

新型抗体-细胞因子融合蛋白及其制备方法和用途

技术领域

本申请涉及抗体-细胞因子融合蛋白及其用途。具体地，本申请涉及一种白细胞介素-2(Interleukin-2, IL-2)与抗 IL-2 抗体的融合蛋白(IL-2/IL-2 抗体融合蛋白)，所述融合蛋白不与 IL-2 受体 α 亚基(IL2R α , CD25)以及包含有 α 亚基的 IL-2 受体聚合体(即 IL2R α/β 或 IL2R $\alpha/\beta/\gamma$)结合，但能够与 IL-2 受体 β 、 γ 亚基二聚体(IL2R β/γ)结合并激活其介导的信号转导通路。本申请进一步涉及了包含该 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白的双特异性分子、免疫缀合物，以及编码该 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白的核酸分子、包含该核酸分子的表达载体和宿主细胞。本申请还提供了制备该 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白的方法、包含该 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药物组合物，以及在治疗疾病中使用该 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白或其药物组合物的方法和用途。

背景技术

白细胞介素-2(Interleukin-2, IL-2)是一种分子量约为 15.5 kDa 的球状糖蛋白，其同时具备诱导免疫抑制反应与免疫激活反应的双重功能，在调控多种免疫细胞的生成、存活、扩增和稳态中发挥着至关重要的作用。成熟 IL-2 蛋白含有 133 个氨基酸残基，由其折叠组成 4 个反平行的两亲性 α 螺旋结构，再由这 4 个 α 螺旋折叠形成其功能活性必不可少的高级结构(Smith, Science 1988, 240:1169-1176; Bazan, Science 1992, 257:410-413)。

IL-2 在体内通过与细胞表面 IL-2 受体(IL2R)结合进而触发下游的信号级联反应来发挥其免疫调控功能(Kreig, PNAS 2010, 107:11906-11911)。IL2R 存在高亲和力与中等亲和力两种组合形式，其中，高亲和力 IL2R 是由 IL-2 受体 α 链(IL2R α , CD25)、IL-2 受体 β 链(IL2R β , CD122)和共同 γ 链(γ c, CD132)组成的异源三聚体，它与 IL-2 的结合亲和力(K_D)约为 10^{-11} M；中等亲和力 IL2R 是仅由 IL2R β 和 γ c 组成的异源二聚体，其与 IL-2 的结合亲和力(K_D)约为 10^{-9} M(Wang, Science 2005, 310:1159-1163; Boyman, Nat Rev Immunol 2012, 12:180-190; Arenas-ramirez N, Trends Immunol 2015, 36:763-777)。不同的 IL2R 表达于不同的免疫细胞表面，其中高亲和力 IL2R 组成性高表达于 CD4⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞(Treg)，另外在激活的 T 细胞(CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞)上也被瞬时诱导表达；中等亲和力 IL2R 尽管在静息的(或幼稚的)效应 T 细胞(Teff)例如 CD8⁺ Teff 细胞上表达量低，但是在经历过抗原刺激的 CD8⁺ Teff 细胞和记忆表型(memory phenotype, MP)的 CD8⁺ T 细胞以及自然杀伤(NK)细胞上高表达(Fontenot, Nat Immunol 2005, 6:1142-1151; Josefowicz, Annu Rev Immunol 2012, 30:531-564; Malek & Bayer, Nat Rev Immunol 2004, 4:665-674)。

IL-2 触发的信号转导是通过结合并诱导 IL2R β 和 γ c 之间相互作用形成异源二聚体，进而激活下游多个激酶而达成的。尽管 α 亚基对于 IL-2 与 IL2R 结合亲和力的增加尤为重要，但是它在免疫细胞的信号转导中不起作用(Kreig, PNAS 2010, 107:11906-11911)。

IL-2 主要由活化的 T 细胞，尤其是 CD4⁺辅助 T (Th) 细胞产生，并以自分泌或旁分泌方式作用于表达 IL2R 的邻近细胞从而激活免疫反应或维持机体免疫系统正常调控防御机制的稳态。研究显示 IL-2 具有刺激辅助 T 细胞增殖和分化(Zhu, Annual review of immunology 2010, 28:445-489; Liao, Nat Immunol 2008, 9:1288-1296; Liao, Nat Immunol 2011, 12:551-559)，维持 Treg 细胞的发育及其稳态增殖(Cheng, Immunol Rev 2011, 241:63-76)，诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的生成并增强其细胞毒性，诱导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细胞(lymphokine-activated killer, LAK)(Liao, Immunity 2013, 38:13-25)，增强肿瘤浸润淋巴细胞(Tumor infiltrating lymphocyte, TIL)的免疫功能，促进 B 细胞的增殖和分化以及增强活化 B 细胞产生免疫球蛋白，刺激 NK 细胞的生成、增殖和活化等一系列生物学功能(Waldmann, Nat Rev Immuno 2006, 6:595-601; Malek, Annu Rev Immunol 2008, 26:453-479; Liao, Immunity 2013, 38:13-25)。

IL-2 在体内扩增上述淋巴细胞亚群，尤其通过刺激、活化效应细胞(包括 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞)来发挥抗肿瘤作用，IL-2 的这一特性使得 IL-2 免疫疗法成为治疗某些恶性肿瘤的有效手段之一。重组人 IL-2 蛋白(rhIL-2)药物阿地白介素(Aldesleukin, 商品名 Proleukin[®])已于上世纪 90 年代获批用于治疗转移性肾细胞癌和恶性黑色素瘤。阿地白介素是一种经工程化改造的 rhIL-2，其结构与天然人 IL-2 蛋白(hIL-2)的区别是：阿地白介素无糖基化修饰，缺乏 N 端丙氨酸，其第 125 位半胱氨酸被丝氨酸残基所取代。阿地白介素在治疗转移性肾细胞癌和恶性黑色素瘤的各类临床试验中的完全反应率(complete response rate)较低，约为 7%(Atkins, J Clin Oncol 1999, 17:2105-2116; Fisher, Cancer J Sci Am 2000, 6 Suppl 1:S55-S57; Klapper, Cancer 2008, 113:293-301)。究其原因主要有以下几点：(1) 由于阿地白介素在体内半衰期很短，而具有抗肿瘤活性的 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞表达的是中等亲和力 IL2R，因此需要施用高剂量的阿地白介素才能有效激活 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞。但是，高剂量阿地白介素会结合并活化表达于内皮细胞以及 II

型先天性淋巴样细胞 (Type-2 innate lymphoid cells, ILC2) 上的高亲和力 IL2R, 由此会导致血管渗漏综合征 (Vascular Leak Syndrome, VLS), 其特征是血管通透性增加, 引起血浆蛋白和血管内液外渗到血管外空间以及多个器官中, 导致血压降低和心率补偿性升高, 肺部和皮肤水肿, 以及肝细胞损伤 (Krieg, *Proc Nat Acad Sci USA* 2010, 107:11906-11911; Boyman, *Nat Rev Immunol* 2012, 12:180-190), 因此接受高剂量阿地白介素治疗的患者常出现严重的心血管事件, 以及肺、肝、胃肠道、神经和血液学毒性 (Proleukin® [aldesleukin] Package Insert, 2012)。这些治疗过程中伴随的严重毒副作用导致很多病人不能耐受临床有效剂量, 从而限制了其临床应用。(2) 阿地白介素疗法的低反应率也与 IL-2 在维持免疫细胞稳态中具有双重作用有关。IL-2 不仅会促进效应细胞激活和增殖, 同时也会通过调控 Treg 细胞来维持外周免疫耐受。由于 Treg 细胞高表达高亲和力 IL2R, IL-2 会优先与 Treg 细胞结合, 促进外周 Treg 细胞的增殖和活化, 从而抑制 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞介导的抗肿瘤免疫活性 (Fontenot, *Nat Immunol* 2005, 6:1142-1151; D'Cruz, *Nature Immunol* 2005, 6:1152-1159; Maloy, *Nature Immunol* 2005, 97:189-192; Boyman, *Nat Rev Immunol* 2012, 12:180-190; Facciabene, *Cancer Res* 2012, 72:2162-2171)。由此可见, 由于 IL-2 在免疫调控中的双重作用, 在阿地白介素疗法中活化的效应细胞的抗肿瘤免疫活性会被 IL-2 依赖性 Treg 细胞所抑制, 限制了其临床疗效。

目前, 为了增强 IL-2 疗法的抗肿瘤活性并降低其毒副作用, 多种经改造的 IL-2 变体分子正在研发中, 这些改造方案可归纳为 4 类: (1) 对 IL-2 序列中与 IL2R 各亚基结合的关键氨基酸残基进行突变, 从而降低与 IL2R α 的结合以期减弱由高亲和力 IL2R 带来的毒性和对 Treg 的激活, 或者优化与 IL2R β 和/或 γ_c 的结合以增强对 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞的增殖和活化而增强抗肿瘤活性。如 Gillies 等在 WO20080034473 专利申请中所公开的通过在 IL-2 中引入包含 R38W 和 F42K 的氨基酸突变以改变其与 IL2R α 结合的关键位点, 从而降低与 IL2R α 的相互作用, 因此降低对 Treg 细胞的激活, 减少对抗肿瘤免疫功效的抑制; Garcia 等通过在 IL-2 中引入突变而制备了名为 “IL-2 Superkine” 的变体来增强其与 IL2R β 的亲和力, 以减少 IL-2 对 IL2R α 表达的依赖, 进而诱导更强的效应细胞 (CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞) 扩增与激活 (Levin, *Nature* 2012, 484:529-533)。(2) 采用聚乙二醇 (PEG) 修饰 IL-2, 如 Nektar 公司的 Bempegaldesleukin 是由阿地白介素与平均 6 个可解离的 PEG 基团偶联而构成, 其结果不仅可延长 IL-2 的半衰期, 还能通过偶联在 IL2R α 结合位点附近赖氨酸残基上的 PEG 基团以阻碍 IL-2 与高亲和力 IL-2R 的相互作用 (Deborah H, *Clin Cancer Res* 2016, 22:680-690); 此外, Synthorx 公司开发的 THOR-707 采用了另一种方式来实现 IL-2 的 PEG 修饰, 其利用工程细菌在 IL-2 蛋白序列中融入非天然氨基酸残基, 再将不可解离的 PEG 基团偶联在非天然氨基酸残基上, 由此产生一种具有同质性的 PEG 修饰的 “非 α ” IL-2 分子, 据 Synthorx 报导该分子能够诱导外周幼稚 T 细胞和 NK 细胞的扩增, 而不会扩增 Treg 细胞 (Janku, *European Journal of Cancer* 2020, 138S2:S11)。(3) Alkermes 公司的 Nemvaleukin alfa 是由 IL-2 变体与 IL2R α (CD25) 胞外区片段融合而成, 从而阻断该候选药物与 Treg 细胞上的 IL2R α 相互作用 (Boni, *Journal of Clinical Oncology* 2021, 39:15 Suppl, 2513)。另外, Boyman 等通过 IL-2 与抗 IL-2 抗体形成抗原-抗体复合物来阻断 IL-2 与 IL2R α 的结合, 从而选择性激活表达中等亲和力 IL2R 的 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞来增强抗肿瘤活性 (Kamimura, *J Immunol* 2006, 177:306-314; Boyman, *Science* 2006, 311:1924-1927; Lee, *Oncoimmunology* 2020, 9:e1681869)。(4) Trinklein 等报道通过构建抗 IL2R β 和 γ_c 双特异性抗体, 以期达到特异性激活由中等亲和力 IL2R 介导的下游信号通路并诱导 CD8⁺ T 和 NK 细胞增殖的目的 (Harris KE, *Scientific Reports* 2021, 11:1-15)。

然而, 上述方案都有各自的缺陷, 用于阻断 IL-2 与 IL2R α 结合的结构域通常与修饰后的 IL-2 处于结合-解离的动态平衡之中, 由于高亲和力 IL2R 与 IL-2 的超强结合能力, 修饰后的 IL-2 变体并不能完全避免被高亲和力 IL2R 竞争性结合; 其次, 有些变体由于在 IL-2 序列中引入了突变而增加了免疫原性, 诱导产生的中和性抗药物抗体 (anti-drug antibodies, ADA) 不仅限制了 IL-2 产品的临床应用, 而且可能抑制内源性 IL-2 的免疫调控功能而造成潜在的安全性风险。例如, 阿地白介素是由大肠杆菌表达的无糖基化修饰蛋白, 为两性分子, 它以平均 27 个 rhIL-2 分子聚集产生的微聚集体形式存在, 在临床试验中发现 60%~75% 受试患者体内存在 ADA (Proleukin (aldesleukin) 注射液说明书); BAY 50-479 将 hIL-2 的第 88 位天冬酰胺残基突变为精氨酸 (即 N88R), 在临床 I 期研究中出现了识别该位点的 ADA (Margolin, *Clin Cancer Res* 2007, 13:3312-3319); THOR-707 中含有非天然氨基酸序列, 通常会被机体识别为外源蛋白, 并在多剂量注射后可能引发机体产生 ADA (Levin, *Nature* 2012, 484:529-533)。另一款 PEG 修饰的 IL-2 分子, NKTR-214, 尽管提供了 IL-2 在动力学上的缓慢释放, 但聚乙二醇化也会干扰 IL-2 与 IL-2R β 和 γ_c 的结合, 从而阻碍 IL-2 对抗肿瘤效应细胞的刺激 (Silva, *Nature* 2019, 565:186-191)。抗 IL2R β 和 γ_c 双特异性抗体在激活 IL2R 下游信号通路上并不能选择性区别中等亲和力 IL2R 和高亲和力 IL2R, 因此会无差别地诱导 Treg 细胞和效应细胞的激活和扩增。

因此, 本领域仍亟需开发一种能够特异性地结合中等亲和力 IL2R 以激活效应细胞 (CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞), 但不与高亲和力 IL2R 结合而激活 Treg 细胞、血管内皮细胞和 ILC2 的产品, 从而克服上述 IL-2 产品的相关缺陷, 包括现有 IL-2 疗法因与高亲和力 IL2R 结合而导致的系统性毒副作用以及因激活 Treg 细

胞而导致的肿瘤免疫抑制，以满足现有 IL-2 疗法尚未解决的临床需求。

发明内容

本申请提供了一种能够不与 IL2R α 以及包含有 α 亚基的 IL-2 受体聚合体（即 IL2R α/β 或 IL2R $\alpha/\beta/\gamma$ ）结合，只选择性地与 IL2R β/γ 结合并能激活 IL2R β/γ 受体介导的信号转导通路的新颖 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白，规避了以下技术问题以解决尚未满足的临床需求：

1、剂量限制性毒性（Dose Limiting Toxicity, DLT）问题：现有 IL-2 产品和/或在研产品在体内因为激活高亲和力 IL2R 而导致对正常组织和器官产生系统性毒副作用，例如，已上市的阿地白介素和/或现有的在研 IL-2 产品可能会激活血管内皮细胞和 ILC2 细胞上的高亲和力 IL2R，引发系统性血管渗漏综合征（VLS）。

2、Treg 细胞介导的肿瘤免疫抑制：现有 IL-2 产品和/或在研的 IL-2 产品会与肿瘤组织或肿瘤微环境中的 Treg 细胞表面高亲和力 IL2R 结合而激活 Treg 细胞并促进其增殖，进而也会促进肿瘤微环境中其他免疫抑制细胞的增殖，产生肿瘤免疫抑制作用，从而影响疗效。

3、现有 IL-2 产品和/或在研 IL-2 产品的免疫原性问题：例如，已上市的 IL-2 产品阿地白介素是由大肠杆菌表达的无糖基化修饰蛋白，且天然以微聚集物的形式存在，导致该药物在体内施用诱导产生 ADA。在研的 IL-2 产品，例如，在 IL2R α 结合位点引入氨基酸突变的 IL-2 变体，以及在 PEG 定点修饰位点引入非天然氨基酸序列的 IL-2 变体等，应用到人体内时可能会引发机体产生 ADA。针对 IL-2 和/或 IL-2 变体的 ADA 不仅会限制 IL-2 产品在临床上的应用，还有可能与内源性 IL-2 作用而引发安全性风险。

4、现有 IL-2 产品半衰期短以及治疗窗口狭窄：例如，已上市的 IL-2 产品阿地白介素的血清半衰期仅为 85 分钟，而具有抗肿瘤活性的 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞表达的是中等亲和力 IL2R，因而需要施用高剂量的阿地白介素才能激活 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞的抗肿瘤活性，但高剂量的阿地白介素会优先激活免疫抑制反应并诱发系统性毒副作用，因此阿地白介素治疗窗口极其狭窄。其它在研的 IL-2 产品尽管能够相对选择性地结合于中等亲和力 IL2R，但仍然能够与高亲和力 IL2R 结合而激活免疫抑制以及诱导系统性毒性，因此在应用于临床治疗时会限制给药剂量，导致治疗窗口狭窄，病人用药依从性较差。

