细胞 STAT5 磷酸化信号

蛋白浓度 (pM)	10000	1000	100	10	1	0.1
IL2-linker2-hFc(MFI)	973	413	274	221	233	239
mut7.36-linker2-hFc(MFI)	270	264	245	247	259	236
IL2-linker2-hFc(MFI)	758	381	321	260	270	288
mut11.08-linker2-hFc(MFI)	336	295	296	281	286	294
IL2-linker2-hFc(MFI)	910	481	372	361	344	339
mut7.66-linker2-hFc(MFI)	326	344	319	331	343	346
mut11.31-linker2-hFc(MFI)	311	324	346	327	326	317

实施例 10 IL-2 突变对 T 细胞增殖水平的调节作用

将冷冻的 PBMC 复苏,细胞重悬于 RPMI-1640(购自 Gibco,货号 A10491-01)含 10% FBS (购自 Gibco,货号 10099-141C)中,加入预包被有 100ng/ml 的 CD3 抗体(购自 BD,货号 566685)的六孔板中培养两天。收集细胞,用 PBS 缓冲液(购自 Hyclone,货号 SH30256.01)洗涤三次,重悬在 RPMI-1640 加 10%FBS 的培养基中,在六孔板中培养五天。收集细胞,用 PBS 缓冲液洗涤一次,用 Celltrace Violet(购自 Invitrogen,货号 C34557)染色,加培养基洗涤一次,用培养基重悬,24 孔板每孔加入 900ul 细胞,加 100ul 的 IL2 突变蛋白样品,培养七天。收集细胞,用含 1%BSA(购自生工,货号 A500023-0100)的 PBS(购自生工,货号 B548117-0500)重悬,细胞加入 96 孔板中。

用 BV605-CD8(购自 Biolengend,货号 344742)室温染色 30 分钟,含 1%BSA 的 PBS 洗涤。每孔加入 200ul 固定液(购自 eBioscience,货号 00-5523-00),4°C固定半小时,用含 1%BSA 的 PBS 洗涤,每孔加入 200ul 破膜液液(购自 eBioscience,货号 00-5523-00),4°C破膜半小时,1%BSA 的 PBS 洗涤。加入抗体 APC-CY7-CD3(购自 Biolengend,货号 344818),CD25 抗体(购自 Biolengend,货号 302606),Foxp3 抗体(购自 ThermoFisher#17-4777-42),室温染色半小时。用含 1%BSA 的 PBS 洗涤,将样品重悬在 200ul 的含 1%BSA 的 PBS 中,FACS(FACS Canto II,购自 BD 公司)检测和分析结果。结果如图 7A-7F 和表 17-19 所示。结果显示:与野生型 IL-2 相比,IL-2 突变对 Treg 细胞的增殖水平影响相近,但是对 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞或者 CD8⁺CD25⁺T 细胞细胞的增殖水平影响略微降低。其中表中的数据 MFI 为所测细胞群 Celltrace Violet 的平均荧光强度值,增殖后细胞内 Celltrace Violet 的平均荧光强度值降低,即,同样的检测时间内,细胞增殖越快,倍增数越多时,检测到的荧光强度平均值越低。

表17 FACS检测IL-2突变激活Treg细胞增殖

蛋白浓度(nM)	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001
IL2-linker2-hFc(MFI)	1995	1670	2857	3362	3624	3863	4518
mut7.36-linker2-hFc(MFI)	1823	1407	2070	3162	3555	4077	4389
mut7.66-linker2-hFc(MFI)	1583	1437	2068	3384	4392	4027	4887
IL2-linker2-hFc(MFI)	1807	1838	2651	3319	3459	3691	4758
mut11.08-linker2-hFc(MFI)	1633	1536	1884	2371	2930	3369	3953
mut11.31-linker2-hFc(MFI)	1735	1855	1985	2669	2626	3379	4323

表18 FACS检测IL-2突变激活CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T细胞增殖

蛋白浓度(nM)	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001
IL2-linker2-hFc(MFI)	1653	2058	2216	3198	4578	5274	5602
mut7.36-linker2-hFc(MFI)	2361	2372	3317	4169	4971	5319	5815
mut7.66-linker2-hFc(MFI)	2258	2524	3160	4633	5374	5495	6022
IL2-linker2-hFc(MFI)	1679	1838	2055	2728	3997	4826	5314
mut11.08-linker2-hFc(MFI)	2254	2166	2538	3372	4154	5072	5391
mut11.31-linker2-hFc(MFI)	2332	2559	2885	3878	4779	5284	5509

表19 FACS检测IL-2突变激活CD8⁺CD25⁺T细胞增殖

蛋白浓度(nM)	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001
IL2-linker2-hFc(MFI)	1128	1422	1696	3303	4907	5767	6303
mut7.36-linker2-hFc(MFI)	1955	1921	2640	3732	4917	5562	6179
mut7.66-linker2-hFc(MFI)	1820	1983	2683	4038	5539	5553	6617
IL2-linker2-hFc(MFI)	1064	1236	1435	2497	4087	5010	5715
mut11.08-linker2-hFc(MFI)	1876	1682	1956	2965	4124	5195	5567
mut11.31-linker2-hFc(MFI)	1750	1945	2252	3463	4610	5406	5583

实施例 11 IL-2 突变对 NK 细胞增殖水平的调节作用

用 NK 分选试剂盒（购自 Miltenyi Biotec，货号 130-092-657）将 NK 细胞分选并计数，重悬在 MEM 培养基（购自 Gibco，货号 12634-010），培养基中含 25%牛血清（购自 Gibco，货号 10099-141C）、0.2mM 肌醇（购自 Sigma Aldrich，货号 I7508-50G）、0.1mM β-巯基乙醇（购自 Sigma Aldrich，货号 M3148-100ML）、0.02mM 叶酸（购自 Sigma Aldrich，货号 F8758-5G）。将细胞种入 96 孔板，每孔加入 Fc blocker（购自 Biolengend，货号 422302），再加入 IL2 突变蛋白培养三天。在最后 18 小时加入 BrdU（购自 Biolengend，货号 423401）。收集细胞，用 1%BSA 的 PBS 洗涤并重悬，用等体积 4%多聚甲醛（购自 DingGuo，货号 AR-0211）室温固定 30 分钟，用 1%BSA 的 PBS 洗涤，用 0.5% Triton-X 100(购自 ThermoFisher，货号 HFH10) 室温破膜 15 分钟，用 1%BSA 的 PBS 洗涤，加入 DnaseI（购自 Sigma Aldrich，货号 D4513-1VL）37°C 消化一小时。用 1%BSA 的 PBS 洗涤并重悬，加入 APC anti-BrdU 抗体（购自 Biolengend，货号 339808）室温染色二十分钟，用 1%BSA 的 PBS 洗涤，将样品重悬在 200μl 的 1%BSA 的 PBS 中，FACS（FACS Canto II，购自 BD 公司）检测和分析结果。结果如图 8 和表 20 所示。结果显示：与野生型 IL-2 相比，IL-2 突变对 NK 细胞的增殖水平显著降低。其中表中的数据为所测 NK 细胞群 BrdU 阳性细胞比例。

表20 FACS检测IL-2突变激活NK细胞增殖

蛋白浓度(nM)	100.00	33.33	11.11	3.70	1.23	0.41	0.14	0.05
IL2-linker2-hFc(APC+%)	13.9	12.0	12.9	14.3	11.4	8.5	9.1	4.0
mut7.36-linker2-hFc(APC+%)	7.7	5.6	7.0	4.6	4.8	3.2	3.5	3.6
mut7.66-linker2-hFc(APC+%)	2.6	5.3	3.9	5.6	5.6	3.8	4.3	3.8
mut11.08-linker2-hFc(APC+%)	9.1	12.3	7.2	5.3	6.3	4.8	4.2	3.2

实施例 12 野生型小鼠皮下给药的 PD（药效动力学）结果

采用Balb/c小鼠，雌性，6-8周龄，购自维通利华。Fc-linker-IL2_V91K、mut11.08-linker2-hFc 蛋白，PBS稀释，小鼠背部皮下给药，给药体积为200μL/只，之后在不同时间点收取小鼠全血及脾脏样本，用于FACS检测。Fc-linker-IL2_V91K序列如SEQ ID NO:60所示，纯化方法参照实施例2。

PKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSAPTSSST
KKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE
VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
(SEQ ID NO:60)。

2 mL EDTA/2K抗凝管 (新康医疗, 货号X424)中收集小鼠全血, 上下混匀血样及抗凝剂, 使其充分接触。将300 μ L全血转入FACS管中, 每管加入染色抗体的混合液, 室温、避光孵育20 min。随后在管中加入红细胞裂解液1 mL/样品 (Hybri-Max, 货号R7757-100mL), 室温、避光, 静置5 min, 见絮状物质, 20°C, 400 g, 离心6 min, 弃去上清, 打散细胞。重复进行红细胞裂解。洗细胞: PBS 4 mL/样品重悬细胞, 4°C, 500 g, 离心6 min, 弃去上清, 打散细胞。加固定液, 500 μ L/管, 一滴滴加入, (点震) 每次加入后间歇震动FACS管, 于4°C固定一小时或者固定过夜。

取小鼠脾脏, 70 μ m细胞滤网上碾磨 (Falcon Corning, 货号352350), 500 g离心, 每个脾脏加入3 mL红细胞裂解液, 裂解5 min, 加入20 mL PBS终止裂解, 500 g离心5 min, 加入5 mL PBS重悬细胞, 过70 μ m细胞筛。细胞计数, 每个FACS管加入 1×10^6 个细胞。加Fc blocker 5 μ L/管 (Biolengend, 货号156603), 涡旋振荡器上震荡, 4°C孵育20 min, 每10 min震荡一次。加4 mL/管FACS洗液 (PBS+1% BSA), 4°C, 400 g, 离心6 min。倒掉上清, 用吸水纸吸干管口。加入Anti-Mouse CD3e (BD Bioscience, 货号740014)、Anti-Mouse CD4 (BD Bioscience, 货号553407)、anti-mouse CD25 (Biolengend, 货号102008), 震荡一次, 4°C孵育20 min, 每10 min震荡一次。加4 mL/管FACS洗液, 4°C, 400 g, 离心6 min。倒掉上清, 用吸水纸吸干管口, 涡旋振荡器上震荡一次。加固定液, 500 μ L/管, 一滴滴加入, (点震) 每次加入后间歇震动FACS管, 于4°C固定一小时或者固定过夜。

固定液: Set3901 (eBioscience, 货号00-5523-00)中Fixation/Permeabilization Concentrate 一份, Fixation/Permeabilization Diluent 三份, 1: 3混合配置成固定液。

Permeabilization buffer 1份+9份dd H₂O配制成穿核液, 震荡混匀。2 mL/管, 4°C, 500 g, 离心6 min, 倒掉上清, 吸干管口。重复, 加穿核液3 mL/管。加Foxp3抗体 (eBioscience, 货号25-5773-82), 10 μ L/管, 4°C, 40 min, 每20 min震荡一次。加4 mL/管FACS洗液, 4°C, 500 g, 离心6 min。倒掉上清, 用吸水纸吸干管口, 涡旋振荡器上震荡一次。加FACS洗液100 μ L/管, 重悬上机。各组动物Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)、CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻、CD3⁺CD4⁻T细胞占比均用平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SEM) 表示, 并用Graphpad Prism 5软件作图分析。

实验结果如图9A-图9C、图10A-10C所示，1 mpk单次皮下给药，mut11.08-linker2-hFc显著提高小鼠脾脏及外周血Treg占比，CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞占比降低，CD3⁺CD4⁺T细胞变化不显著。mut11.08-linker2-hFc表现优于Fc-linker-IL2_V91K。