5、现有 IL-2 产品和/或在研 IL-2 产品分子还存在结构不稳定或易解离（例如 IL-2 与抗 IL-2 抗体的复合物）、不易生产制备为具有良好同质性产物的问题。

一方面，本申请提供了一种人白细胞介素-2（hIL-2）变体。所述 hIL-2 变体为野生型 hIL-2（如 SEQ ID NO: 1 所示）经氨基酸突变后能够与本申请的抗 IL-2 抗体或抗原结合片段结合，并且所述突变对 IL-2 的生物学活性没有明显影响。

一方面，本申请提供了一种分离的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段能够与 IL2R α 竞争性结合本申请 hIL-2 变体并且阻断所述 hIL-2 变体与 IL2R α 的结合，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段与本申请 hIL-2 变体的结合亲和力高，不易发生解离。

一方面，本申请提供了一种新型 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其包含：

- （1）如 SEQ ID NO:1 所示的野生型人白细胞介素 2（hIL-2）或所述的 hIL-2 变体，和
- （2）与 IL2R α 竞争性结合所述 hIL-2 或所述的 hIL-2 变体的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，以及
- （3）在所述 hIL-2 或所述的 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面包含的二硫键，以避免抗原-抗体复合物的解离。

本申请提供的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白具有以下特性：

- （i）所述 hIL-2 或其变体与抗 IL-2 抗体之间形成超稳定的复合物结构；
- （ii）所述 hIL-2 或其变体的 IL2R α 结合位点包埋在所述融合蛋白的分子内部；
- （iii）不与 IL2R α 或包含有 α 亚基的 IL-2 受体聚合体（即 IL2R α/β 或 IL2R $\alpha/\beta/\gamma$ ）结合；
- （iv）保留对 IL2R β 和 γ 受体亚基二聚体（IL2R β/γ ）的结合活性和功能活性。

在一些实施方案中，所述 hIL-2 是如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2；在另一些实施方案中，所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 包含至少一个、或两个、或两个以上除突变为半胱氨酸以外的其它氨基酸突变，且该变体保留了能够与 IL2R 特异性结合的能力。在一个实施方案中，所述氨基酸突变位于所述 hIL-2 或所述变体与抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的所述抗原-抗体结合界面。在一个具体实施方案中，所述氨基酸突变位于所述抗原-抗体结合界面之内。在一个实施方案中，所述氨基酸突变位于抗原-抗体结合界面之外。在一个实施方案中，所述氨基酸突变位于所述抗原-抗体结合界面之内和之外。

在一些实施方案中，所述抗 IL-2 抗体包括抗小鼠 IL-2（mIL-2）抗体或其衍生的嵌合抗体和/或人源化抗体（例如 S4B6 抗体及其人源化抗体）、抗 IL-2 人源化抗体（例如 NARA1 抗体和 TCB2 抗体）、或抗 hIL-2 抗体。在一个实施方案中，所述抗 mIL-2 抗体或其衍生的嵌合抗体或人源化抗体或其抗原

结合片段能够与 IL2R α 竞争性结合所述 hIL-2 变体并且能够阻断所述 hIL-2 变体与 IL2R α 或包含有 α 亚基的 IL-2 受体聚合体（即 IL2R α / β 或 IL2R α / β / γ ）的结合。在一个实施方案中，所述抗 hIL-2 抗体能够特异性识别所述 hIL-2 的 IL2R α 结合位点，且能够特异性结合所述 hIL-2。

在一些实施方案中，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段与所述 hIL-2 或其变体的抗原-抗体结合界面包含二硫键，所述二硫键是通过在所述抗原-抗体结合界面的所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的序列中引入至少一个半胱氨酸残基与通过在所述抗原-抗体结合界面的所述 hIL-2 或其变体的序列中引入至少一个半胱氨酸残基所形成。在一个实施方案中，所述引入至少一个半胱氨酸残基是通过氨基酸取代或点突变、插入或添加、或其任意组合的方式引入至少一个半胱氨酸残基。

在另一个方面，本申请涉及编码本文的 hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段以及 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的分离的核酸分子（也称为“多核苷酸”），以及包含所述核酸的表达载体和包含核酸或表达载体的宿主细胞。本申请还涉及使用所述宿主细胞制备本文的 hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段以及 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的方法。

在另一个方面，本申请涉及包含本文的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的双特异性分子、免疫缀合物、嵌合抗原受体、工程化 T 细胞受体、或溶瘤病毒。

在另一个方面，本申请涉及一种药物组合物，所述药物组合物包括本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，或包含所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的双特异性分子、免疫缀合物、嵌合抗原受体、工程化 T 细胞受体、或溶瘤病毒，以及药学上可接受的载体。

在另一个方面，本申请涉及一种药盒，所述药盒包含有效量的本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，或包括本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药物组合物、和/或另一种抗癌剂和/或免疫调节剂，所述抗癌剂包括但不限于微管破坏物、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、DNA 嵌入剂、烷化剂、激素治疗物、激酶抑制剂（例如，酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于 EGFR 抑制剂、HER2 抑制剂、HER3 抑制剂、IGFR 抑制剂、PI3K 抑制剂和 Met 抑制剂）、受体拮抗剂、肿瘤细胞凋亡的激活剂（包括但不限于 IAP 抑制剂、Bcl2 抑制剂、MC11 抑制剂、TRAIL 抑制剂、CHK 抑制剂）、或任何抗血管生成的药物；所述免疫调节剂包括但不限于 PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、CTLA-4、LAG-3、CD47、CEACAM-1、CEACAM-5、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4 或 TGFR 抑制剂。

在另一个方面，本申请涉及一种试剂盒，所述试剂盒包含有效量的本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，或包括本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药物组合物。

在另一个方面，本申请涉及本文的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白在用于制备治疗疾病的药物组合物或制剂中的用途，所述疾病包括但不限于增殖性疾病或感染、免疫缺陷疾病，所述增殖性疾病包括但不限于癌症和其它细胞增殖病症。或者，本申请涉及用于治疗增殖性疾病或感染、免疫缺陷疾病的本文的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白、或包含其的药物组合物。或者，本申请涉及一种治疗增殖性疾病或感染、免疫缺陷疾病的方法，包括向有需要的受试者给予本文的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白、或包含其的药物组合物。

在另一个方面，本申请涉及一种通过提高宿主免疫响应来治疗疾病、病状或病症的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，或包含本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药物组合物，或包含本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药盒或试剂盒来特异性激活表达 IL2R β / γ 受体的效应细胞（例如，CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞）的生物学活性，从而改善疾病状况。

在另一个方面，本申请涉及一种刺激免疫系统的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，包含本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药物组合物，或包含本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药盒或试剂盒来刺激免疫系统。

在另一个方面，本申请涉及一种治疗、缓解或预防对宿主免疫系统的刺激是有益（即，通过刺激宿主免疫系统来改善疾病状况）的疾病状况的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，或包含本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药物组合物，或包含本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药物组合物。

抗体融合蛋白的药盒或试剂盒，以通过增强所述受试者细胞免疫应答来改善疾病状况，所述疾病状况包括宿主免疫应答不足或免疫缺陷，进一步所述疾病状况是增殖性疾病或感染。所述增殖性疾病包括癌症和免疫缺陷疾病。

通过下面的附图和具体实施方案进一步说明本申请，本申请所公开的其它特征和优点将是显而易见，并且这些附图和具体实施方案不应被认为限制本申请的范围，并且本领域技术人员容易想到的改变将包括在本申请的精神和所附权利要求的保护范围内。在本申请中引用的所有参考文献，包括公开出版物、专利和专利申请都通过引用的方式全文并入。

附图说明

图 1. CTLL-2 细胞株 (图 1A) 和 NK-92 细胞株 (图 1B) 对 hIL-2 变体 (hIL2-DM 与 hIL2-TM) 以及对照 (mIL-2 和 hIL-2) 的增殖响应。

图 2. ELISA 检测 S4B6 人源化抗体与抗原 mIL2-his 或 hIL2-his 的结合活性。

图 3. Fortebio 检测 hIL2 变体 hIL2-DM 结合 K2G11 后与 hIL2R α 以及 hIL2R β 的结合。

图 4. 本申请一个代表性 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白结构示意图，以及示例 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的抗原-抗体结合界面三维示意图。hIL-2 或 hIL-2 变体 C 末端通过连接子连接到 hIL-2 抗体重链 N 末端，hIL-2 或 hIL-2 变体与 hIL-2 抗体之间的二硫键 (虚线所示) 位于抗原-抗体结合界面 (图 4A)；示例性 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的 hIL-2 变体 (K64G 和 N90R) 与抗 IL-2 人源化抗体结合界面的二硫键是通过分别在 hIL-2 变体 (K64G 和 N90R) 和抗 IL-2 人源化抗体中各引入一个半胱氨酸残基所形成的 (图 4B)。

图 5. ELISA 检测含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy08 以及对照 (hIL2-DM-Fc) 分别与 hCD25 (图 5A) 和 hCD122 (图 5B) 的结合活性。

图 6. CTLL-2 细胞株 (图 6A) 和 NK-92 细胞株 (图 6B) 对含有二硫键的 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy08 以及对照 (hIL-2) 的增殖响应。

图 7. 流式细胞术检测 CTLL-2 细胞株在含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy08 以及对照 (hIL-2) 的作用下，其 IL-2 信号通路中 STAT5 磷酸化的结果图。

图 8. ELISA 检测经抗体轻链优化的含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy08 突变体以及对照 (hIL2-DM-Fc 和母本 IC-Cy08) 分别与 hCD25 (图 8A) 和 hCD122 (图 8B) 的结合活性。

图 9. CTLL-2 细胞株 (图 9A) 和 NK-92 细胞株 (图 9B) 对经抗体轻链优化的含有二硫键的 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy08 突变体以及对照 (hIL-2 和母本 IC-Cy08) 的增殖响应。

图 10. CTLL-2 细胞株 (图 10A) 和 NK-92 细胞株 (图 10B) 对经 hIL-2 氨基酸序列优化的含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy08 突变体以及对照 (hIL-2 和母本 IC-Cy08) 的增殖响应。

图 11. CTLL-2 细胞株 (图 11A) 和 NK-92 细胞株 (图 11B) 对抗体重链恒定区经 pI 突变和 TM 突变后的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy08-pITM 以及对照 (hIL-2 和母本 IC-Cy08) 的增殖响应。

图 12. ELISA 检测基于 K2G11 含二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy04、K2G11-Cy05 和 K2G11-Cy06 以及对照组 (包括 H6K3(H)-Cy08 和 H6K3(H)-Cy10) 分别与 hCD25 (图 12A) 和 hCD122 (图 12B) 的结合活性。

图 13. CTLL-2 细胞株 (图 13A) 和 NK-92 细胞株 (图 13B) 对基于 K2G11 含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy04、K2G11-Cy05 和 K2G11-Cy06 以及对照 (包括 H6K3(H)-Cy08、H6K3(H)-Cy10、以及 K2G11 与 hIL2-DM(Δ 3, C125L) 形成的抗原-抗体复合物) 的增殖响应。

图 14. Fortebio 检测 K2G11-Cy05 与 hIL2R α 、hIL2R α/β 及 hIL2R $\alpha/\beta/\gamma$ 的结合。

图 15. ELISA 法检测含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 (K2G11-Cy05) 以及对照 (NARAIleukin) 与 hCD25 的结合活性。

图 16. 利用报告基因法 (图 16A) 和细胞增殖法 (CTLL-2 细胞株和敲除 CD25 的 NK-92 【NK-92 (CD25-KO)】细胞株，图 16B) 分别检测含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 (K2G11-Cy05) 以及对照 (NARAIleukin 和野生型 hIL-2) 激活 IL2R $\alpha/\beta/\gamma$ 和/或 hIL2R β/γ 受体的活性。

图 17. ForteBio 检测重链恒定区包含 pI 突变和 TM 突变的抗 IL-2 人源化抗体 (K2G11-pITM) 以及基于此所构建的含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 (K2G11-Cy05)，与对照抗体 (K2G11) 分别与 Fc 受体、C1q 以及 FcRn 的结合动力学。

图 18. 报告基因方法检测抗体恒定区引入 pI 突变和 TM 突变的含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 (K2G11-Cy05) 的 ADCC 活性，该检测以抗 EGFR 抗体 (即西妥昔单抗) 作为阳性对照组。

图 19. hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 (K2G11-Cy04 和 K2G11-Cy05) 经食蟹猴血清 (M6、M7) 或健康人

血清 (H2、H3) 孵育处理不同时间后, 利用 NK-92 细胞增殖法 (图 19A 和图 19B) 以及报告基因法 (图 19C) 分别检测样品的生物学活性变化, 图中标记为 K2G11-Cy04 和 K2G11-Cy05 的曲线表示未经血清处理的对照样品。

图 20. 具有重链恒定区工程化改造的抗 IL-2 抗体 K2G11-pITM 和重链恒定区未经工程化改造的抗 IL-2 抗体 K2G11 在 BALB/c 小鼠体内的药时曲线图。

图 21. 流式细胞术检测在接受具有重链恒定区工程化改造的含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy05 给药后, 食蟹猴外周血样中 CD8⁺ T、NK 和 Treg 细胞的数量及其增殖标志物 Ki-67 的表达 (即 Ki67⁺ 细胞比例) 的变化。图示中的箭头表示给药时间点。

图 22. 流式细胞术检测在接受具有重链恒定区工程化改造的含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy05 给药后, C57BL/6 小鼠脾脏中 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg 细胞数、CD8⁺CD44^{high} T 细胞数、NK1.1⁺ 细胞数的变化 (图 22A), 常规 CD4⁺ T 细胞数的变化 (图 22C), 以及 CD8⁺CD44^{high} T 细胞与 Treg 细胞绝对计数比和 NK1.1⁺ 细胞与 Treg 细胞绝对计数比的变化 (图 22B), 和各给药组小鼠的体重的变化 (图 22D)。

图 23. 不同剂量下的具有重链恒定区工程化改造的含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy05 及其对照分子 NARA1leukin 在小鼠 CT26 结肠癌模型中的抗肿瘤活性。

图 24. ELISA 法检测含有二硫键的 hIL-2/NARA1 抗体融合蛋白以及对照分子 (hIL2-DM-Fc) 分别与 hCD25 (图 24A) 和 hCD122 (图 24B) 的结合活性。

图 25. ELISA 法检测含有二硫键的 hIL-2/TCB2 抗体融合蛋白以及对照分子 (hIL2-DM-Fc) 分别与 hCD25 (图 25A) 和 hCD122 (图 25B) 的结合活性。

图 26. CTLL-2 细胞株 (图 26A) 和 NK-92 细胞株 (图 26B) 对含有二硫键的 hIL-2/NARA1 抗体融合蛋白以及对照分子 (野生型 hIL-2) 的增殖响应。

图 27. CTLL-2 细胞株 (图 27A) 和 NK-92 细胞株 (图 27B) 对含有二硫键的 hIL-2/TCB2 抗体融合蛋白以及对照分子 (野生型 hIL-2) 的增殖响应。

发明详述

定义

除非另有定义, 否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本领域一般技术人员通常所理解的含义相同的含义。为了本申请的目的, 下文定义以下术语。

在本文中, “白细胞介素-2 (Interleukin-2)” 或 “IL-2” 或 “IL2” 可以互换使用, 是指来自任何脊椎动物, 包括哺乳动物如灵长类 (例如人) 和啮齿动物 (例如小鼠) 的任何天然的 IL-2。该术语包括未加工的 IL-2 以及源自细胞表达的任何形式的 IL-2。该术语还包括天然存在的 IL-2 等位基因变体和剪接变体、同种型、同源物和物种同源物。本文所述的人 IL-2 (hIL-2) 是指成熟的人 IL-2 蛋白, 也称为 “野生型 hIL-2” 或 “野生型 IL-2” 或 “WT IL-2”, 其具有以下氨基酸序列的多肽:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVL
NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIHSTLT (SEQ ID NO:1)

未经加工的人 IL-2 额外包含 N 端 20 个氨基酸的信号肽且具有 SEQ ID NO:229 的序列, 成熟的 (或经加工的) IL-2 蛋白是去除了所述信号肽的多肽。