实施例 13 野生型小鼠 DTH (delayed-type hypersensitivity) 模型

致敏阶段 3 mg/mL KLH (Sigma, 货号 H7017-50 mg): IFA (Sigma, 货号 F5506-10 mL): CFA (Sigma, 货号 F5581-10 mL) 体积比为 1: 1: 1, 用连通管注射器法将抗原乳化, 大约 1 h 左右, 可使抗原充分乳化形成粘稠的乳剂。每只小鼠 100 μ L 乳化剂, 即注射 100 μ g KLH。每只小鼠肩胛骨中间部位分两点皮下注射乳化的 KLH, 每点注射 50 μ L。同时将 WT IL-2-linker2-hFc (简称 WT IL-2, 参见 SEQ ID NO: 12)、Fc-linker-IL2_V91K、mut11.08-linker2-hFc 蛋白给与皮下注射, 剂量为 1 mpk, 200 μ L/只鼠, 每 3 天一次, 作为 WT IL-2 组、Fc-linker-IL2_V91K 组、mut11.08-linker-hFc 组; 将环孢菌素 (Cyclosporin A, CsA, Sigma, 货号 F5581-10 mL) 给与腹腔注射, 剂量为 10 mpk, 200 μ L/只鼠, 每天一次, 作为 CsA 组; 腹腔注射 PBS, 作为 vehicle 组。

致敏后第五天进行刺激。10 mg/mL KLH 用 PBS 10 倍稀释为 1 μ g/ μ L, 每只小鼠右耳皮内注射 10 μ L, 即注射 10 μ g KLH, 左耳皮内注射 10 μ L PBS 作为对照。

致敏前, 螺旋测微器 (0-25 mm, 精度 0.001, 购自南京苏测计量仪器有限公司) 测量每只小鼠左右耳片厚度, 做好记录。刺激前, 螺旋测微器测量每只小鼠左右耳片厚度, 作为本底值。刺激后, 在 24 h、48 h、72 h、96 h 测定耳片厚度一次。各组动物体重及耳厚变化均用平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SEM) 表示, 并用 Graphpad Prism 5 软件作图分析。

实验结果如图11A所示, 1 mpk单次皮下给药, 与vehicle组相比, WT IL-2 给药组小鼠 Δ 耳厚没有明显变化, 而mut11.08-linker2-hFc给药组小鼠 Δ 耳厚变小, 表现出抑炎作用, 且抑炎作用优于Fc-linker-IL2_V91K及CsA。如图11B所示, 各组动物体重没有明显变化。

第二轮实验结果如图 12A 所示, Fc-linker-IL2_V91K 1 mpk 单次皮下给药, mut11.08-linker2-hFc 使用 0.04、0.2、1、5 mpk 四个剂量进行单次皮下给药。mut11.08-linker2-hFc 的抑炎作用呈现剂量依赖; mut11.08-linker2-hFc 0.2 mpk 与 Fc-linker-IL2_V91K 1 mpk 作用相当, 该条件下体重均无异常; mut11.08-linker2-hFc 5 mpk 时小鼠体重出现波动及下降, 其他组体重无异常, 详见图 12B。

实施例 14 PBMC 小鼠皮下给药的 PD 结果

采购 NOG 小鼠, 雌性, 11-12 周龄, 购自维通利华。在 Day-1 复苏 PBMC 并添加 CD3 (购自 eBioscience, 货号 16-0037-85/2106800, 终浓度为 12.5 ng/mL) 和 CD28 (购自

eBioscience, 货号 16-0289-85/2073954, 终浓度为 25 ng/mL) 活化, 置于 37°C 5% CO₂ 培养箱中过夜培养 16 h。在 Day0 收集 PBMC (20×10⁶ 个/鼠, 400μL) 尾静脉接种于 NOG 小鼠体内, 然后根据体重随机分为对照组 PBS, mut11.08-linker2-hFc 组 (0.3 mpk, 1 mpk), Fc-linker-IL2_V91K 组 (0.3 mpk, 1 mpk) 共 5 组, 每组 3 只, 并开始 (Day0) 颈部皮下注射药物, 单次给药。在给药后 Day3, 安乐死小鼠取脾, 用于流式检测, 并记录数据。各组动物 Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺)、Tcon (CD4⁺CD25⁻)、CD8⁺T 细胞的数目及变化倍数用 Graphpad Prism 8 软件作图分析。

实验结果如图 13A-13B、图 14A-14C 所示, 1 mpk 单次皮下给药, mut11.08-linker2-hFc 在给药后 3 天表现出提高 Treg/Tcon、Treg/CD8⁺T 比例, 并且呈剂量依赖, 提高占比优于 Fc-linker-IL2_V91K。给药后 3 天除 Treg 数量显著变化外, Tcon 有增加趋势但不显著, CD8⁺T 细胞数量没有显著变化。

实施例 15 PBMC 小鼠移植抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)模型

采购 NOG 小鼠, 雌性, 13-14 周龄, 购自维通利华。操作方式同实施例 14, 根据体重将 NOG 小鼠随机分为 G1 组 (PBS, 未接种活化的 PBMC, 3 只), G2 组 (PBS, 10 只), G3 组 (按 0.2mpk 给药 mut11.08-linker2-hFc, 10 只), 共 3 组, 其中 G2 组和 G3 组参照实施例 14 接种活化的 PBMC。开始 (Day0) 颈部皮下注射药物, 单次给药。每周 2 次称重, 待出现 GVHD 特征后开始评分【评分体系: 体重减少 (0 分 <10%, 1 分 10%-20%, 2 分 >20%, 3 分 >30%); 贫血 (0 分 红色或粉红色的尾; 1 分 白色的尾); 姿势 (0 分 正常, 1 分 驼背); 一般活动 (0 分 正常, 1 分 受限); 脱毛 (0 分 无脱毛, 1 分 脱毛) 和黄疸 (0 分 白色或红色的尾, 1 分 黄色的尾); 最大疾病严重程度或死亡对应于 8 分】并记录数据。注: 1. 如小鼠属于最大疾病严重程度评分其他症状将不评分; 2. 死亡小鼠死亡后一直评分到实验结束。

结果如图 15A-15B 所示, PBMC 接种 Day13 后 G2 组体重下降, GVHD 症状在该组提前发生; PBMC 接种 Day17 后 G3 组体重下降, 整体下降幅度不及 G1, 且发生时间较 G2 组晚, 符合预期, mut11.08-linker2-hFc 有效抑制小鼠发生 GVHD。通过体重评估可见 mut11.08-linker2-hFc 在 0.2 mpk 给药剂量无毒副作用, 且表现出较好的抗 GVHD 能力。同时 G3 组动物死亡率和 GVHD 评分都低于 G2 组, 有显著差异。

实施例 16 小鼠药代动力学

本实施例血药浓度检测方法如下所示: 以 1μg/mL hIL2R alpha (百普赛斯, 货号 ILA-H52H9-100μg) 蛋白包被, 在空白小鼠血清中以药物配制标准曲线, 浓度范围为

500-3.90625 ng/mL, 同时配制高中低三个浓度的质控品, 所有待测样品、标准品及质控品用稀释液稀释 40 倍后以 100 μ L 复孔入板(待测样品根据实际情况可进行额外稀释), 再加入 10000 倍稀释的检测抗体 Peroxidase AffiniPure Mouse Anti-Human IgG, Fc fragment specific (Jackson, 货号 209-035-098), 最后加入 100 μ L TMB 显色液显色, 50 μ L 1 M 硫酸终止读数。

野生型小鼠皮下给药, 剂量为 1 mpk, 检测小鼠血药浓度。两次结果如图 16A-16B 和表 21-22 所示, mut11.08-linker2-hFc 暴露量均高于对照 Fc-linker-IL2_V91K (4-6 倍), Tmax 较 Fc-linker-IL2_V91K 延后。1 mpk 单次皮下给药, mut11.08-linker2-hFc 暴露量高于 mut11-linker2-hFc。

表 21 野生型小鼠单次皮下给药后的药代动力学参数

Mean	T1/2(h)	Tmax(h)	Cmax(ng/mL)	AUClast(h*ng/mL)
Fc-linker-IL2_V91K	NA	6.00	1430.94	28208.77
mut11-linker2-hFc	NA	12.00	1843.32	43254.14
mut11.08-linker2-hFc	NA	24.00	4433.17	139652.97

表 22 野生型小鼠单次皮下给药后的药代动力学参数

Mean	T1/2(h)	Tmax(h)	Cmax(ng/mL)	AUClast(h*ng/mL)
Fc-linker-IL2_V91K	NA	6.00	1628.30	42874.91
mut11.08-linker2-hFc	11.51	24.00	5391.62	177902.19

野生型小鼠静脉给药, 剂量为 1 mpk, 检测血药浓度。结果如图 17 和表 23 所示, mut11.08-linker2-hFc 暴露量高于对照 Fc-linker-IL2_V91K, 但与皮下注射相比, 差异变小(Cmax 3 倍 $\rightarrow$ 1.3 倍, AUC 4 倍 $\rightarrow$ 2.4 倍)。mut11.08-linker2-hFc 暴露量高于 mut11-linker2-hFc, 但与皮下注射相比, 差异变小(Cmax 2.4 倍 $\rightarrow$ 1.2 倍, AUC 3.2 倍 $\rightarrow$ 1.6 倍)。

因此, 皮下给药 mut11.08-linker2-hFc 的生物利用度优于 Fc-linker-IL2_V91K 及 mut11-linker2-hFc。稳定性突变提高药物的暴露量以及生物利用度。

表 23 野生型小鼠单次静脉给药后的药代动力学参数

Mean	T1/2(h)	Tmax(h)	Cmax(ng/mL)	AUClast(h*ng/mL)
Fc-linker-IL2_V91K	7.35	0.08	14518.61	92522.67
mut11-linker2-hFc	5.27	0.08	15450.84	138450.96
mut11.08-linker2-hFc	8.41	0.08	18761.22	217851.01

PBMC 接种小鼠, 方法如实施例 14, 皮下给药, 剂量为 1 mpk, 检测小鼠血药浓度。结果如图 18 和表 24 所示, PBMC 小鼠中 1 mpk 单次皮下给药, mut11.08-linker2-hFc 的暴露量

具有明显优势，为 Fc-linker-IL2_V91K 暴露量的 5-8 倍，Tmax 较 Fc-linker-IL2_V91K 延后。

表 24 PBMC 小鼠单次皮下给药后的药代动力学参数

Mean	T1/2(h)	Tmax(h)	Cmax(ng/mL)	AUClast(h*ng/mL)
Fc-linker-IL2_V91K	12.29	12.00	2338.82	99848.69
mut11.08-linker2-hFc	43.06	24.00	7405.26	546719.71

实施例 17 食蟹猴药代动力学及 PD 结果

本实施例食蟹猴血药浓度检测方法如下所示：1μg/mL 包被 hIL2R alpha 蛋白（百普赛斯，货号 ILA-H52H9-100μg），在空白食蟹猴血清中以药物配制标准曲线，浓度范围为 15-0.11718 ng/mL，同时配制高中低三个浓度的质控品，所有待测样品、标准品及质控品用稀释液稀释 5 倍后以 100μL 复孔入板（待测样品根据实际情况可进行额外稀释），后加入 1000 倍稀释的检测抗体 Goat Anti-Human IgG, Monkey ads-BIOT (SoutherBiotech, 货号 2049-08)，再加入 5000 倍稀释的 Streptavidin-HRP (Thermo, 货号 21126)，最后加入 100μL TMB 显色液显色，50μL 1 M 硫酸终止读数。食蟹猴空白血清：上海禾开生物制药有限公司。