本文所述的 hIL-2 变体 (或 IL-2 突变蛋白) 是野生型 hIL-2 的变异体, 变体可以在野生型 IL-2 氨基酸序列内含有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变, 所述氨基酸突变可以是氨基酸取代、缺失、插入和添加。在一些实施方案中, 优选的氨基酸突变是氨基酸取代、插入或添加或其组合。在另一些实施方案中, 优选的氨基酸突变是氨基酸缺失。在一些实施方案中, 在本申请描述的具体突变的氨基酸位置上通过引入突变来获得具有与本申请所述抗 IL-2 抗体或抗原结合片段增强的结合亲和力的 hIL-2 变体, 所述增强的结合亲和力可以是与所述抗 IL-2 抗体或抗原结合片段不能够交叉反应的野生型 IL-2 经氨基酸突变后能够与所述抗 IL-2 抗体或抗原结合片段交叉反应, 或具有中等结合亲和力 (例如, 低于 10⁻⁸ M), 或具有较高的结合亲和力 (例如, 低于 10⁻⁹ M, 甚至低于 10⁻¹⁰ M)。在一些实施方案中, 在本申请描述的具体突变氨基酸位置上引入突变来获得能够与本申请所述抗 IL-2 抗体或抗原结合片段形成超稳定复合物的 hIL-2 变体。在一些实施方案中, 在本申请描述的具体突变氨基酸位置上引入突变来获得具有消除糖基化修饰的 hIL-2 变体。在一些实施方案中, 在本申请描述的特定半胱氨酸残基位置上引入突变以得到消除游离半胱氨酸的 hIL-2 变体。

在本文中, 当涉及 IL-2 蛋白的氨基酸位置时, 通过参考 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 蛋白氨基酸序列予以确定。可以通过氨基酸序列比对 (例如, 使用 BLAST; 可从 http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

获得的 Basic Local Alignment Search Tool, 使用默认参数, 进行比对), 鉴定在其它 IL-2 蛋白或多肽 (包括全长序列或截短片段) 上的对应氨基酸位置。因此, 在本申请中, 除非另有说明, 否则 IL-2 蛋白或多肽中的氨基酸位置为根据 SEQ ID NO: 1 编号的氨基酸位置。例如, 当提及“K64”时, 是指 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列第 64 位赖氨酸残基 (K), 或经比对在其它 IL-2 多肽序列上的对应位置的氨基酸残基。

在本文中, 当涉及 hIL-2 变体时, 按照以下方式描述突变。氨基酸取代表示为“原始氨基酸残基/位置/取代的氨基酸残基”。例如, 将野生型 hIL-2 第 90 位的天冬酰胺 (N) 取代为精氨酸 (R), 可以表示为 N90R。

在本文中, “IL2R”或“IL-2R”是指 IL-2 受体。高亲和力 IL2R 由三条链或亚基组成: IL-2R α (也称为 CD25)、IL-2R β (也称为 CD122) 和共用 γ 链, 即 γ c (也称为 CD132)。高亲和力 IL2R 可表述为“IL2R $\alpha\beta\gamma$ ”或“IL2R $\alpha/\beta/\gamma$ ”。术语“IL-2R β 和 γ c”可与术语“IL-2R $\beta\gamma$ ”或“IL2R β/γ ”互换使用, 指缺少 α 亚基并且包含 β 和 γ 亚基的中等亲和力 IL-2R。

在本文中, “IL2R α 结合位点 (binding sites)”或“IL2R α 结合区”是指通过已解析的晶体结构观察到的 IL-2 蛋白与 IL2R α 蛋白相互接触、作用的区域。

术语“亲和力”或“结合亲和力”是指分子 (例如受体或抗原) 与其配对体 (例如配体或抗体) 之间相互作用的内在结合能力, 即全部非共价相互作用总和的强度。除非另外陈述, 如本文中使用的“结合亲和力”是用于反映结合对的成员 (例如受体与配体或抗原与抗体) 之间 1:1 相互作用的内在结合亲和力。分子 X 对其配对体 Y 的亲和力通常可以用平衡解离常数 (K_D) 表示, 平衡解离常数是解离速率常数和结合速率常数 (分别为 K 解离 (K_{dis} 或 K_{off}) 和 K 结合 (K_a 或 K_{on})) 的比值。亲和力可以通过本领域已知的常见方法来测量, 包括本申请中所使用的方法。

术语“调节性 T 细胞”或“Treg 细胞”是指一种能抑制其它 T 细胞 (例如效应 T 细胞) 应答的特殊 CD4⁺ T 细胞类型。调节性 T 细胞的特征在于组成性高表达 IL2R α 和转录因子 FOXP3, 并在诱导和维持对抗原 (包括肿瘤抗原) 的外周自体耐受中起着关键作用。调节性 T 细胞需要 IL-2 来诱导活化其对效应 T 细胞的抑制性功能活性。

在本文中, “抗体”是指包括一种或多种基本上或部分地由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段所编码的蛋白质。公认的免疫球蛋白基因包含 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因, 以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链被分类为 κ 或 λ 。重链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ , 这些进而分别定义了免疫球蛋白类别 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。抗体可以是任何同种型/类别 (例如 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE) 或任何亚类 (例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2)。典型的免疫球蛋白 (例如抗体) 结构单元包括四聚体。每个四聚体由相同的两对多肽链构成, 每对具有一条“轻”链 (约 25kD) 和一条“重”链 (约 50-70kD)。将轻链和重链二者分成结构同源区 and 功能同源区。所述术语“恒定”和“可变”是在结构和功能上使用。每条链的 N 端定义了主要负责抗原识别的具有约 100 至 110 个或更多个氨基酸的可变 (V) 区或结构域, 主要负责抗原识别。本文中所使用的“抗体”是最广义的, 包括各种抗体结构, 只要它们能展现出所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) 和抗体片段。

抗体以完整的免疫球蛋白形式存在, 或以由蛋白酶消化产生的许多充分表征的片段形式存在。在本文中, 术语抗体的“抗原结合片段” (或简称为“抗体部分”或“抗体片段”) 是指由含有一个、或两个、或两个以上 CDR 的抗体部分或者任何其他结合抗原 (例如, IL-2 蛋白) 但不具有完整抗体结构的抗体片段所形成的一种抗体片段。抗原结合片段可以与完整抗体一样结合相同的抗原。在某些实施方案中, 抗原结合片段可以含有来自某特定人抗体的一个、或两个、或两个以上 CDR, 移接至来自一个、或两个、或两个以上不同人抗体的框架区。抗原结合片段包括但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 片段、Fd 片段、二硫键稳定的 Fv 片段 (dsFv)、(dsFv)₂、双特异性 dsFv (dsFv-dsFv)、二硫键稳定的双功能抗体 (dsdiabody)、单链抗体分子 (scFv)、scFv 二聚体 (双价的双功能抗体)、双价单链抗体 (BsFv)、骆驼化单域抗体 (camelized single domain antibody)、纳米抗体、域抗体和双功能抗体 (diabody)。例如, 抗体的“Fab”片段是指由一条轻链 (包括轻链可变区和轻链恒定区) 与一条重链的可变区和 CH1 经二硫键结合起来的抗体片段。“Fab'”片段是指包含了部分铰链区的 Fab 片段。“F(ab')₂”指的是 Fab 的二聚体。抗体的“Fc”片段, 是由重链的 CH2 和 CH3 经二硫键连接而成的抗体片段。抗体的 Fc 片段负责多种不同的效应功能, 如决定抗体在体内血清的半衰期、介导免疫反应, 例如, 抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、激活补体依赖的细胞毒性 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC) 或抗体依赖的细胞介导的吞噬作用 (Antibody Dependent Cellular Phagocytosis, ADCP), 但不参与抗原的结合。抗体的“Fv”段是指含有完整抗原结合位点的最小抗体片段。Fv 片段由一条轻链的可变区和一条重链的可变区组成。抗体的“Fd 片段”是指 Fab 片段中的重链部分, 包括 VH、CH1 和部分铰链区。“单链 Fv 抗体 (scFv)”, 是指由轻链可变区与重链可变区直接相连或通过一个肽链连接而成的工程化抗体 (Huston JS

等, Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85:5879-5883)。“(dsFv)₂”含有三条肽链:是指两个 VH 基团间通过一条多肽衔接物相连,并通过二硫键与两个 VL 基团结合。“双特异性 ds 双功能抗体”含有 VL1-VH2 (由一个多肽衔接物相连)和 VH1-VL2 (也是由一个多肽衔接物相连),两者在 VH1 和 VL1 间通过二硫键结合。“双特异性 dsFv”或“dsFv-dsFv”含有三条多肽链:VH1-VH2 片段,其中两者的重链通过多肽衔接物(如:长的弹性衔接物)相连,并通过二硫键分别与 VL1 和 VL2 片段结合,每对通过二硫键配对的重链轻链具有不同的抗原特异性。“scFv 二聚体”是双价双功能抗体或双价单链抗体(BsFv),含有二聚化的两个 VH-VL (由多肽衔接物连接)片段,其中一个片段的 VH 与另一个片段的 VL 协作形成两个结合位点,这两个结合位点可靶向结合相同抗原(或抗原结合表位)或不同抗原(或抗原结合表位)。在另一些实施方案中,“scFv 二聚体”是双特异性双功能抗体,含有相互连接的 VL1-VH2 (由多肽衔接物连接)和 VH1-VL2 (由多肽衔接物连接),其中 VH1 和 VL1 协作, VH2 和 VL2 协作,且每个协作的配对具有不同的抗原特异性。“单链抗体 Fv-Fc (scFv-Fc)”,是指 scFv 与抗体 Fc 片段组成的工程化抗体。“骆驼化单域抗体 (Camelized single domain antibody)”、“重链抗体”或“HCAb (Heavy-chain-only antibodies, HCAb)”都是指含有两个 VH 域而不含有轻链的抗体 (Riechmann L & Muyldermans S, J Immunol Methods 1999, 231:25-38; Muyldermans S, J Biotechnol 2001, 74:277-302; 专利申请 WO94/04678; 专利申请 WO94/25591; 专利 U.S. Patent No. 6005079)。重链抗体最初是在骆驼科(包括骆驼、单峰驼和美洲驼)中发现的。虽然缺失轻链,但骆驼化抗体 (camelized antibodies) 具有抗原结合的全部功能 (Hamers-Casterman C 等, Nature 1993, 363:446-448; Nguyen VK 等, Heavy-chain antibodies in Camelidae: a case of evolutionary innovation, Immunogenetics 2002, 54:39-47; Nguyen VK 等, Immunology 2003, 109:93-101)。重链抗体的可变区 (VHH 域) 是目前已知的最小的获得性免疫所产生的抗原结合单位 (Koch-Nolte F 等, FASEB J 2007, 21:3490-3498)。“纳米抗体”是由一个来自重链抗体的 VHH 域和两个恒定区 CH2 和 CH3 组成的一种抗体片段。“域抗体”是指仅含有一条重链可变区或一条轻链可变区的抗体片段。在某些情况下,两个或两个以上 VH 域由一个多肽衔接物共价结合并形成双价域抗体。双价域抗体的两个 VH 域可靶向作用于相同或不同的抗原。“双功能抗体 (diabody)”包括带有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段含有在同一条多肽链上相连的 VH 域和 VL 域(如 VH-VL 或 VL-VH) (Holliger P 等, Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90:6444-6448; 专利 EP404097; 专利申请 WO93/11161)。两个域之间衔接物很短,使同一条链上的两个域不能互相配对,从而迫使两个域与另一条链的互补域配对,形成两个抗体结合位点。这两个抗体结合位点可靶向结合相同或不同的抗原(或抗原结合表位)。

本申请的抗 IL-2 抗体或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的抗体结构域包括全长抗体的全部或其抗原结合片段(参照上文的定义),并且任选地包含能够与 IL2R α 竞争性结合 IL-2 的抗体可变区的全部或部分,并任选地包括由 V 基因和/或 D 基因和/或 J 基因编码的一个、或两个、或两个以上区。

在本文中,术语“免疫球蛋白分子”指具有天然存在的抗体结构的蛋白质。例如, IgG 类的免疫球蛋白是约 150,000 道尔顿的异型四聚体糖蛋白,其由二硫键连接的两条轻链和两条重链构成。从 N 末端至 C 末端,每条重链具有可变区(VH,也称为可变重域或重链可变域),接着是 3 个恒定域(CH1、CH2 和 CH3,也称为重链恒定区)。类似地,从 N 末端至 C 末端,每条轻链具有可变区(VL,也称为可变轻域或轻链可变域或轻链可变区),接着是恒定轻域(也称为轻链恒定区,CL)。免疫球蛋白的重链可以分成 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG)或 μ (IgM),其中一些可以进一步分成亚类,例如 $\gamma 1$ (IgG1)、 $\gamma 2$ (IgG2)、 $\gamma 3$ (IgG3)、 $\gamma 4$ (IgG4)、 $\alpha 1$ (IgA1)和 $\alpha 2$ (IgA2)。基于其恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白的轻链可以分成称为 kappa (κ) 和 lambda (λ)。免疫球蛋白一般由通过免疫球蛋白铰链区连接的两个 Fab 分子和 Fc 域组成。

在本文中,术语“轻链可变区 (V_L)”和“重链可变区(V_H)”分别是指包含 V_L 或 V_H 的多肽。V_H 和 V_L 的配对一起形成单个抗原结合位点。内源性 V_L 由基因区段 V(可变)和 J(连接)编码,并且内源性 V_H 由 V、D(多样性)和 J 编码。V_L 或 V_H 都包括高变区 CDR (互补性决定区)和构架区(FR)。术语“可变区”或“V 区”可互换地使用,是指包含 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的重链可变区或轻链可变区。V 区可以是天然存在的、重组的或合成的。在本文中,抗体轻链可变区和/或抗体重链可变区有时可统称为“抗体可变区”或“抗体链”。如本文提供和进一步描述的,“抗体轻链可变区”或“抗体重链可变区”和/或“抗体可变区”和/或“抗体链”任选地包含引入半胱氨酸残基的多肽序列。

在本文中,术语“互补决定区 (CDR)”或“高变区 (HVR)”可以互换使用,是指抗体可变区中序列上高度可变和/或形成结构上定义的环(“高变环”)的每个区域。CDR 是抗体的靶蛋白结合位点,CDR 在结构上与靶蛋白的表位互补,因此该结合位点具有结合这种靶蛋白的特异性。通常,天然的四链抗体包含六个 CDR,三个在 V_H 中 (HCDR1、HCDR2 和 HCDR3) 以及三个在 V_L 中 (LCDR1、LCDR2 和 LCDR3)。除了 CDR 的其余 VL 或 VH 区,即框架区 (FR) 具有较少的氨基酸序列变异 (Kuby, Immunology, 第 4 版,第 4 章, W H Freeman & Co., 2000)。

CDR 和 FR 的位置可以使用本领域熟知的多种定义方法确定,例如, Kabat、Chothia、IMGT 和 Contact

(参见, 例如, Kabat 等人 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 公开号 91-3242, Johnson 等, Nucleic Acids Res 2001, 29:205-206; Chothia & Lesk, J Mol Biol 1987, 196:901-917; Chothia 等, Nature 1989, 342:877-883; Chothia 等, J Mol Biol 1992, 227:799-817; Al-Lazikani 等, J Mol Biol 1997, 273:927-748; Lefranc MP 等, IMGT, The International ImmunoGenetics Database; Nucleic Acids Research 1999, 27:209-212; MacCallum RM 等, J Mol Biol 1996, 262:732-745)。抗原结合位点的定义还在以下文献中描述: Ruiz 等人, Nucleic Acids Res 2000, 28:219-221; Lefranc MP, Nucleic Acids Res 2001, 29:207-209; Lefranc MP, The Immunologist 1999, 7:132-136; Lefranc MP 等, Dev Comp Immunol 2003, 27:55-77; MacCallum 等, J Mol Biol 1996, 262:732-745; Martin 等, Proc Natl Acad Sci USA 1989, 86:9268-9272; Martin 等, Methods Enzymol 1991, 203:121-153; Rees 等, 于: Sternberg M J E (编辑), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)。本申请包含任何一种定义方法来确定本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的抗体部分或本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段中的 CDR, 表 1 显示了使用不同定义方法所确定的抗体 CDR 的氨基酸残基。涵盖特定 CDR 的确切氨基酸残基数量随 CDR 的序列而变化。在明确了抗体可变区的氨基酸序列情况下, 本领域技术人员能够通过包括但不限于所述定义的常规方法确定所述抗体的 CDR。

表 1. 不同定义方法确定的 CDR¹

CDR	Kabat	Chothia	IMGT	Contact
HCDR1	31-35	26-32	27-38	30-35
HCDR2	50-65	52-56	56-65	47-58
HCDR3	95-102	95-102	105-117	93-101
LCDR1	24-34	24-34	27-38	30-36
LCDR2	50-56	50-56	56-65	46-55
LCDR3	89-97	89-97	89-97	89-96

¹: 表 1 中所有 CDR 定义的编号均依照 Kabat 等人提出的编号系统(Kabat 等人 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services)。

此外, Kabat 等人还定义了针对可变区序列的编号系统, 其可应用于任何抗体。本领域的普通技术人员能够明确地将此“Kabat 编号”系统应用到任何抗体的可变区序列, 而无需依赖于抗体序列本身以外的任何实验数据来确定可变区序列。除非另外说明, 本申请的抗 IL-2 抗体或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的抗体部分的可变区中特定氨基酸残基位置的编号均按照 Kabat 编号系统确定。

在本文中, 术语“Fc 区”或“Fc 结构域”是指免疫球蛋白重链的 C 末端区域, 其至少含有恒定区的一部分, 例如除了第一恒定区(CH1)之外的免疫球蛋白重链恒定区。本文所使用的 Fc 区包括天然序列 Fc 区和/或 Fc 区变体, 并且可以是本申请的抗 IL-2 抗体或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的一部分。在本领域中应理解, Fc 区的边界可以变化, 然而, 人 IgG 重链 Fc 区通常被定义为在其羧基端包含第 226 位半胱氨酸残基或第 230 位脯氨酸残基, 其根据 EU 编号系统/方案, 如见于 Kabat 等人)(1991, NIH 公开 91-3242, National Technical Information Service, 斯普林菲尔德, 弗吉尼亚州)。

在本文中, 术语“单克隆抗体”是指从基本上具有同质性的抗体群中所获得的抗体, 即, 除了可能以少量存在的天然突变之外, 构成抗体群中的各个抗体是相同的。单克隆抗体表现出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。

在本文中, 术语“嵌合抗体”是指含有源自两种不同抗体的序列的抗体(例如, 美国专利 US4,816,567), 所述抗体通常源自不同物种。例如, 嵌合抗体包含人类和啮齿动物抗体片段, 通常是人类恒定区和小鼠可变区。用于产生嵌合抗体的方法包含本领域一般技术人员已知的常规重组 DNA 和基因转染技术(例如 Morrison SL 等, Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81:6851-6855; 专利 US 5,202,238 和专利 US 5,204,244)。

在本文中, 术语“人源化抗体或抗原结合片段”, 是指包括来源于非人动物的 CDR、来源于人的 FR 区, 以及来源于人的恒定区的抗体或抗原结合片段。由于人源化的抗体或抗原结合片段具有降低的免疫原性, 可以作为用于人的治疗剂。在一些实施方案中, 所述非人动物是哺乳动物例如小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、豚鼠或仓鼠。在一些实施方案中, 所述人源化抗体或抗原结合片段除了 CDR 序列是非人源的以外, 抗体的其它部分基本上全部由人源序列组成。在一些实施方案中, 所述来源于人的 FR 区可以包括与其来自的人源抗体相同的氨基酸序列, 或其可以包括一些氨基酸改变, 例如, 不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变。在一些实施方式中, 该氨基酸改变可以仅存在于重链 FR 区、仅存在于轻链 FR 区或同时存在于两个链中。

在本文中，术语“相应的人种系序列”是指抗体可变区氨基酸序列或子序列，与所有其他已知人种系免疫球蛋白可变区氨基酸序列相比，该抗体可变区氨基酸序列或子序列与参考的人种系免疫球蛋白可变区氨基酸序列具有最高的氨基酸序列同一性。相应的人种系序列可以仅仅是框架区、互补性决定区、框架区和互补性决定区、可变区、或可变区序列或子序列的其它组合。可以使用本文所述的方法，例如，使用 BLAST、ALIGN 或本领域已知的另一种比对算法比对两个序列，确定序列同一性。相应的人种系核酸或氨基酸序列可以与参考的人种系免疫球蛋白可变区氨基酸序列具有至少约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性。

本申请的抗 IL-2 抗体或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的抗体部分可以选自以下任一个形式、或两个、或两个以上形式，包括嵌合形式、非人形式、人源化形式或全人形式，只要所述形式能够与人 IL2R α 竞争性结合 hIL-2 或其变体并能抑制人 IL2R α 与 hIL-2 或其变体结合，同时能保留 hIL-2 或其变体对 IL2R β/γ 的结合活性和功能活性。

在本文中，术语“特异性结合”或“结合特异性”或“对...具有特异性”或“结合”是指结合反应，该结合反应决定了蛋白质和其他生物制剂的异质群体（例如，在生物样品（例如血液、血清、血浆或组织样品）中，靶分子（或蛋白或抗原）的存在，也就是说此结合对于靶分子是具有选择性的，并且能区分开那些不期望的或非特异性的相互作用。例如，与靶分子（其可以是抗原）特异性结合的抗体是相比于该抗体与其它非靶分子结合，该抗体结合该靶分子时具有更大亲和力和、结合活性、更容易和/或持续时间更长。在某些实施例中，抗体与靶抗原特异性结合的平衡解离常数(K_D)为 <1 μ M、<100 nM、<10 nM、<1 nM 或 <0.1 nM。

在本文中，术语“抗原-抗体结合界面”是指抗体特异性结合抗原时，参与抗原、抗体相互作用（例如，通过结合、空间位阻、使稳定/使不稳定、空间分布）的氨基酸残基所形成的空间结构区域，该空间区域包括抗原表位和抗体的抗原结合区。抗原-抗体结合界面的氨基酸残基可处于或不处于连续的序列中。例如，当所述界面是三维的，所述界面内的氨基酸残基可以分开位于线性序列上的不同位置。如本文所用的，术语“表位”意指能够与抗体特异性结合的蛋白决定区。表位通常由分子的化学活性表面基团如氨基酸或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征，以及特定的电荷特征。构象表位和非构象表位的区别在于在变性溶剂的存在下抗体与前者的结合会丧失，但是与后者的结合不会丧失。

如本文所用的，术语“表位结合结构域”或“抗原结合结构域”或“抗原结合区”可互换使用，是指与靶表位上的结合位点特异性相互作用（例如，通过结合、空间位阻、使稳定/使不稳定、空间分布）的结合分子的部分（例如，抗体或者其表位结合片段或衍生物）。本申请中“抗原结合区”也指保留与 IL-2 表位特异性相互作用（例如，通过结合、空间位阻、使稳定/使不稳定、空间分布）的抗体的一个、或两个、或两个以上片段。

在本文中，术语“融合”或“融合的”在用于氨基酸序列（例如肽、多肽或蛋白）时，是指例如通过化学键合或重组手段，将两个或更多个氨基酸序列组合成为非天然存在的单一氨基酸序列。融合氨基酸序列可通过两个编码多核苷酸序列的基因重组产生，并且可以通过将含有重组的多核苷酸的构建体引入宿主细胞的方法来表达。

在本文中，术语“抗体变异体”或“抗体变体”是指在参考抗体可变区中含有至少一个氨基酸突变的抗体多肽序列。变异体可以与未经修饰的抗体基本同源或基本相同。在一些实施方案中，在本申请的抗 IL-2 抗体或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的抗体部分一个、两个、三个、四个、五个和/或六个 CDR 进行氨基酸突变，以提高所述抗体或抗体部分的人源化程度、增强对 IL-2 变体的特异性或亲和力、和/或与 IL-2 或其变体形成超稳定的复合结构。在一些实施方案中，在本申请的抗 IL-2 抗体或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的抗体部分一个、两个、三个和/或四个 FR 进行氨基酸突变，以提高所述抗体或抗体部分的人源化程度和/或与 IL-2 或其变体形成超稳定的复合结构。在一些实施方案中，在本申请的抗 IL-2 抗体或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的抗体部分的 CDR 和 FR 进行一个或两个以上氨基酸突变，以提高所述抗体或抗体部分的人源化程度、增强对 IL-2 变体的特异性或亲和力、和/或与 IL-2 或其变体形成超稳定的复合结构。在一些实施方案中，所述氨基酸突变包括氨基酸取代、缺失、插入或其任意组合。

其中，氨基酸取代包括保守氨基酸取代和非保守氨基酸取代，保守氨基酸取代涉及用同类（例如化学性质或功能相似）中的另一个氨基酸进行置换，非保守取代涉及用另一类中的氨基酸置换这一类别中的一种的氨基酸。本领域一般技术人员可以基于所涉及残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性质的相似性进行保守氨基酸取代。例如，(i) 非极性（疏水）氨基酸包括丙氨酸(Ala, A)、亮氨酸(Leu, L)、异亮氨酸(Ile, I)、缬氨酸(Val, V)、脯氨酸(Pro, P)、苯丙氨酸(Phe, F)、色氨酸(Trp, W)和蛋氨酸(Met, M)；(ii) 极性中性氨基酸包括甘氨酸(Gly, G)、丝氨酸(Ser, S)、苏氨酸(Thr, T)、半胱氨酸(Cys, C)、酪氨酸(Tyr, Y)、天冬酰胺(Asn, N)和谷氨酰胺(Gln, Q)；(iii) 带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸(Arg, R)、赖氨酸(Lys, K)和组氨酸(His, H)；(iv) 带负电的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸(Asp, D)和谷氨酸(Glu, E)。

E)。非保守氨基酸取代可能导致生物大分子的性质或功能发生很大变化。一般预期使多肽性质发生最大变化的取代包括但不限于：(a) 例如丝氨酸或苏氨酸等亲水性残基取代（或被取代）例如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸等疏水性残基；(b) 半胱氨酸或脯氨酸取代（或被取代）任何其它氨基酸残基；(c) 例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸等具有正电性侧链的残基取代（或被取代）例如谷氨酰胺或天冬酰胺等负电性残基；或(d) 例如苯丙氨酸等具有庞大侧链的残基取代（或被取代）例如甘氨酸等不具侧链的残基。尽管对引入氨基酸序列突变的位点或区域可以预先确定，但非保守取代所带来的潜在的生物大分子性质或功能的改变却是无法预见的。在一些实施方案中，本申请的 hIL-2 变体通过在野生型 hIL-2 基础上创造性地进行非保守氨基酸取代获得了意想不到的在功能上的巨大改变，例如由 hIL-2 不与本申请的抗 IL-2 抗体结合通过非保守氨基酸取代获得了可以结合的巨大改变。

在一些实施方案中，就在抗原-抗体结合界面引入半胱氨酸残基而言，所述的第一和第二仅是为了便于区分引入半胱氨酸的位置而使用。除非明确如此陈述，这些术语的使用不意图赋予将特定氨基酸残基取代为半胱氨酸残基或者添加或插入半胱氨酸残基的特定次序。

在本文中，在两个或更多个核酸或多肽序列中，术语“相同的”或“同一性”或“同一性百分比”或“百分比序列同一性”可以互换使用，是指在进行氨基酸序列(或核酸序列)比对，并且必要时引入间隔使相同氨基酸(或核酸)数目达到最多后，在候选序列中，与参比序列相同的氨基酸(或核酸)残基占所述候选序列的氨基酸(或核酸)残基的百分比。所述氨基酸残基的保守替代可以认为或不认为是相同残基。可以通过本领域公开的工具，例如 BLASTN, BLASTp (美国国家生物技术信息中心网站(NCBI))，也可参见，Altschul SF 等, J Mol Biol 1990, 215:403-410; Stephen F 等, Nucleic Acids Res 1997, 25:3389-3402; ClustalW2 (欧洲生物信息研究所网站，可参见, Higgins DG 等, Methods in Enzymology 1996, 266:383-402; Larkin MA 等, Bioinformatics 2007, 23:2947-2948) 和 ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件，对序列进行比对以确定氨基酸(或核酸)序列的百分比序列同一性。本领域技术人员可以使用所述工具的默认参数或根据比对的需要适当调整参数，例如通过挑选合适的算法。

在本文中，当涉及核酸(或多核苷酸)或蛋白时，术语“分离的”表示该核酸或蛋白基本上不含在天然状态下与其结合的其他细胞组分，优选处于同质状态，例如，分离的核酸或蛋白可以从天然或自然环境中移出的。分离的核酸或蛋白可以是冻干的或者是水溶液。通常，其纯度和均质性可以使用分析化学技术(例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法)来确定的。作为制剂中的主要成分。蛋白基本上是通过纯化得到的。术语“纯化的”表示核酸或蛋白在电泳凝胶中基本上产生一条带。特别地，这意味着核酸或蛋白为至少 85% 纯度、更优选地至少 95% 纯度、以及最优选地至少 99% 纯度。就本申请而言，在一些实施方案中，在宿主细胞中表达的重组蛋白则被视为是分离的，同样也适用于通过任何本领域技术人员熟知的技术分开、分级(fractionate)、或部分或基本纯化的天然的或重组的蛋白。在一些实施方案中，“分离的抗体”指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(例如，特异性地结合 hIL-2 的分离的抗体基本上不含特异性地结合除 hIL-2 之外的抗原的抗体)。然而，特异性地结合 hIL-2 的分离的抗体可以与其它抗原(如来自其它物种的 IL-2 分子，例如小鼠 IL-2)具有交叉反应性。而且，分离的抗体可以基本上不含其它细胞材料和/或化学物质。在一些实施方案中，包含在载体中的编码本申请多肽或蛋白(例如 hIL-2 或其变体、抗 IL-2 抗体、hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白)的重组多核苷酸被视为分离的。分离的多核苷酸的其它例子包括在异源宿主细胞中包含的重组多核苷酸或溶液中的纯化(部分或基本地)的多核苷酸。分离的多核苷酸包括在普遍含有该多核苷酸分子的细胞中所含有的多核苷酸分子，但该多核苷酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的其它染色体位置。本申请的分离的多核苷酸或核酸还包括合成生成的这类分子。另外，多核苷酸或核酸可以是或可以包括调节性元件如启动子、核糖体结合位点或转录终止子。

在本文中，术语“工程化”视为包括对多肽或蛋白主链的任意操作或对天然存在或重组蛋白或多肽或其片段的翻译后修饰。工程化包括对氨基酸序列进行突变、糖基化模式或各氨基酸侧链基团的修饰，以及这些方法的组合。

如本文所用的，术语“多肽”是指氨基酸及其等同物的聚合物，而不是指产物的具体长度；因此，“肽”和“蛋白质”包含在多肽的定义内。多肽的定义内还包含本文定义的“抗体”。

除非上下文另外指示，否则“衍生物”是相对于第二多肽(也称为“变体”)具有一个、或两个、或两个以上非保守或保守氨基酸取代的多肽或其片段；或通过共价连接第二分子，例如通过连接异源多肽，或通过糖基化、乙酰化、磷酸化等修饰的多肽或其片段。“衍生物”的定义还可以包含例如含有一种或多种氨基酸(例如，非天然氨基酸等)的类似物的多肽、具有未经取代的连接的多肽以及本领域已知的(天然的和非天然存在的)其它修饰。

在本文中，术语“表达载体”或“载体”是指可将编码某蛋白的多核苷酸或核酸操作性地插入其中并使该蛋白获得表达的一种运载工具。载体可用于转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内得以表达。

在本文中，术语“宿主细胞”是指导入外源多核苷酸或核酸和/或载体的细胞。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，其包括初级转化的细胞和来源于其的后代，而不考虑传代的数目。后代在核酸内容上可能与亲本细胞不完全相同，而是可以包含突变。本申请中包括在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。

在本文中，术语“受试者”、“患者”或“个体”可以互换使用，包括但不限于：哺乳动物，包含例如人、非人灵长类动物（例如，猴）、小鼠、猪、牛、山羊、兔、大鼠、豚鼠、仓鼠、马、猴、绵羊或其它非人类哺乳动物；非哺乳动物，包含例如非哺乳类脊椎动物，如鸟（例如，鸡或鸭）或鱼；以及非哺乳类无脊椎动物。在一些实施例中，本申请的用途或方法所涉及的受试者和药物组合物用于（预防性地和/或治疗性地）治疗非人类动物。

在本文中，对某种疾病或症状的“治疗（treating 或 treatment）”是指减轻某种疾病或症状，降低某种疾病或症状兴起或发展的速度，减少发展出某种疾病或症状的风险，或延迟与某种疾病或症状相关的症状发展，减少或终止与某种疾病或症状相关的症状，产生某种疾病或症状的完全或部分的逆转，治愈某种疾病或症状，或以上的组合。

在本文中，“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。在一些实施方案中，具有家族病史的受试者是预防性方案的候选者。通常，术语“预防”是指在病症或症状发生前，特别是在具有风险的受试者中发生前的药物施用。