4 只食蟹猴，按 0.05mpk 的剂量皮下给药 IL-2，其中 1 只给药 WT IL-2-linker2-hFc（简称 WT IL-2，参见 SEQ ID NO:12），1 只给药 Fc-linker-IL2_V91K，2 只给药 mut11.08-linker2-hFc（分别简称为 Mut11.08-1 和 Mut11.08-2），并检测给药后的血药浓度。结果如图 19 和表 25 所示，0.05 mpk 剂量下，终末半衰期 WT IL-2 分子较长，Fc-linker-IL2_V91K 和 mut11.08-linker2-hFc 近似。Cmax 和 AUC 排序为 mut11.08-linker2-hFc>Fc-linker-IL2_V91K >WT IL-2。

表 25 食蟹猴单次皮下给药后的药代动力学参数

mean	T1/2(h)	Tmax(h)	Cmax(ng/mL)	AUClast(h*ng/mL)
WT IL-2	204.97	4.00	57.70	1564.86
Fc-linker-IL2_V91K	13.20	24.00	125.07	4669.24
mut11.08-1	11.05	24.00	185.40	8165.21
mut11.08-2	11.80	24.00	355.50	15033.23

为检测 mut11.08-linker2-hFc 单次皮下给药对食蟹猴 Treg 细胞的扩增作用，共取 4 只食蟹猴。1 只给药 WT IL-2-linker2-hFc，1 只给药 Fc-linker-IL2_V91K，另外 2 只给药 mut11.08-linker2-hFc。剂量为 0.05 mpk，一次皮下给药。在给药前以及给药后 Day1、3、5、7、10、14 取食蟹猴外周血。不同时间点取 2 mL 食蟹猴血液，从中分离出 PBMC 并冻存。各时间点分别取一支冻存的 PBMC，一同进行复苏检测。将复苏的 PBMC 用 1 mL 染色液 Staining Buffer（含 2% FBS 的 DPBS 缓冲液）重悬后，各取 200 μL 转移至两块 96 孔 V 底板

中, 标记为 Panel 1 和 Panel2。两块板用 DPBS 洗一遍后, 加入 Live/Dead Fixable Near-IR 染色 (Thermo, 货号 L34976) 20 分钟。染色结束用 Staining Buffer 终止后, 加入 Human TruStain FcX (Biolegend, 货号 422302) 孵育 20 分钟。随后两块板分别加入不同的荧光抗体混合液进行染色 30 min, Panel 1 为 BV605 Mouse Anti-Human CD3 (BD, 货号 562994)、PerCP-Cy5.5 Mouse Anti-Human CD4 (BD, 货号 552838)、FITC Mouse Anti-Human CD8 (Biolegend, 货号 301050)、BV421 Mouse Anti-Human CD25 (Biolegend, 货号 302630) 稀释至 Brilliant stain buffer (BD, 货号 563794), Panel 2 为 BV605 Mouse Anti-Human CD3、PerCP-Cy5.5 Mouse Anti-Human CD4、FITC Mouse Anti-Human CD8、Brilliant Violet 421 anti-human CD16 (Biolegend, 货号 302038) 稀释至 Brilliant stain buffer。染色结束用 Staining Buffer 洗一遍后, 用 Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set 试剂 (eBioscience, 货号 00-5523-00) 盒进行固定破膜。然后两块板分别加入不同的荧光抗体混合液进行染色 45 min, Panel 1 为 PE anti-human FOXP3 (Biolegend, 货号 320208) 和 Ki67 Monoclonal Antibody APC (eBioscience, 货号 17-5698-82) 稀释至 Permeabilization Buffer, Panel 2 为 Ki67 Monoclonal Antibody APC 稀释至 Permeabilization Buffer。染色结束用 Permeabilization Buffer 洗一遍后, 用 400 μ L Staining Buffer 将细胞重悬, 用流式定量收取 200 μ L 样品进行检测。各组动物 Treg、CD4⁺Foxp3⁺、CD8⁺T、NK 细胞的数目及变化倍数用 Graphpad Prism 9 软件作图分析。

实验结果如图 20A-20F 所示, 0.05 mpk 单次皮下给药, mut11.08-linker2-hFc 显著提高食蟹猴外周血 Treg 数目及占比。根据 Treg/CD4⁺T 比例, mut11.08-linker2-hFc 具有 Treg 偏向性, 且 Treg 占比约为 Fc-linker-IL2_V91K 的 2 倍。mut11.08-linker2-hFc 对比 Fc-linker-IL2_V91K 对 Treg 的增殖能力更高 (11.08 vs Fc-linker-IL2_V91K = 79/55 vs 18), Fc-linker-IL2_V91K 优于 WT (18 vs 9.5)。从 Treg 活化标志物分析, 其中 Ki67⁺ Treg% 不同分子给药后区分度不大。Treg 活化标志 Foxp3 及 CD25 的表达量显著增加, 与 Treg 增殖水平保持正相关。

实验结果如图 21A-21F 所示, 0.05 mpk 单次皮下给药, Fc-linker-IL2_V91K 给药后 FoxP3⁺CD4⁺T 变化倍数最大值在 2 倍左右, CD8⁺T 变化倍数最大值略高在 4 倍左右。mut11.08-linker2-hFc 对 FoxP3⁺CD4⁺T 的扩增强于 Fc-linker-IL2_V91K 约 2-3 倍; 对 CD8⁺T 的扩增稍弱于或类似于 Fc-linker-IL2_V91K, 强于 WT 约 1.5-2 倍。Fc-linker-IL2_V91K 给药后 NK 细胞数目变化不明显, mut11.08-linker2-hFc 对 NK 的扩增水平类似于 Fc-linker-IL2_V91K。

权 利 要 求 书

1. 一种 IL-2 突变体, 其中, 与野生型 IL-2 相比, 所述 IL-2 突变体包括发生在 Q13、L18、G27、Y31、A73、H79、P82、I89、N90、V91、V93、F117 或 R120 的一个或多个突变。