术语“治疗有效量”或“有效剂量”是指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现预防或改善与疾病或病症有关的症状和/或减轻疾病或病症严重程度的剂量或浓度。本申请的制剂、抗体或其抗原结合片段或组合物的治疗有效量可以根据多种因素如疾病状态、个体的年龄、性别和重量和抗体或抗体部分在个体中激发所需反应的能力而变动。治疗有效量也可被认为是制剂、抗体或其抗原结合片段或组合物的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。术语“有效量”是指足以对受试者提供临床上的益处（包括但不限于改善、缓解或减轻疾病、病症或其相关症状，延迟或停止疾病进展）的活性成分或药剂的量。

在本文中，术语“药学上可接受的”或“药用可接受的”是指所指的载剂、溶媒、稀释剂、辅料和/或盐，总的来说在化学上和/或在物理上与制剂中的其他配料相兼容，并在生理上与受试者相兼容。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5% 的下限和比指定数字数值大 5% 的上限的范围内的数字数值，或在一个实施方案中为小 10% 的下限和大 10% 的上限，或在另一个实施方案中为小 15% 的下限和大 15% 的上限，或在另一个实施方案中为小 20% 的下限和大 20% 的上限。

术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项中的任意两项或多项的组合。

如本文中所用，术语“包含”或“包括”或“含有”或“具有”或“涉及”可互换使用，意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”或“含有”或“具有”或“涉及”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。

如本文中所提及的“一些实施方案”、“一个实施方案”、“一个具体实施方案”、或“具体实施方案”或其组合表示所描述的与所述实施方案相关的特定特征、结构或特性包含于本申请的至少一个实施方案中。因此，在本说明书全文各处出现前述用语未必都指同一个实施方案。此外，所述特定特征、结构或特性可在一个或多个实施方案中以任意适宜方式组合。

除非上下文另有明确指示，单数术语涵盖复数的指示对象，反之亦然。

为了描述和公开的目的，以引用的方式将所有的专利、专利申请和其它出版物在此明确地并入本文。这些出版物仅因为它们公开早于本申请的申请日而提供。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于申请者可得的信息，并且不构成任何关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的承认。而且，在任何国家，在本中对这些出版物的任何引用并不构成关于该出版物成为本领域的公知常识的一部分的认可。

在以下章节中将更详细地描述本申请的各个方面。

1、本申请的 hIL-2 变体

一方面，本申请提供了一种 hIL-2 变体，所述 hIL-2 变体相对于野生型 hIL-2（SEQ ID NO: 1 所示）获得了与本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段结合的能力，并且所述突变对 hIL-2 的生物学活性没有明显影响。

本申请的 hIL-2 变体与本文的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的结合亲和力 (K_D) 值 $< 5 \times 10^{-8}$ M，优选的是 $< 1 \times 10^{-8}$ M， $< 5 \times 10^{-9}$ M，或 $< 1 \times 10^{-9}$ M，更优选的是 $< 6 \times 10^{-10}$ M。本申请的 hIL-2 变体与本

文的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的 K_D 值约 5×10^{-8} M 至 5×10^{-10} M, 或者例如 1×10^{-8} M 至 1×10^{-10} M、 1.5×10^{-8} M 至 1×10^{-10} M、 1×10^{-8} M 至 10×10^{-10} M、 1×10^{-9} M 至 1×10^{-10} M。

本申请的 hIL-2 变体还包括其它功能特性：(i) 维持了 hIL-2 与 hIL2R β/γ 的结合活性和生物学功能；(ii) 本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段与 IL2R α 竞争性地结合本申请 hIL-2 变体；(iii) 本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段可以阻断所述 hIL-2 变体与 IL-2R α 的结合。

本申请的 hIL-2 变体还包括其它改善的特性，例如，其突变位点位于抗原-抗体结合界面内，未暴露于抗原-抗体结合界面之外，因此显著降低了潜在的诱发 ADA (anti-drug antibody, 抗药物抗体) 的风险。

在一些实施方案中，本申请的 hIL-2 变体与野生型 hIL-2 (SEQ ID NO:1 所示) 相比具有 90% 以上的氨基酸序列同一性，优选 93% 以上氨基酸序列同一性，但是序列同一性小于 100%。在一些实施方案中，本申请的 hIL-2 变体相对于野生型 hIL-2 包含至少一个、或两个、或两个以上氨基酸突变。在一些实施方案中，本申请的 hIL-2 变体相对于野生型 hIL-2 包含至少一个、或两个、或两个以上氨基酸取代和/或缺失。在一些实施方案中，本申请的 hIL-2 变体相对于野生型 hIL-2 包含至少一个、或两个、或两个以上除了取代为半胱氨酸残基以外的其它氨基酸取代。在一个实施方案中，所述氨基酸突变位于所述抗原-抗体结合界面。

在一个具体实施方案中，所述氨基酸突变位于所述抗原-抗体结合界面之内。在一个具体实施方案中，本申请的 hIL-2 变体的突变位点是包埋在所述变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的结合界面之内，本申请的 hIL-2 变体的暴露于所述结合界面之外的部分保留与野生型 hIL-2 相同的氨基酸序列，由此不仅对 hIL-2 的生物学活性没有明显影响，并且显著降低了所述 hIL-2 变体的免疫原性，即所述 hIL-2 变体在与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段形成抗原-抗体复合物后显著降低了所述 hIL-2 变体的潜在 ADA 风险。所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 在第 64 位、第 90 位和/或第 104 位包含一种、两种或两种以上氨基酸突变。在一些实施方案中，所述 hIL-2 变体相对于野生型 hIL-2 包含选自 K64、N90 和 M104 的一个、两个或三个位置处的氨基酸突变。在一些实施方案中，相对于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2，所述 hIL-2 变体包含如下的至少一种突变：

(1) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 64 位氨基酸残基处的 K 突变为 G、S、T、C、Y、N 或 Q；(2) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 90 位氨基酸残基处的 N 突变为 R、K 或 H；或 (3) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 104 位氨基酸残基处的 M 突变为 E 或 D。

在一个具体实施方案中，所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 包含以下一种、两种或两种以上氨基酸突变：(a) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 64 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 K64G；或 (b) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 90 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 N90R；或 (c) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 104 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 M104E，优选的所述氨基酸突变是 K64G 和/或 N90R，或者 K64G、N90R 和 M104E，更优选的所述氨基酸突变是 K64G 和 N90R。

在一个实施方案中，所述氨基酸突变位于抗原-抗体结合界面之外，以解决所述 hIL-2 变体在下游生产和控制过程中可能出现的问题。在一个具体实施方案中，为了解决所述 hIL-2 变体在生产制备过程中出现糖基化异构体的问题，对野生型 hIL-2 进行氨基酸突变以消除糖基化修饰，所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的 N 端前三个或前五个氨基酸残基存在缺失，或相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的 N 端第三个氨基酸残基具有氨基酸突变，优选的氨基酸突变是对野生型 hIL-2 的 N 端前三个氨基酸残基进行缺失。在一个具体实施方案中，为了解决所述 hIL-2 变体在生产制备过程中可能出现半胱氨酸残基错配的问题，对野生型 hIL-2 进行氨基酸突变以消除游离半胱氨酸残基，所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 125 位氨基酸残基处具有氨基酸突变，优选的氨基酸突变是 C125A、C125L、C125S、C125Q 或 C125V。

在一个实施方案中，所述氨基酸突变位于所述抗原-抗体结合界面之内和之外。在一个具体实施方案中，所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 在 N 末端的前 3 位、或前 5 位、或第 3 位、或第 64 位、或第 90 位、或第 104 位、或第 125 位具有 1 个或一个以上氨基酸突变。在一些实施方式中，相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2，所述 hIL-2 变体包含：N 末端前 3 位氨基酸的缺失突变，选自 K64、N90 和 M104 中的一个或多个位置处的取代突变，以及 C125 位置处的取代突变；优选的氨基酸突变是 K64G 和/或 N90R、N 末端前 3 个氨基酸残基缺失和 C125A、C125L、C125S、C125Q 或 C125V；或 K64G、N90R、M104E 和 N 末端前 3 个氨基酸残基缺失，以及选自 C125A、C125L、C125S、C125Q 或 C125V 的任一种。更优选的氨基酸突变是 K64G、N90R、N 末端前 3 个氨基酸残基缺失和 C125L。

2、本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段

一方面，本申请提供了一种抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段能够与 IL2R α 竞争性结合本申请的 hIL-2 变体并且阻断所述 hIL-2 变体与 IL2R α 或包含有 α 亚基的 IL-2 受体聚合体（即 IL2R α / β 或 IL2R α / β / γ ）的结合，并且与本申请的 hIL-2 变体的结合亲和力较高，不易发生解离。

本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段与本申请的 hIL-2 变体的结合亲和力 (K_D) 值 $< 5 \times 10^{-8}$ M，优选的是 $< 1 \times 10^{-8}$ M， $< 5 \times 10^{-9}$ M，或 $< 1 \times 10^{-9}$ M，更优选的是 $< 6 \times 10^{-10}$ M。本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段与本申请的 hIL-2 变体的 K_D 值约 5×10^{-8} M 至 5×10^{-10} M，或者例如 1×10^{-8} M 至 1×10^{-10} M、 1.5×10^{-8} M 至 1×10^{-10} M、 1×10^{-8} M 至 10×10^{-10} M、 1×10^{-9} M 至 1×10^{-10} M。本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段与本申请 hIL-2 变体的解离常数 (K_{dis}) $< 5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、 $< 5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或 $< 3 \times 10^{-4} s^{-1}$ 。

本申请的抗体能够与 IL2R α 竞争性结合 hIL-2 或其变体。在特定的实施例中，本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段能特异性识别 hIL-2 或其变体序列中的 IL2R α 结合位点。本申请的抗体还可以任选地包括 F(ab)₂、F(ab')₂、Fab、Fab'、scFv、单结构域抗体等。本申请的抗体可以是嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体，可以是单克隆抗体、多克隆抗体、双特异性抗体、多特异性抗体和抗体片段，只要所述抗体能特异性识别 hIL-2 或其变体的 IL2R α 结合位点，并能阻碍 hIL-2 或其变体与 IL2R α 结合。在一些实施方案中，所述抗 IL-2 抗体是人源化抗体。在一些实施方案中，所述抗 IL-2 抗体选自抗小鼠 IL-2 抗体及其人源化抗体。在特定的实施例中，所述抗小鼠 IL-2 抗体选自特异性识别小鼠 IL-2 (mIL-2) 与小鼠 IL2R α (mIL2R α) 结合位点的抗 mIL-2 抗体，所述抗 mIL-2 抗体能够与本申请的 hIL-2 变体发生交叉反应。

在另一方面，本申请的抗 IL-2 抗体包括 VH 和 VL。在一些实施方案中，本申请的抗体衍生自包括 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 氨基酸序列的抗 IL-2 抗体，并能够特异性地结合所述 hIL-2 变体且阻断所述 hIL-2 变体与 IL2R α 的结合。

在一些实施方案中，本申请的抗 IL-2 抗体衍生自包括 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 氨基酸序列的抗体：

EVQLQESGAELVRPGTSVKLSCKVSGDTITAYYLHFVRQRPQGQGLEWIGRIDPEDDSTKYAENFKNK
ATFTADASSNTAYLRLSSLTSEDATYFCTTVTFYYSRELRFAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 5)

在一些实施方案中，本申请的抗 IL-2 抗体衍生自包括 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 氨基酸序列的抗体：

DIQVQTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGNYLSWYQQKLGKSPQLLIHSATSLADGVPSRFGSGRSGT
QYSLKINRLQVEDTGIYYCLQHYSTPYTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 6)

在一些实施方案中，本申请的抗 IL-2 抗体包含 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 氨基酸序列中的一个、或两个、或两个以上的 CDR 或如 SEQ ID NOs: 7、8 和 9 所示的氨基酸序列或其变体，所述变体包括人源化抗体或本申请所述的任何其它变体。在一些实施方案中，所述抗 IL-2 抗体包含 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 氨基酸序列的 HCDR1 (SEQ ID NO: 7 所示)、HCDR2 (SEQ ID NO: 8 所示) 和 HCDR3 (SEQ ID NO: 9 所示)。

在一些实施方案中，本申请的抗 IL-2 抗体包含 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 氨基酸序列中的一个、或两个、或两个以上的 CDR 或如 SEQ ID NOs: 10、11 和 12 所示的氨基酸序列或其变体，所述变体包括人源化抗体或本申请所述的任何其它变体。在一些实施方案中，所述抗 IL-2 抗体包含 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 氨基酸序列的 LCDR1 (SEQ ID NO: 10 所示)、LCDR2 (SEQ ID NO: 11 所示) 和 LCDR3 (SEQ ID NO: 12 所示)。

在一些实施方案中，本申请的抗 IL-2 抗体包含：SEQ ID NO: 5 所示的 VH 氨基酸序列的一个、或两个、或两个以上的 CDR 或如 SEQ ID NOs: 7、8 和 9 所示的氨基酸序列或其变体；和 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 氨基酸序列中的一个、或两个、或两个以上 CDR 或如 SEQ ID NOs: 10、11 和 12 所示的氨基酸序列或其变体，所述变体包括人源化抗体或本申请所述的任何其它变体。在一些实施方案中，所述抗 IL-2 抗体包含 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 氨基酸序列的 HCDR1 (SEQ ID NO: 7 所示)、HCDR2 (SEQ ID NO: 8 所示) 和 HCDR3 (SEQ ID NO: 9 所示)，以及 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 氨基酸序列的 LCDR1 (SEQ ID NO: 10 所示)、LCDR2 (SEQ ID NO: 11 所示) 和 LCDR3 (SEQ ID NO: 12 所示)。在一些实施方案中，所述抗 IL-2 抗体包含如 SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3。

在另一方面，可以使用本申请的抗 IL-2 抗体的 VH 和/或 VL 作为起始材料进行工程化改造，以制备成能应用于人体内的本文所述的抗体。可以通过对一个或两个可变区（即，VH 和/或 VL）内的一个、或两个、或两个以上氨基酸残基进行突变来对抗体进行工程化改造，例如，对一个、或两个、或两个以上 CDR 区和/或一个、或两个、或两个以上框架区内的一个、或两个、或两个以上氨基酸残基进行突变。

在一些实施方案中，通过 CDR 移植来对本申请的抗 IL-2 抗体可变区进行工程化改造。抗体主要通过重链和轻链的六个 CDR 的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因此，各个抗体之间的 CDR 区内的氨基酸序列比 CDR 区之外的序列（例如 FR）更加多样化。因为 CDR 区的氨基酸序列负责抗体与抗原大多数的相互作用，所以可以通过构建表达载体来表达重组抗体以模拟特定的天然存在抗体的特性，所述表达载体包含将来自特定的天然存在抗体的 CDR 序列移植到另一个具有不同特性抗体的 FR 序列（参见例如 Riechmann 等, *Nature* 1998, 332:323-327; Jones 等, *Nature* 1986, 321:522-525; Queen 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:10029-10033。还可参见美国专利号: US5,225,539; US5,530,101; US5,585,089; US5,693,762 和 US6,180,370）。

在一些实施方案中，本申请涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含本申请所述的 HCDR1 区、HCDR2 区和 HCDR3 区的氨基酸序列，该轻链可变区包含本申请所述的 LCDR1 区、LCDR2 区和 LCDR3 区的氨基酸序列。尽管所述抗体包含本申请单克隆抗体的 V_H 和 V_L 的 CDR 区序列，但它们也可以包含不同的框架区序列。

此类框架区序列可以从 DNA 公共数据库或已公开的涉及种系抗体基因序列的参考文献中获得。例如，人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可见于“VBase”人种系序列数据库中（可在互联网上从 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase 处获得）；以及, Kabat 等, 1991, 同前; Tomlinson 等, *J Mol Biol* 1992, 227:776-798; 及 Cox 等, *Eur J Immunol* 1994, 24:827-836; 以引用的方式将其各自的内容明确地并入本文。作为另一个实例，人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可见于 IMGT 数据库中。例如，在人类免疫球蛋白中发现的以下的重链种系序列能够通过 IMGT 登记号获得: 4-59*02 (M29812), 1-69-2*01 (KF698734、IMGT000035 或 Z12305)。作为另一个实例，在人免疫球蛋白中发现的以下的轻链种系序列能够通过 IMGT 登记号获得: 3-20*01 (X12686、M15038、M15039、X56593 或 X93639), 3-11*01 (X01668、L37726 或 X92342), 1-39*01 (X59315 或 X93627)。

可以使用本领域技术人员公知的称为 Gapped BLAST 的序列相似性搜索方法中的一种，基于经编译的蛋白序列数据库对抗体氨基酸序列进行比较 (Altschul 等, 1997, 同前)。