2. 根据权利要求 1 所述的 IL-2 突变体, 其中, 所述 IL-2 突变体包括 Q13L、L18I、G27W、Y31V、A73L、H79Q、P82L、I89L、N90Y、V91A、V93I、F117W 或 R120F 的一个或多个突变。

3. 根据权利要求 1 所述的 IL-2 突变体, 其中, 所述 IL-2 突变体包括 (a) - (h) 组中至少一组突变:

(a)、Y31/A73/H79 突变; 优选地, Y31V/A73L/H79Q 突变;

(b)、Q13 突变; 优选地, Q13L 突变;

(c)、R120 突变, 优选地, R120F 突变;

(d)、L18/V91/F117 突变; 优选地, L18I/V91A/F117W 突变;

(e)、L18/I89/V93 突变; 优选地, L18I/I89L/V93I 突变;

(f)、G27/R120 突变; 优选地, G27W/R120F 突变;

(g)、P82/R120 突变; 优选地, P82L/R120F 突变;

(h)、N90/R120 突变; 优选地, N90Y/R120F 突变。

4. 根据权利要求 3 所述的 IL-2 突变体, 其中, 所述 IL-2 突变体具有如 SEQ ID NO: 2-9 任一项所示氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的 IL-2 突变体, 其中, 所述 IL-2 突变体的 T_m 值高于野生型 IL-2。

6. 根据权利要求 1-3、5 任一项所述的 IL-2 突变体, 其中, 所述 IL-2 突变体还包括选自下组的一个或多个突变: H16、D20、N88、V91 或 Q126 突变, 例如 H16E 突变, D20A、D20H 或 D20Y 突变, N88A、N88I、N88G、N88R 或 N88D 突变, V91R 或 V91K 突变, Q126L 或 Q126F 突变;

优选地, 所述 IL-2 突变体还包括选自 (i) - (iv) 中至少一组的突变:

(i)、H16 突变, 优选 H16E 突变;

- (ii)、D20 突变, 优选 D20A 突变;
- (iii)、V91 突变, 优选 V91R 突变;
- (iv)、H16/V91 突变, 优选 H16E/V91R 突变。

7. 根据权利要求 6 所述的 IL-2 突变体, 其中, 所述 IL-2 突变体包括 (a) - (n) 组中至少一组突变:

- (a)、H16/Y31/A73/H79 突变; 优选为 H16E/Y31V/A73L/H79Q 突变;
- (b)、H16/R120 突变; 优选 H16E/R120F 突变;
- (c)、H16/L18/V91/F117 突变; 优选 H16E/L18I/V91A/F117W 突变;
- (d)、H16/L18/I89/V93 突变; 优选 H16E/L18I/I89L/V93I 突变;
- (e)、H16/G27/R120 突变; 优选 H16E/G27W/R120F 突变;
- (f)、H16/P82/R120 突变; 优选 H16E/P82L/R120F 突变;
- (g)、D20/Y31/A73/H79 突变; 优选 D20A/Y31V/A73L/H79Q 突变;
- (h)、D20/R120 突变; 优选 D20A/R120F 突变;
- (i)、V91/Y31/A73/H79 突变; 优选 V91R/Y31V/A73L/H79Q 突变;
- (j)、V91/Q13 突变; 优选 V91R/Q13L 突变;
- (k)、V91/R120 突变; 优选 V91R/R120F 突变;
- (l)、V91/L18/I89/V93 突变; 优选 V91R/L18I/I89L/V93I 突变;
- (m)、H16/V91/Y31/A73/H79 突变; 优选 H16E/V91R/Y31V/A73L/H79Q 突变;
- (n)、H16/V91/L18/I89/V93 突变; 优选 H16E/V91R/L18I/I89L/V93I 突变。

8. 根据权利要求 7 所述的 IL-2 突变体, 其中, 所述 IL-2 突变体具有如 SEQ ID NO: 22-27、29-30、32-35 或 37-38 所示的氨基酸序列。

9. 根据权利要求 1-3、5 任一项所述的 IL-2 突变体, 其中, 所述 IL-2 突变体还包括选自下组的一个或多个突变: F42、Y45 或 L72 的突变; 优选 F42A、Y45A 或 L72G 突变。

10. 一种 IL-2 突变体, 其中, 与野生型 IL-2 相比, 所述 IL-2 突变体包括发生在 H16、D20 或 V91 中的一个或多个突变; 优选地, 所述 IL-2 突变体包括选自下组的突变:

(i)、H16 突变, 优选 H16E 突变;

(ii)、D20 突变, 优选 D20A 突变;

(iii)、V 91 突变, 优选 V91R 突变;

(iv)、H16/V91 突变, 优选 H16E/V91R 突变。

11. 根据权利要求 10 所述的 IL-2 突变体, 其中, 所述 IL-2 突变体具有如 SEQ ID NO: 21、28、31 或 36 所示的氨基酸序列。

12. 根据权利要求 1-3、5-7、9-10 任一项所述的 IL-2 突变体, 其中, 所述 IL-2 突变体还包括选自下组的一个或多个突变: N26、N29、N30、N71、Q11、L132、L70、P82、G27 或 F28 突变;

优选地, 所述 IL-2 突变体还包括选自下组的一个或多个突变: N26Q、N29S、N30S、N71Q、Q11C、L132C、L70C、P82C、G27C 或 F78C 突变;

更优选地, 所述 IL-2 突变体还包括 (a) - (g) 组中的至少一组突变:

(a)、N26Q 突变;

(b)、N29S 突变;

(c)、N30S 突变;

(d)、N71Q 突变;

(e)、Q11C/L132C 突变;

(f)、L70C/P82C 突变;