本申请的抗 IL-2 抗体的重链 CDR 区、轻链 CDR 区以及重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列编号汇总于表 2 中，其中重链可变区 CDR 和轻链可变区 CDR 由 Kabat 编号系统定义。然而，如本领域所公知的，CDR 区也可以基于重链/轻链可变区序列的其它诸如 Chothia 和 IMGT、AbM 或 Contact 编号系统/方法定义，并且不同编号系统/方法所定义的 CDR 区略有差异，但本领域技术人员均可依据常规方法进行确定，而以其它编号系统/方法定义的 CDR 区与本申请采用的 Kabat 所定义的 CDR 区均在本申请保护范围之内。

表 2. 由 Kabat 编号系统定义的 CDR 区的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列 ID 号

描述	抗体编号	SEQ ID No.							
		HCDR1	HCDR2	HCDR3	V _H	LCDR1	LCDR2	LCDR3	V _L
母本抗体	S4B6	7	8	9	5	10	11	12	6
	hS4B6-H1K1	7	8	9	45	10	11	12	46
	hS4B6-H3K3	7	8	9	47	10	11	12	48
	hS4B6-H6K3	7	8	9	49	10	11	12	48
初步人源化抗体	hS4B6-H6K7	7	8	9	49	10	11	12	50
	hS4B6-H6K3-hu01	7	8	9	51	10	11	12	48
	hS4B6-H6K3-hu02	7	8	9	52	10	11	12	48
	hS4B6-H6K3-hu03	13 (X1=D; X2=L)	8	9	53	10	11	12	48
深度人源化抗体	hS4B6-H6K3-hu04	14 (X1=A; X2=M)	8	9	54	10	11	12	48
	hS4B6-H6K3-hu05	7	8	9	55	10	11	12	48
	hS4B6-H6K3-hu06	7	16 (Z1=E, X3=S)	9	56	10	11	12	48
	hS4B6-H6K3-hu07	7	15 (Z1=E, X3=G)	9	57	10	11	12	48
	hS4B6-H6K3-hu08	7	8	9	58	10	11	12	48
	hS4B6-H6K3-hu09	7	8	9	49	10	17 (Z7=S, Z8=T, X4=S)	12	59
	hS4B6-H6K3-hu10	7	8	9	49	10	18 (Z7=S, Z8=T, X4=T)	12	60
	hS4B6-H6K3-hu11	7	8	9	49	10	11	12	61
	hS4B6-H6K3-hu12	7	8	9	49	10	11	12	62
	hS4B6-H6K3(H)	14 (X1=A; X2=M)	15 (Z1=E, X3=G)	9	63	10	17 (Z7=S, Z8=T, X4=S)	12	64
选择的深度人源化抗体	H6K3(H)	14	15	9	63	26 (Z5=Y; Z6=S)	28 (Z7=Q; Z8=T; X4=S)	12	76
	K1G2	14	15	20 (Z2=L, Z3=Y,	65	26 (Z5=Y;	28 (Z7=Q; Z8=T;	12	76

描述	抗体编号	SEQ ID No.						
		HCDR1	HCDR2	HCDR3	V _H	LCDR1	LCDR2	LCDR3
				Z4=S)		Z6=S)	X4=S)	V _L
K1G3	14		19 (Z1=D; X3=G)	9	66	26	28	12
K1G4	14		15	21 (Z2=V, Z3=L, Z4=S)	67	26	28	12
K1G5	14		15	22 (Z2=V, Z3=Y, Z4=T)	68	26	28	12
K1G6	14		19 (Z1=D; X3=G)	20 (Z2=L, Z3=Y, Z4=S)	69	26	28	12
K1G7	14		15	23 (Z2=L, Z3=Y, Z4=T)	70	26	28	12
K1G8	14		15	24 (Z2=L, Z3=L, Z4=S)	71	26	28	12
K1G9	14		15	25 (Z2=L, Z3=L, Z4=T)	72	26	28	12
K1G10	14		19 (Z1=D; X3=G)	23 (Z2=L, Z3=Y, Z4=T)	73	26	28	12
K1G11	14		19 (Z1=D; X3=G)	24 (Z2=L, Z3=L, Z4=S)	74	26	28	12
K1G12	14		19 (Z1=D; X3=G)	25 (Z2=L, Z3=L, Z4=T)	75	26	28	12
K2G1	14		15	9	63	26 (Z5=Y; Z6=S)	17	12
K2G2	14		15	20 (Z2=L, Z3=Y, Z4=S)	65	26	17	12
K2G3	14		19 (Z1=D; X3=G)	9	66	26	17	12
K2G4	14		15	21 (Z2=V, Z3=L, Z4=S)	67	26	17	12
K2G5	14		15	22 (Z2=V, Z3=Y, Z4=T)	68	26	17	12
K2G6	14		19	20 (Z2=L, Z3=Y, Z4=S)	69	26	17	12
K2G7	14		15	23 (Z2=L, Z3=Y, Z4=T)	70	26	17	12

描述	抗体编号	SEQ ID No.							
		HCDR1	HCDR2	HCDR3	V _H	LCDR1	LCDR2	LCDR3	V _L
	K2G8	14	15	24 (Z2=L, Z3=L, Z4=S)	71	26	17	12	77
	K2G9	14	15	25 (Z2=L, Z3=L, Z4=T)	72	26	17	12	77
	K2G10	14	19 (Z1=D; X3=G)	23 (Z2=L, Z3=Y, Z4=T)	73	26	17	12	77
	K2G11	14	19 (Z1=D; X3=G)	24 (Z2=L, Z3=L, Z4=S)	74	26	17	12	77
	K2G12	14	19 (Z1=D; X3=G)	25 (Z2=L, Z3=L, Z4=T)	75	26	17	12	77
	K3G1	14	15	9	63	27 (Z5=Y; Z6=G)	28 (Z7=Q; Z8=T; X4=S)	12	78
	K3G2	14	15	20 (Z2=L, Z3=Y, Z4=S)	65	27	28	12	78
	K3G3	14	19 (Z1=D; X3=G)	9	66	27	28	12	78
	K3G4	14	15	21 (Z2=V, Z3=L, Z4=S)	67	27	28	12	78
	K3G5	14	15	22 (Z2=V, Z3=Y, Z4=T)	68	27	28	12	78
	K3G6	14	19 (Z1=D; X3=G)	20 (Z2=L, Z3=Y, Z4=S)	69	27	28	12	78
	K3G7	14	15	23 (Z2=L, Z3=Y, Z4=T)	70	27	28	12	78
	K3G8	14	15	24 (Z2=L, Z3=L, Z4=S)	71	27	28	12	78
	K3G9	14	15	25 (Z2=L, Z3=L, Z4=T)	72	27	28	12	78
	K3G10	14	19 (Z1=D; X3=G)	23 (Z2=L, Z3=Y, Z4=T)	73	27	28	12	78
	K3G11	14	19 (Z1=D; X3=G)	24 (Z2=L, Z3=L, Z4=S)	74	27	28	12	78
	K3G12	14	19 (Z1=D; X3=G)	25 (Z2=L, Z3=L, Z4=T)	75	27	28	12	78
	K4G1	14	15	9	63	27	17	12	79

描述	抗体编号	SEQ ID No.							
		HCDR1	HCDR2	HCDR3	V _H	LCDR1	LCDR2	LCDR3	V _L
	K4G2	14	15	20 (Z2=I, Z3=Y, Z4=S)	65	27	17	12	79
	K4G3	14	19 (Z1=D; X3=G)	9	66	27	17	12	79
	K4G4	14	15	21 (Z2=V, Z3=L, Z4=S)	67	27	17	12	79
	K4G5	14	15	22 (Z2=V, Z3=Y, Z4=T)	68	27	17	12	79
	K4G6	14	19	20 (Z2=I, Z3=Y, Z4=S)	69	27	17	12	79
	K4G7	14	15	23 (Z2=I, Z3=Y, Z4=T)	70	27	17	12	79
	K4G8	14	15	24 (Z2=I, Z3=L, Z4=S)	71	27	17	12	79
	K4G9	14	15	25 (Z2=I, Z3=L, Z4=T)	72	27	17	12	79
	K4G10	14	19 (Z1=D; X3=G)	23 (Z2=I, Z3=Y, Z4=T)	73	27	17	12	79
	K4G11	14	19 (Z1=D; X3=G)	24 (Z2=I, Z3=L, Z4=S)	74	27	17	12	79
	K4G12	14	19 (Z1=D; X3=G)	25 (Z2=I, Z3=L, Z4=T)	75	27	17	12	79

用于本申请的抗 IL-2 抗体中优选的框架序列是与本申请亲本抗体框架序列在结构上相似的（或同源性高的）受体框架区。在一些实施方案中，可以将 VH 或 VL 的 CDR1 区序列、CDR2 区序列和 CDR3 区序列分别移植到受体框架区，所述的受体框架区具有与其所在种系免疫球蛋白基因相同或同源性最高的序列。在一个具体实施方案中，本申请选择将 SEQ ID NO: 5 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 的 CDR 区分别移植到人源 IgG FR 区得到人源化抗体，所述人源化抗体能够保持与包含 SEQ ID NO:5 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 6 所示的 VL 氨基酸序列母本抗体相似的抗原结合活性。

此外，还可以将结合至 hIL-2 的其它抗 IL-2 抗体的 VH 和 VL 序列（或 CDR 序列）与本申请的抗 IL-2 抗体的 VH 和 VL 序列（或 CDR 序列）进行“混合和匹配”。优选地，当将 VH 和 VL 链（或这些链内的 CDR）进行混合和匹配时，来自特定的 VH/VL 对的 VH 序列被结构相似的 VH 序列进行替代。同样地，优选地，来自特定的 VH/VL 对的 VL 序列被结构相似的 VL 序列进行替代。

因此，在一个实施方案中，本申请的抗体或其抗原结合片段包括：

- (a) 重链可变区，该重链可变区包含表 2 所列出的氨基酸序列；以及
- (b) 轻链可变区，该轻链可变区包含表 2 所列出的氨基酸序列，或者，另一个抗 IL-2 抗体的 VL，其中，该抗体特异性地结合 hIL-2 变体。

在一个具体实施方案中，本申请的人源化抗体包含与 SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO:47 或 SEQ ID NO:49 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VH 氨基酸序列。

在一个具体实施方案中，本申请的人源化抗体包含与 SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48 或 SEQ ID NO:50 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VL 氨基酸序列。

在一个具体实施方案中，本申请的人源化抗体包含与 SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47 或 SEQ ID NO:49 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VH 氨基酸序列，以及与 SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48 或 SEQ ID NO:50 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VL 氨基酸序列。

在一个更具体实施方案中，本申请的人源化抗体包含与 SEQ ID NO:45 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO:46 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VL 氨基酸序列；或与 SEQ ID NO:47 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO:48 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VL 氨基酸序列；或与 SEQ ID NO:49 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO:48 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VL 氨基酸序列；或与 SEQ ID NO:49 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO:50 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VL 氨基酸序列。优选的人源化抗体包含与 SEQ ID NO: 45 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO:46 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VL 氨基酸序列；或与 SEQ ID NO: 49 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO:48 或 50 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VL 氨基酸序列。更优选的人源化抗体包含与 SEQ ID NO: 49 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO:48 所

示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的 VL 氨基酸序列。

在一些实施方案中，可以将 CDR 序列移植到与种系序列相比包含一个、或两个、或两个以上突变的框架区上。例如，已经发现的情况，使框架区内的氨基酸残基发生突变可以维持或增强抗体的抗原结合能力（参见例如，美国专利号：US5,530,101；US5,585,089；US5,693,762 和 US6,180,370）。在一些实施方案中，将本申请所述亲本抗体的 CDR 移植到与种系序列相比具有一个、或两个、或两个以上突变的受体框架区上，可以提高本申请的抗 IL-2 抗体的人源化程度。在具体的实施方案中，将 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 的 FR 区上进行一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，可以在 FR1、FR2、或 FR3 上进行一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，进一步可以在 FR1、FR2 或 FR3 上分别进行一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，以提高本申请的抗 IL-2 抗体的人源化程度。优选在 FR1 第 27 位的天冬氨酸残基、在 FR1 第 29 位的异亮氨酸残基、在 FR2 第 13 位的异亮氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 氨基酸序列第 48 位）、和/或在 FR3 第 11 位的天冬酰胺残基（对应于 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 氨基酸序列第 76 位）进行突变。在具体实施方案中，将 SEQ ID NO: 48 所示的 VL 的 FR 区上进行一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，可以选择 FR3 上进行一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，以提高本申请的抗 IL-2 抗体的人源化程度。优选在 FR3 第 10 位的精氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 48 所示的 VL 氨基酸序列第 66 位）和/或在 FR3 第 15 位的酪氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 48 所示的 VL 氨基酸序列第 71 位）进行突变。

在一些实施方案中，还可以对人源化抗体的 VH 和/或 VL 的 CDR 区进行氨基酸突变，以改善目标抗体的一种或多种特性（例如，提高人源化程度、提高表达量、降低潜在的异构化风险、改善结合特性）。可以进行定点突变或 PCR 诱导突变，并且能够以本领域已知的体外或体内检测方法评价所述突变对抗体结合能力或其它功能性质的影响。突变可以是氨基酸取代、添加或缺失，优选氨基酸取代。特别地，CDR 区内不超过 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸残基发生突变。在一个具体实施方案中，将 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 的 CDR 区进行一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，进一步可在 HCDR1 和/或 HCDR2 进行一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，优选地，可以在 HCDR1 的第 1 位丙氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 第 31 位）、第 4 位亮氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 第 34 位）和/或 HCDR2 的第 17 位天冬酰胺残基（对应于 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 第 65 位）进行一个、或两个、或两个以上氨基酸突变。

在另一些实施方案中，本申请还涉及对抗体进行异构化改造。由于异构化会引起抗体构象发生变化，从而改变抗体表面电荷，导致抗体电荷异质性发生。在优选的实施方案中，本申请的抗体不包含天冬氨酸异构位点。天冬氨酸异构化可发生在 D-G 序列上，从而产生异天冬氨酸残基，由于该氨基酸残基引入了连接键到多肽链中，导致该多肽链的稳定性降低（又称为异天冬氨酸效应）。在一个实施例中，将 SEQ ID NO: 48 所示的 VL 的 CDR 区进行一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，进一步可在 LCDR2 进行一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，优选地，可以在 LCDR2 的第 7 位天冬氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 48 所示的 VL 第 56 位）进行氨基酸突变，以降低天冬氨酸异构化的风险。

在一些实施方案中，还可以对人源化抗体的可变区的 CDR 区和框架区进行组合氨基酸突变，以更大程度地改善目标抗体的一种或多种特性（例如，提高人源化程度、改善结合特性、降低了潜在的异构化风险、提高表达量）。在一个具体实施方案中，通过对上述人源化抗体的 SEQ ID NO:49 所示的 VH 的两个 CDR 区、1 个 FR 区和 SEQ ID NO:48 所示的 VL 的 1 个 CDR 区、1 个 FR 区进行多个氨基酸突变，优选地，对所述 SEQ ID NO:49 所示的 VH 的 HCDR1 的第 4 位亮氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 第 34 位，例如突变后的氨基酸序列可为如 SEQ ID NO:14 所示的 HCDR1）、HCDR2 的第 17 位天冬酰胺残基（对应于 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 第 65 位，例如突变后的氨基酸序列可为如 SEQ ID NO: 15 或 16 所示的 HCDR2）、在 FR3 第 11 位的天冬酰胺残基（对应于 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 氨基酸序列第 76 位，例如突变后的氨基酸序列可为如 SEQ ID NO: 58 所示的 VH），以及 SEQ ID NO: 48 所示的 VL 的 LCDR2 的第 7 位天冬氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 48 所示的 VL 第 56 位，例如突变后的氨基酸序列可为如 SEQ ID NO: 17 或 18 所示的 LCDR2）、FR3 第 15 位的酪氨酸残基（对应于 SEQ ID NO: 48 所示的 VL 氨基酸序列第 71 位，例如突变后的氨基酸序列可为如 SEQ ID NO: 62 所示的 VL）进行多个氨基酸突变组合，不仅使本申请的人源化抗体具备了更高的人源化水平，并且保留了与本申请的 hIL-2 变体的结合亲和力 (K_D 值约 10^{-8} M)，同时还降低了天冬氨酸异构化的风险。

在另一些实施方案中,本申请提供了分离的抗 IL-2 单克隆抗体或其抗原结合片段,所述的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含:(a) V_H CDR1 区,其包含本申请的序列或者具有 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸突变的氨基酸序列;(b) V_H CDR2 区,其包含本申请的序列或者具有 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸突变的氨基酸序列;(c) V_H CDR3 区,其包含本申请的序列或者具有 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸突变的氨基酸序列;(d) V_L CDR1 区,其包含本申请的序列或者具有 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸突变的氨基酸序列;(e) V_L CDR2 区,其包含本申请的序列或者具有 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸突变的氨基酸序列;以及 (f) V_L CDR3 区,其包含本申请的序列或者具有 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸突变的氨基酸序列。

在一些具体实施方案中,为了进一步提高所述抗 IL-2 单克隆抗体与本申请的 hIL-2 变体的结合亲和力,例如, $<5 \times 10^{-9}$ M, 或 $<1 \times 10^{-9}$ M, 更优选地, $<6 \times 10^{-10}$ M, 对所述抗 IL-2 抗体的重链 CDR 和轻链 CDR 上特定位点氨基酸进行突变。由于 CDR3 (尤其是 HCDR3) 结构域不依赖于 CDR1 结构域和/或 CDR2 结构域,对抗原的结合特异性十分重要,并且相对于其它两个 CDR 结构域具有更大的多样性,因此,在一个具体实施方案中,本申请对包含 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 进行了一个、两个和/或三个氨基酸突变,所述氨基酸突变位于 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 的第 1 位缬氨酸残基、第 4 位酪氨酸残基、和/或第 6 位丝氨酸残基,优选地所述氨基酸突变包括 V1R、V1I、V1T、Y4H、Y4L、Y4W 或 S6A、S6R、S6N、S6D、S6Q、S6E、S6H、S6I、S6L、S6K、S6F、S6P、S6T、S6W、S6Y、S6V。在一个具体实施方案中,本申请还对包含 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 进行了一个、或两个、或两个以上氨基酸突变,优选 1 个氨基酸突变,所述氨基酸突变位于 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 的第 5 位谷氨酸残基,优选的氨基酸突变是 E5D。在一个具体实施方案中,进一步将 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 上的一个、两个和/或三个氨基酸突变与 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 上氨基酸突变进行组合,优选的氨基酸突变是 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 上的 V1I、Y4L、S6T 一个、两个和/或三个氨基酸突变与 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 上氨基酸突变 E5D 进行组合。在一个具体实施方案中,本申请对 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 和/或 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 进行氨基酸一个、或两个、或两个以上氨基酸突变,所述氨基酸突变包括位于 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 第 5 位天冬氨酸残基或第 7 位甘氨酸残基,和/或位于 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 第 1 位丝氨酸残基或第 3 位苏氨酸,所述氨基酸突变包括 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 上的 D5N、D5H、D5I、D5L、D5F、D5Y 和/或 G7A、G7R、G7N、G7Q、G7I、G7L、G7S、G7T、G7D, 和/或 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 上的 S1R、S1Q、S1T、S1W、S1Y 或 T3G, 优选的氨基酸突变包括 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 上的 D5N、D5H、D5L、D5Y 和/或 G7I、G7L、G7S、G7T, 和/或 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 上的 S1Q 或 T3G。

在一个具体实施方案中,可以选择上述任意一个、或两个、或两个以上所述重链 CDR 区突变和/或任意一个、或两个、或两个以上所述轻链 CDR 区突变。选择任意一个所述重链 CDR 区突变和任意一个所述轻链 CDR 区突变进行组合时,能够保持包含 SEQ ID NO: 63 所示的 V_H 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 64 所示的 V_L 氨基酸序列的本申请的抗 IL-2 人源化抗体与本申请的 hIL-2 变体的结合亲和力。选择两个、或两个以上所述重链 CDR 区突变和/或任意一个、或两个、或两个以上所述轻链 CDR 区突变进行组合时,能够显著提高所述抗 IL-2 人源化抗体与 hIL-2 变体的结合亲和力至 $<10^{-9}$ M, 甚至 $<6 \times 10^{-10}$ M。

在一个实施例中,可选择一个所述轻链 CDR 区突变或与所述重链 CDR 区任一个、两个、三个或四个突变进行组合,其中,所述轻链 CDR 区氨基酸突变包括 D28Y (位于 SEQ ID NO: 64 所示的 V_L 氨基酸序列第 28 位天冬氨酸,对应于 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 第 5 位),所述的重链 CDR 区氨基酸突变包括 V95I (位于 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 的第 1 位缬氨酸残基,对应于 SEQ ID NO: 63 所示的 V_H 氨基酸序列第 95 位)、E53D (位于 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 的第 5 位谷氨酸残基,对应于 SEQ ID NO: 63 所示的 V_H 氨基酸序列第 53 位)、S100T (位于 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 的第 6 位丝氨酸残基,对应于 SEQ ID NO: 63 所示的 V_H 氨基酸序列第 100 位) 和 Y98L (位于 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 的第 4 位酪氨酸残基,对应于 SEQ ID NO: 63 所示的 V_H 氨基酸序列第 98 位),所述重链 CDR 区两个氨基酸突变包括 V95I 与选自 E53D、S100T 或 Y98L 中的任意一个,所述重链 CDR 区三个氨基酸突变包括 V95I 与选自 E53D、S100T 或 Y98L 中的任意两个,所述重链 CDR 区四个氨基酸突变包括 V95I、E53D、S100T 和 Y98L。

在另一个实施例中,选择两个所述轻链 CDR 区氨基酸突变或与所述重链 CDR 区任一个、两个、三个或四个氨基酸突变进行组合,所述轻链 CDR 区氨基酸突变包括 D28Y 与 G30S (位于 SEQ ID NO:

64 所示的 VL 氨基酸序列第 30 位甘氨酸, 对应于 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 第 7 位) 或 S50Q (位于 SEQ ID NO: 64 所示的 VL 氨基酸序列第 50 位丝氨酸, 对应于 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 第 1 位), 所述重链 CDR 区一个氨基酸突变包括 V95I、E53D、Y98L 或 S100T, 所述重链 CDR 区两个氨基酸突变包括 V95I 与选自 E53D、S100T 或 Y98L 中任意一个, 所述的重链 CDR 区三个氨基酸突变包括 V95I 与选自 E53D、S100T 或 Y98L 中的任意两个, 所述重链 CDR 区四个氨基酸突变包括 V95I、E53D、S100T 和 Y98L。

在另一个实施例中, 选择三个所述轻链 CDR 区突变或与所述重链 CDR 区任一个、两个、三个或四个突变进行组合, 所述的轻链 CDR 区突变包括 D28Y、G30S 和 S50Q, 所述重链 CDR 区一个氨基酸突变包括 V95I、E53D、Y98L 或 S100T, 所述的重链 CDR 区两个突变包括 V95I 与选自 E53D、S100T 或 Y98L 中的任意一个, 所述的重链 CDR 区三个突变包括 V95I 与选自 E53D、S100T 或 Y98L 中的任意两个, 所述重链 CDR 区四个氨基酸突变包括 V95I、E53D、S100T 和 Y98L。

在另一个实施例中, 所述重链 CDR 区氨基酸突变和轻链 CDR 区氨基酸突变组合包括所述重链 CDR 区四个氨基酸突变与轻链 CDR 区氨基酸突变 D28Y 的组合, 或重链 CDR 区三个或四个氨基酸突变与轻链 CDR 区两个氨基酸突变 D28Y 与 S50Q 或 G30S 的组合, 所述重链 CDR 区三个氨基酸突变是 V95I 与选自 E53D、S100T 或 Y98L 中的任意两个, 或重链 CDR 区两个或三个或四个氨基酸突变与轻链 CDR 区三个氨基酸突变 D28Y、G30S 和 S50Q 的组合, 所述重链 CDR 区两个氨基酸突变是 V95I 和 Y98L, 所述重链 CDR 区三个氨基酸突变是 V95I 与选自 E53D、S100T 或 Y98L 中的任意两个, 具体包括重链 CDR 区氨基酸突变 V95I、S100T、Y98L 和 E53D 与轻链 CDR 区氨基酸突变 D28Y, 重链 CDR 区氨基酸突变 V95I、E53D 和 Y98L 与轻链 CDR 区氨基酸突变 D28Y 和 S50Q, 重链 CDR 区氨基酸突变 V95I 与选自 E53D、S100T 或 Y98L 中的任意两个和轻链 CDR 区氨基酸突变 D28Y 和 G30S, 重链 CDR 区氨基酸突变 V95I、S100T、Y98L 和 E53D 与轻链 CDR 区氨基酸突变 D28Y 和 G30S, 重链 CDR 区氨基酸突变 V95I 和 Y98L 与轻链 CDR 区氨基酸突变 D28Y、G30S 和 S50Q, 重链 CDR 区氨基酸突变 V95I 与选自 E53D、S100T 或 Y98L 中的任意两个和轻链 CDR 区氨基酸突变 D28Y、G30S 和 S50Q, 或重链 CDR 区突变 V95I、S100T、Y98L 和 E53D 与轻链 CDR 区突变 D28Y、G30S 和 S50Q。所述的突变组合均能显著提升本申请的包含 SEQ ID NO: 63 所示的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 64 所示的 VL 氨基酸序列的抗 IL-2 人源化抗体与本申请的 hIL-2 变体的结合亲和力至最高约 5×10^{-10} M, 并且显著降低了所述人源化抗体与所述 hIL-2 变体的解离常数 (K_{dis}) 至约 $10^{-3} s^{-1}$ 或更低, 甚至 $< 3 \times 10^{-4} s^{-1}$, 或将所述人源化与所述 hIL-2 变体的平衡解离常数 (K_D) 降低了 2 个数量级以上、甚至是 3 个数量级以上。

在一个实施方案中, 本申请的抗体包含含有 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列的重链可变区和/或含有 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列的轻链可变区, 其中:

- (a) 重链可变区 CDR1 序列包含表 2 所列出的序列和/或其保守修饰; 和/或
- (b) 重链可变区 CDR2 序列包含表 2 所列出的序列和/或其保守修饰; 和/或
- (c) 重链可变区 CDR3 序列包含表 2 所列出的序列及其保守修饰; 和/或
- (d) 轻链可变区 CDR1 序列和/或 CDR2 序列和/或 CDR3 序列包含表 2 所列出的序列和/或其保守修饰; 以及
- (e) 所述抗体与 IL2R α 竞争性结合本申请的 hIL-2 变体并且阻断所述 hIL-2 变体与 IL2R α 的结合。

在一些实施方案中, 本申请的抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1; 如 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2; 如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 34 所示的 HCDR3; 以及

如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43 或 SEQ ID NO: 44 所示的 LCDR1; 如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 33 所示的 LCDR2; 如 SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR3。

在一些具体实施方案中, 本申请的抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 7 或 14 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO: 8、15、16 或 19 所示的 HCDR2, 如 SEQ ID NO: 9、20、21、22、23、24 或 25 所示的 HCDR3; 以及

如 SEQ ID NO: 10、26 或 27 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO: 11、17、18 或 28 所示的 LCDR2,

如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3。

在一些实施方案中,本申请的抗体或其抗原结合片段包含:与 SEQ ID NO: 5、45、47、49、51、52、53、54、55、56、57、58、63、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、86 或 112 所示的序列具有至少 85% (例如至少 88%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%) 同一性的重链可变区 VH; 以及与 SEQ ID NO: 6、46、48、50、59、60、61、62、64、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、87、88、89、90、91、92、93、104、105、106、107、108、109、110 或 111 所示的序列具有至少 85% (例如至少 88%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%) 同一性的轻链可变区 VL。

本申请的抗 IL-2 人源化抗体还具有一种或多种如下功能特性,例如,与本申请的 hIL-2 变体的结合亲和力可达到约 5×10^{-10} M,更重要的是,所述人源化抗体与所述 hIL-2 变体的解离常数降低至约 3×10^{-4} 1/s,使得二者相对更不易发生解离,显著降低了因二者解离而暴露 hIL-2 的 IL2R α 结合位点的几率;本申请的抗体人源化程度进一步提高,且本申请的 hIL-2 变体上的突变氨基酸残基均为包埋于抗原-抗体结合界面内的状态,因此极大程度地降低了诱导 ADA 的风险。

3、本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白

一方面,本申请还提供了一种 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白,所述融合蛋白在 hIL-2 或本申请的 hIL-2 变体与抗 IL-2 抗体或抗原结合片段的抗原-抗体结合界面设计引入了二硫键,使二者之间形成超稳定的共价结合结构,以确保 hIL-2 或其变体的 α 亚基受体结合位点始终被包埋在构建的融合蛋白分子的内部而不会因抗原-抗体复合物的解离而被暴露,并且不会因为抗原-抗体的亲和力不够强而被高亲和力 IL2R 竞争性地结合。

本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白,其包含:

- (1) 如 SEQ ID NO:1 所示的野生型人白细胞介素 2 (hIL-2) 或本申请的 hIL-2 变体,和
- (2) 与 IL2R α 竞争性结合所述 hIL-2 或本申请的 hIL-2 变体的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段,以及
- (3) 所述 hIL-2 或本申请的 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面包含的二硫键。

本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白不与 IL2R 的 α 亚基、或 α/β 二聚体、或 $\alpha/\beta/\gamma$ 三聚体结合,但是保留了对 IL2R β 和 γ 受体亚基二聚体 (IL2R β/γ) 的结合以及功能活性。

由此,本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白具有以下功能特性:

- (i) 本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白不与 Treg 细胞表面的高亲和力 IL2R 结合,有效避免了 Treg 细胞介导的肿瘤免疫抑制作用。
- (ii) 本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白不与正常组织 (例如,血管内皮、肺部毛细血管内皮等) 或 ILC2 细胞 (Type-2 innate lymphoid cells, II 型先天性淋巴样细胞) 上的高亲和力 IL2R 结合,从而显著改善现有 IL-2 产品在体内所诱导的毒副作用 (例如, VLS、肺水肿、低血压等)。
- (iii) 本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白具有稳定的分子结构,不会出现现有技术中 hIL-2/hIL-2 抗体复合物解离的情况,从而有效避免了 hIL-2/hIL-2 抗体复合物因解离而暴露了 hIL-2 的 IL2R α 结合位点,因此避免了潜在的由高亲和力 IL-2R 所介导的毒性以及 Treg 激活而导致的治疗窗口狭窄的问题。
- (iv) 本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白不仅可以特异性结合于效应 T (Teff) 细胞 (例如记忆性 CD8⁺ T 细胞) 和/或 NK 细胞,促进 Teff 细胞和/或 NK 细胞增殖,还能诱导 Teff 细胞和/或 NK 细胞中 IL-2 信号传导,激活其肿瘤杀伤活性,但不会激活 Treg 细胞中 IL-2 信号传导以及其细胞活性,并且不会对常规 CD4⁺ T 细胞 (conventional CD4⁺ T cells, Tconv) 产生不良影响。
- (v) 本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白免疫原性低,所有突变序列包埋于抗原-抗体结合界面内,显著降低了潜在的 ADA 风险。
- (vi) 本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白稳定性好,容易生产制备,且表达量高,有利于降低生产成本。
- (vii) 本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白具有较长的半衰期,在体内具有有效而持久的免疫刺激作用和抗肿瘤活性,且不激活或诱导机体的肿瘤免疫抑制作用。

所述 hIL-2 或本申请的 hIL-2 变体与抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面包含二硫键,所述二硫键是通过在所述抗原-抗体结合界面的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的序列中引入的至少一个半胱氨酸残基与通过在所述抗原-抗体结合界面的 hIL-2 或其变体的序列中引入的至少一个半胱氨酸残基所形成的。

所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段能够与 IL2R α 竞争性结合所述 hIL-2 或其变体,并且能够阻断所述 hIL-2 或其变体与 IL2R α 或包含有 α 亚基的 IL-2 受体聚合体(即 IL2R α / β 或 IL2R α / β / γ)的结合。在一些实施方案中,所述抗 IL-2 抗体能特异性结合所述 hIL-2 或其变体的 IL2R α 结合位点。在一些实施方案中,所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段与 hIL-2 变体的结合亲和力(K_D) $<5\times 10^{-8}$ M, 优选地, $<1\times 10^{-8}$ M, $<5\times 10^{-9}$ M, 或 $<1\times 10^{-9}$ M, 更优选地, $<6\times 10^{-10}$ M。在一些实施方案中,所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段与 hIL-2 变体的解离常数(K_{dis}) $<5\times 10^{-3}$ s $^{-1}$ 、 1×10^{-3} s $^{-1}$ 、 $<5\times 10^{-4}$ s $^{-1}$ 或 $<3\times 10^{-4}$ s $^{-1}$ 。