(g)、G27C/F78C 突变。

13. 根据权利要求 6-8、10-12 任一项所述的 IL-2 突变体, 其中, 与野生型 IL-2 相比, 所述突变体与 IL-2R $\beta\gamma$ 亚基复合物的结合能力下降; 优选地, 结合力 IL-2R $\beta\gamma$ 亚基复合物/结合力 IL-2 $\alpha\beta\gamma$ 亚基复合物下降。

14. 根据权利要求 13 所述的 IL-2 突变体, 其中, 与野生型 IL-2 相比, 所述突变体对非调节性 T 细胞或 NK (自然杀伤) 细胞的刺激能力下降, 所述刺激可选自: 胞内 STAT5 磷酸化或细胞增殖;

或者, 与非调节性 T 细胞或 NK (自然杀伤) 细胞相比, 所述突变体优先刺激外周血或 T 细胞群体中的调节性 T 细胞 (Treg); 所述优先刺激可选自: 刺激调节性 T 细胞内 STAT5 磷

酸化、刺激调节性 T 细胞增殖、提高调节性 T 细胞与非调节性 T 细胞的比率，或提高调节性 T 细胞与 NK 细胞的比率。

15. 根据权利要求 1-14 任一项所述的突变体，其中，所述突变包括缺失、插入或替换，优选为替换。

16. 根据权利要求 1-15 任一项所述的突变体，其中，所述野生型 IL-2 具有如 SEQ ID NO: 60 或 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

17. 一种融合蛋白，其中，所述融合蛋白包括第一多肽和第二多肽，其中，所述第一多肽为权利要求 1-16 任一项所述的 IL-2 突变体，所述第二多肽为非 IL-2 多肽。

18 根据权利要求 17 所述的融合蛋白，其中，所述第二多肽为 Fc、肿瘤抗原结合分子或 IL-2 受体亚基；

可选地，所述 Fc 为人 IgG Fc，例如人 IgG1 Fc；

优选地，所述人 IgG1 Fc 包括选自 (a) - (i) 组中的至少一组突变：

(a)、C220S；

(b)、N297G；

(c)、C220S 和 N297G；

(d)、A327Q；

(e)、L234A 和 L235A；

(f)、A287C 和 L306C；

(g)、A259C 和 V302C；

(h)、R292C 和 V306C；

(i)、V323C 和 I332C；

更优选地，所述人 Ig G1 Fc 具有如 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列；

可选地，所述肿瘤抗原包括：EDB-FN (extra domain of fibronectin)、Muc1、p53、FAP、GD2、EpCAM、tenascin-C、CD20、CEA、MAdCAM-1 或 WT1 (Wilms tumor protein1)；可选地，所述肿瘤抗原结合分子为抗体，例如 scFv、sdFv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv；

可选地，所述 IL-2 受体亚基为 IL-2 受体 α 亚基。

19. 根据权利要求 17-18 任一项所述的融合蛋白，其中，所述第一多肽的 C 端通过或不通过连接肽与所述第二多肽的 N 端连接；或所述第一多肽的 N 端通过或不通过连接肽与所述第二多肽的 C 端连接；

所述连接肽优选选自：(G₄S)_n、(GGNGT)_n 或 (YGNGT)_n，所述 n 选自 1、2、3、4 或 5；

更优选地，所述第一多肽的 C 端与所述第二多肽的 N 端通过连接肽(G₄S)₃ 连接。

20. 根据权利要求 17 所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白包括 SEQ ID NO: 13-20 或 SEQ ID NO: 39-56 任一项所述的氨基酸序列。

21. 一种缀合物，其中，所述缀合物包括权利要求 1-16 任一项所述突变体或权利要求 17-20 任一项所述融合蛋白，还包括缀合至所述突变体或融合蛋白的稳定剂、药物或者示踪分子，其中所述稳定剂可选自聚乙二醇，例如单甲氧基聚乙二醇。

22. 一种分离的核酸片段，其中，所述核酸片段编码权利要求 1-16 任一项所述突变体或权利要求 17-20 任一项所述融合蛋白。

23. 一种载体，其中，所述载体包括权利要求 22 所述核酸片段。

24. 一种宿主细胞，其中，所述宿主细胞包含权利要求 23 所述载体；可选地，所述宿主细胞是原核细胞或真核细胞；所述原核细胞或真核细胞可选自大肠杆菌、酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞，所述哺乳动物细胞可选自 CHO 细胞系或 HEK293 细胞系。

25. 一种制备权利要求 1-16 任一项所述突变体或权利要求 17-20 任一项所述融合蛋白的方法，其中，所述方法包括培养权利要求 24 所述宿主细胞，以及分离所述宿主细胞表达的 IL-2 突变体或融合蛋白。

26. 根据权利要求 25 所述方法制备而成的 IL-2 突变体或融合蛋白。

27. 一种药物组合物，其中，所述药物组合物包括权利要求 1-16 任一项所述突变体、权利要求 17-20 任一项所述融合蛋白、权利要求 21 所述缀合物、权利要求 22 所述核酸片段、权利要求 23 所述载体、权利要求 24 所述宿主细胞或权利要求 26 所述突变体或融合蛋白；以及药学上可接受的运载体、稀释剂或助剂；

优选地，所述药物组合物为可注射药物组合物，例如静脉注射药物组合物或皮下注射药物组合物；更优选地，每剂所述药物组合物包含能够给与受试者有效量的融合蛋白；最优选地，所述有效量为 0.001-10mpk，例如 0.001mpk、0.002mpk、0.003mpk、0.004mpk、0.005mpk、0.006mpk、0.007mpk、0.008mpk、0.009mpk、0.01mpk、0.02mpk、0.03mpk、0.04mpk、0.05mpk、0.06mpk、0.07mpk、0.08mpk、0.09mpk、0.1 mpk、0.2mpk、0.3mpk、0.4mpk、0.5mpk、0.6mpk、

0.7mpk、0.8mpk、0.9mpk、1mpk、2mpk、3mpk、4mpk、5mpk、6mpk、7mpk、8mpk、9mpk 或 10mpk。

28. 权利要求 1-16 任一项所述突变体、权利要求 17-20 任一项所述融合蛋白、权利要求 21 所述的缀合物、权利要求 22 所述核酸片段、权利要求 23 所述载体、权利要求 24 所述宿主细胞或权利要求 26 所述突变体或融合蛋白在制备药物中的用途；

优选地，所述药物为注射药物，例如静脉注射药物或皮下注射药物；

优选地，每剂所述药物包含能够给与受试者有效量的融合蛋白；最优选地，所述有效量为 0.001-10mpk，例如 0.001mpk、0.002mpk、0.003mpk、0.004mpk、0.005mpk、0.006mpk、0.007mpk、0.008mpk、0.009mpk、0.01mpk、0.02mpk、0.03mpk、0.04mpk、0.05mpk、0.06mpk、0.07mpk、0.08mpk、0.09mpk、0.1 mpk、0.2mpk、0.3mpk、0.4mpk、0.5mpk、0.6mpk、0.7mpk、0.8mpk、0.9mpk、1mpk、2mpk、3mpk、4mpk、5mpk、6mpk、7mpk、8mpk、9mpk 或 10mpk；

优选地，所述药物用于治疗自身免疫性疾病，或增生性疾病，或病毒感染；

更优选地，所述自身免疫性疾病包括类风湿关节炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮、皮肤红斑狼疮、狼疮性肾炎、IgA 肾病、干燥综合征、多肌炎、皮肌炎、硬皮病、银屑病、斑块状银屑病、斑秃、多发性硬化症、肌萎缩侧索硬化症、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、移植物抗宿主病、器官移植排斥、自身免疫肝炎、I 型糖尿病、自身免疫性血管炎、湿疹或哮喘；

更优选地，所述增生性疾病包括赘生物、实体瘤、血液瘤、恶性腹水或恶性胸水；其中，所述实体瘤可为良性或恶性，原发性或转移性，所述恶性实体瘤可为癌或肉瘤，例如，上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌、畸胎瘤、肺部肿瘤、乳头瘤病毒引起的癌、腺癌、癌肿、黑色素瘤、血管肉瘤、神经母细胞瘤、转移性肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、Merkel 细胞癌、卵巢癌、肾细胞癌、转移性肾癌、头颈癌、膀胱癌、非肌层浸润性膀胱癌；所述血液瘤可选自白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤，例如 B 细胞淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤、T 细胞大颗粒淋巴细胞白血病。

更优选地，所述病毒感染选自 HIV 感染、新型冠状病毒感染或 HPV 病毒感染。

29. 一种治疗自身免疫性疾病，或增生性疾病，或病毒感染的方法，其中，所述方法包括向受试者施用有效量的权利要求 1-16 任一项所述的 IL-2 突变体或权利要求 17-20 任一项所述的融合蛋白，或权利要求 21 所述的缀合物，或权利要求 22 所述的核酸片段，或权利要求 23 所述的载体，或权利要求 24 所述的宿主细胞，或权利要求 26 所述突变体或融合蛋白，或权利要求 27 所述的药物组合物；

优选地，施用方式为注射，例如静脉注射或者皮下注射；

优选地，所述有效量为 0.001-10mpk，例如 0.001mpk、0.002mpk、0.003mpk、0.004mpk、0.005mpk、0.006mpk、0.007mpk、0.008mpk、0.009mpk、0.01mpk、0.02mpk、0.03mpk、0.04mpk、0.05mpk、0.06mpk、0.07mpk、0.08mpk、0.09mpk、0.1mpk、0.2mpk、0.3mpk、0.4mpk、0.5mpk、0.6mpk、0.7mpk、0.8mpk、0.9mpk、1mpk、2mpk、3mpk、4mpk、5mpk、6mpk、7mpk、8mpk、9mpk 或 10mpk；

优选地，所述自身免疫性疾病包括类风湿关节炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮、皮肤红斑狼疮、狼疮性肾炎、IgA 肾病、干燥综合征、多肌炎、皮肌炎、硬皮病、银屑病、斑块状银屑病、斑秃、多发性硬化症、肌萎缩侧索硬化症、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、移植物抗宿主病、器官移植排斥、自身免疫肝炎、I 型糖尿病、自身免疫性血管炎、湿疹或哮喘；

优选地，所述增生性疾病包括赘生物、实体瘤、血液瘤、恶性腹水或恶性胸水；其中，所述实体瘤可为良性或恶性，原发性或转移性，恶性实体瘤可为癌或肉瘤，例如，上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌、畸胎瘤、肺部肿瘤、乳头瘤病毒引起的癌、腺癌、癌肿、黑色素瘤、血管肉瘤、神经母细胞瘤、转移性肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、Merkel 细胞癌、卵巢癌、肾细胞癌、转移性肾癌、头颈癌、膀胱癌、非肌层浸润性膀胱癌；所述血液瘤可选自白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤，例如 B 细胞淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤、T 细胞大颗粒淋巴细胞白血病。

30. 一种优先刺激 T 细胞群体或外周血中调节性 T 细胞的方法，其中，所述方法包括将所述 T 细胞群体或外周血与权利要求 1-16 任一项所述的 IL-2 突变体或权利要求 17-20 任一项所述的融合蛋白，或权利要求 21 所述的缀合物，或权利要求 22 所述的核酸片段，或权利要求 23 所述的载体，或权利要求 24 所述的宿主细胞，或权利要求 26 所述突变体或融合蛋白，或权利要求 27 所述的药物组合物接触；优选地，所述优先刺激包括：

(a) 与非调节性 T 细胞或 NK 细胞相比，优先刺激调节性 T 细胞的 STAT5 磷酸化；

(b) 与非调节性 T 细胞或 NK 细胞相比，优先刺激调节性 T 细胞增殖；

和/或 (c) 提高调节性 T 细胞与非调节性 T 细胞的比率，或提高调节性 T 细胞与 NK 细胞的比率。