所述 hIL-2 或本申请的 hIL-2 变体与抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面包含了 hIL-2 或其变体与 IL2R α 的结合界面,或所述的抗原-抗体结合界面与 hIL-2 或本申请的 hIL-2 变体与 IL2R α 的结合界面存在部分重叠。在一些实施方案中,所述的 hIL-2 或其变体与所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面位于所述 hIL-2 或其变体的 AB 环、B 螺旋、C 螺旋、BC 环和/或 CD 环,优选位于所述 hIL-2 或其变体的 AB 环、B 螺旋、C 螺旋和 CD 环;所述的 hIL-2 或其变体的 IL2R α 结合界面位于 hIL-2 或其变体的 AB 环和 B 螺旋。在具体的实施方案中,所述 hIL-2 或其变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的结合界面位于所述 hIL-2 或其变体的第 30-45 位或其邻近的氨基酸残基、第 57-77 位或其邻近的氨基酸残基、和/或第 90-111 位或其邻近的氨基酸残基。在一些实施方案中,所述 hIL-2 或其变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的结合界面位于所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的可变区。

在一些实施方案中,本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的 hIL-2 变体包含前述本申请的 hIL-2 变体,其相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 包含以下一种或多种氨基酸突变:(a) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 64 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 K64G;或(b) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 90 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 N90R;或(c) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 104 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 M104E, 优选的所述氨基酸突变是 K64G 和/或 N90R, 或 K64G、N90R 和 M104E, 更优选的所述氨基酸突变是 K64G 和 N90R。在具体实施方案中,所述 hIL-2 变体包含 SEQ ID NO: 2 或 3 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中,本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含前述本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段以及其它能够特异性识别 hIL-2 上 IL2R α 结合位点的抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段,优选的其它抗 IL-2 人源化抗体选自如 PCT 公开专利申请 WO2016005950 所述的 NARA1 和如 PCT 公开专利申请 WO 2018217058 所述的 TCB2。

在具体实施方案中,本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列,以及 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列,或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

在具体实施方案中,本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含:(1) 氨基酸序列为 X1YYX2H (X1=A 或 D; X2=L 或 M) 的 HCDR1, (2) 如 SEQ ID NO: 230 所示的氨基酸序列为 RIDPZ1DDSTKYAENFKX3 (Z1=E 或 D; X3=N、S 或 G) 的 HCDR2, (3) 如 SEQ ID NO: 231 所示的氨基酸序列为 Z2TFZ3YZ4RELRFAY (Z2=V、I、R 或 T; Z3=Y、L、H 或 W; Z4=S、T、A、R、N、D、Q、E、H、I、L、K、F、P、W、Y 或 V) 的 HCDR3, 优选地, Z2=V 或 I; Z3=Y 或 L; Z4=S 或 T, (4) 如 SEQ ID NO: 232 所示的氨基酸序列为 QASQZ5IZ6NYLS (Z5=D、Y、N、H、I、L 或 F; Z6=G、S、A、R、N、Q、I、L、T 或 D) 所示的 LCDR1, 优选地, Z5=D 或 Y; Z6=G 或 S, (5) 如 SEQ ID NO: 233 所示的氨基酸序列为 Z7AZ8SLAX4 (Z7=S、Q、R、T、W 或 Y; Z8=T 或 G; X4=D、S 或 T) 所示的 LCDR2, 优选地, Z7=S 或 Q; Z8=T; X4=S, 和 (6) 如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列为 LQHYSTPYT 的 LCDR3, 或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

在一些实施方案中,上述的抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1; 如 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2; 如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 34 所示的 HCDR3;

以及

如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43 或 SEQ ID NO: 44 所示的 LCDR1；如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 33 所示的 LCDR2；如 SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR3。

在一些实施方案中，上述的抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO: 7 或 14 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 8、15、16 或 19 所示的 HCDR2，如 SEQ ID NO: 9、20、21、22、23、24、25、29 或 34 所示的 HCDR3；以及

如 SEQ ID NO: 10、26、27、30、31、35、36 或 37 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO: 11、17、18、28、32 或 33 所示的 LCDR2，如 SEQ ID NO: 12 或 38 所示的 LCDR3。

在一个具体实施方案中，本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其包含：

(1) SEQ ID NO: 13 (其中 X1=D; X2=L) 或 14 (其中 X1=A; X2=M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2 (其中 Z1=E; X3=N) 氨基酸序列、SEQ ID NO: 9 (其中 Z2=V; Z3=Y; Z4=S) 所示的 HCDR3 氨基酸序列、SEQ ID NO: 10 (其中 Z5=D; Z6=G) 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 11 其中 Z7=S; Z8=T; X4=D) 所示的 LCDR2 氨基酸序列、和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸，或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(2) SEQ ID NO: 7 (其中 X1=A; X2=L) 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 15 (其中 Z1=E; X3=G) 或 16 (其中 Z1=E; X3=S) 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 9 (其中 Z2=V; Z3=Y; Z4=S) 所示的 HCDR3 氨基酸序列、SEQ ID NO: 10 (其中 Z5=D; Z6=G) 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 11 (其中 Z7=S; Z8=T; X4=D) 所示的 LCDR2 氨基酸序列、和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列，或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(3) SEQ ID NO: 7 (其中 X1=A; X2=L) 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 8 (其中 Z1=E; X3=N) 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 9 (其中 Z2=V; Z3=Y; Z4=S) 所示的 HCDR3 氨基酸序列、SEQ ID NO: 10 (其中 Z5=D; Z6=G) 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 17 (其中 Z7=S; Z8=T; X4=S) 或 18 (其中 Z7=S; Z8=T; X4=T) 所示的 LCDR2 氨基酸序列、和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸，或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(4) SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1 (其中 X1=A; X2=M) 氨基酸序列、SEQ ID NO: 15 (其中 Z1=E; X3=G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 9 (其中 Z2=V; Z3=Y; Z4=S) 所示的 HCDR3 氨基酸序列、SEQ ID NO: 10 (其中 Z5=D; Z6=G) 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 17 (其中 Z7=S; Z8=T; X4=S) 所示的 LCDR2 氨基酸序列、和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸，或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

在一个实施例中，本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其包含：SEQ ID NO: 14 (其中 X1=A; X2=M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 15 (其中 Z1=E; X3=G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 9 (其中 Z2=V; Z3=Y; Z4=S) 所示的 HCDR3 氨基酸序列、SEQ ID NO: 10 (其中 Z5=D; Z6=G) 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 17 (其中 Z7=S; Z8=T; X4=S) 所示的 LCDR2 氨基酸序列、和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸，或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

在具体实施方案中，本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其包含：(1) 氨基酸序列为 X1YYX2H (其中 X1=A; X2=M；即，SEQ ID NO: 14 示出的序列) 的 HCDR1，(2) 氨基酸

序列为 RIDPZ1DDSTKYAENFKX3 (Z1=E 或 D; X3=G; 即, SEQ ID NO: 15 或 19 示出的序列) 的 HCDR2, (3) 氨基酸序列为 Z2TFZ3YZ4RELRFAY (Z2=V、I、R 或 T; Z3=Y、L、H 或 W; Z4=S、T、A、R、N、D、Q、E、H、I、L、K、F、P、W、Y 或 V; SEQ ID NO: 231) 的 HCDR3, 优选地, Z2=V 或 I; Z3=Y 或 L; Z4=S 或 T, (4) 氨基酸序列为 QASQZ5IZ6NYLS (Z5=D、Y、N、H、I、L 或 F; Z6=G、S、A、R、N、Q、I、L、T 或 D; SEQ ID NO: 232) 所示的 LCDR1, 优选地, Z5=D 或 Y; Z6=G 或 S, (5) 氨基酸序列为 Z7AZ8SLAX4 (Z7=S、Q、R、T、W 或 Y; Z8=T 或 G; X4=D、S 或 T; SEQ ID NO: 233) 所示的 LCDR2, 优选地, Z7=S 或 Q; Z8=T; X4=S, 和 (6) 氨基酸序列为 LQHYSTPYT (如 SEQ ID NO: 12 所示) 的 LCDR3, 或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中, 本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其包含:

(1) SEQ ID NO: 14 (其中 X1=A; X2=M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 15 (其中 Z1=E; X3=G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 9 (其中 Z2=V; Z3=Y; Z4=S) 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 26 (其中 Z5=Y; Z6=S) 或 27 (其中 Z5=Y; Z6=G) 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 17 (其中 Z7=S; Z8=T; X4=S) 或 28 (其中 Z7=Q; Z8=T; X4=S) 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸, 或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列; 或

(2) SEQ ID NO: 14 (其中 X1=A; X2=M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 15 (其中 Z1=E; X3=G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 20 (其中 Z2=I, Z3=Y, Z4=S)、21 (其中 Z2=V, Z3=L, Z4=S)、22 (其中 Z2=V, Z3=Y, Z4=T)、23 (其中 Z2=I, Z3=Y, Z4=T)、24 (其中 Z2=I, Z3=L, Z4=S) 或 25 (其中 Z2=I, Z3=L, Z4=T) 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 26 (其中 Z5=Y; Z6=S) 或 27 (其中 Z5=Y; Z6=G) 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 17 (其中 Z7=S, Z8=T; X4=S) 或 28 (其中 Z7=Q; Z8=T; X4=S) 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸, 或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列; 或

(3) SEQ ID NO: 14 (其中 X1=A; X2=M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 19 (其中 Z1=D; X3=G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 9 (其中 Z2=V; Z3=Y; Z4=S)、20 (其中 Z2=I, Z3=Y, Z4=S)、23 (其中 Z2=I, Z3=Y, Z4=T)、24 (其中 Z2=I, Z3=L, Z4=S) 或 25 (其中 Z2=I, Z3=L, Z4=T) 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 26 (其中 Z5=Y; Z6=S) 或 27 (其中 Z5=Y; Z6=G) 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 17 (其中 Z7=S, Z8=T, X4=S) 或 28 (其中 Z7=Q; Z8=T; X4=S) 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸, 或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

在一个实施例中, 本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其包含:

(1) SEQ ID NO: 14 (其中 X1=A; X2=M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 15 (其中 Z1=E; X3=G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 24 (其中 Z2=I, Z3=L, Z4=S) 或 25 (其中 Z2=I, Z3=L, Z4=T) 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 26 (其中 Z5=Y; Z6=S) 或 27 (其中 Z5=Y; Z6=G) 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 17 (其中 Z7=S, Z8=T, X4=S) 或 28 (其中 Z7=Q; Z8=T; X4=S) 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸, 或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列; 或

(2) SEQ ID NO: 14 (其中 X1=A; X2=M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 19 (其中 Z1=D; X3=G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 24 (其中 Z2=I, Z3=L, Z4=S) 或 25 (其中 Z2=I, Z3=L, Z4=T) 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 26 (其中 Z5=Y; Z6=S) 或 27 (其中 Z5=Y; Z6=G) 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 17 (其中 Z7=S, Z8=T, X4=S) 或 28 (其中 Z7=Q; Z8=T; X4=S) 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸, 或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、

86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

更优选地,所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3,其包含: SEQ ID NO:14 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 19 (其中 Z1=D; X3= G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 24 (其中 Z2=I, Z3=L, Z4=S) 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO:26 (其中 Z5=Y; Z6=S) 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 17 (其中 Z7=S, Z8=T, X4=S) 所示的 LCDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸,或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

在一些实施方案中,本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段进一步包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区以及具有 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区。

在一些实施方案中,本申请的抗体或其抗原结合片段包含:与 SEQ ID NO: 5、45、47、49、51、52、53、54、55、56、57、58、63、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、86 或 112 所示的序列具有至少 80% (例如至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%) 同一性的重链可变区 VH; 以及与 SEQ ID NO: 6、46、48、50、59、60、61、62、64、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、87、88、89、90、91、92、93、104、105、106、107、108、109、110 或 111 所示的序列具有至少 80% (例如至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%) 同一性的轻链可变区 VL。

在一个具体实施方案中,本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区,其包括分别与 SEQ ID NO: 45、47 或 49 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 46、48 或 50 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,优选的是分别与 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 48 或 50 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中,本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区,其包括分别与 SEQ ID NO: 54、55、56、57 或 58 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 48 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;或其包含分别与 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 59、60 或 62 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

在一个实施例中,本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区,其包括分别与 SEQ ID NO: 63 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 64 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

在一个具体的实施方案中,本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区,其包括分别与 SEQ ID NO: 63、65-75 任意一个所示的 VH 和 SEQ ID NO: 76-79 任意一个所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

在一个实施例中,本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区,其包括分别与 SEQ ID NO: 71 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 76 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

在一个实施例中,本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3

的轻链可变区，其包括分别与 SEQ ID NO: 72 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 77 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

在一个实施例中，本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区，其包括分别与 SEQ ID NO: 72 或 74 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 76 或 79 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

在一个实施例中，本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区，其包括分别与 SEQ ID NO: 74 或 75 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 77 或 78 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

在一些实施方案中，本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的 hIL-2 变体与抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面包含二硫键，所述抗原-抗体结合界面与所述 hIL-2 变体与 IL2R α 的结合界面存在重叠。在一个具体实施方案中，所述的 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面位于所述 hIL-2 变体的 AB 环、B 螺旋、C 螺旋和 CD 环，优选位于所述 hIL-2 变体的第 41-45 位或其邻近的氨基酸残基、第 57-68 位或其邻近的氨基酸残基以及第 90-107 位或其邻近的氨基酸残基。

在一些实施方案中，本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的 hIL-2 变体与抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面包含二硫键，所述二硫键是通过在所述抗原-抗体结合界面的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的序列中引入的至少一个半胱氨酸残基与通过在所述抗原-抗体结合界面的 hIL-2 变体的序列中引入的至少一个半胱氨酸残基所形成的。

用于本申请的“引入”或“引入的”是指将母本多肽（例如，本申请所述的野生型 hIL-2 或其变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段）中所对应的原有或天然氨基酸残基进行突变，所述包括取代、插入或添加。例如，如果将母本多肽（例如，本申请所述的野生型 hIL-2 或其变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段）中特定位置处的氨基酸残基称为“原有”或“天然”氨基酸残基，那么其对应的引入的半胱氨酸残基为不同于所述原有氨基酸残基但位于所述母本多肽上的相同位置的半胱氨酸残基。在一些实施方案中，引入的半胱氨酸残基是在相同位置取代原有残基的半胱氨酸残基。在一些实施方案中，引入的半胱氨酸残基是在相同位置或其邻近位置插入或添加半胱氨酸残基或包含半胱氨酸残基的多肽片段。

在一个实施方案中，所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面包含两个或两个以上引入的半胱氨酸残基以形成所述二硫键。在一个具体的实施方案中，所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 在第 42 位、第 60 位、第 61 位、第 64 位、第 65 位、第 102 位和第 104 位氨基酸残基处具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，以引入第一个半胱氨酸残基。在一个实施方案中，所述抗 IL-2 抗体选自本申请的抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段，其包括（1）氨基酸序列为 X1YYX2H（X1=A；X2=M；即，SEQ ID NO: 14 示出的序列）的 HCDR1，（2）氨基酸序列为 RIDPZ1DDSTKYAENFKX3（Z1=E 或 D；X3=G；即，SEQ ID NO: 15 或 19 示出的序列）的 HCDR2，（3）氨基酸序列为 Z2TFZ3YZ4RELRFAY（Z2=V 或 I；Z3=Y 或 L；Z4=S 或 T；例如包括 SEQ ID NO: 9、20、21、22、23、24 或 25 示出的序列）的 HCDR3，（4）氨基酸序列为 QASQZ5IZ6NYLS（Z5=D 或 Y；Z6=G 或 S；例如包括 SEQ ID NO: 10、26 或 27 示出的序列）的 LCDR1，（5）氨基酸序列为 Z7AZ8SLAX4（Z7=S 或 Q；Z8=T；X4=S；即，SEQ ID NO: 17 或 28 示出的序列）的 LCDR2，和（6）如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列为 LQHYSTPYT 的 LCDR3，并且所述抗体或其抗原结合片段在 HCDR3 的第 3 位氨基酸残基处、LCDR1 的第 7 位、第 8 位和/或第 9 位氨基酸残基处、LCDR2 的第 1 位、第 3 位氨基酸残基处、或 LCDR3 第 4 位氨基酸残基处具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，以引入第二个半胱氨酸残基。在一个具体实施方案中，所述抗 IL-2 抗体选自本申请的抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和/或具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区，其包括分别与 SEQ ID NO: 63 所示的 VH 和/或 SEQ ID NO: 64 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或其包括分别与 SEQ ID NO: 63、65-75 任意一个所示的 VH 和/或 SEQ ID NO: 76-79 任意

一个所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列，并且所述抗体或其抗原结合片段在其轻链可变区的框架区具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，以引入第二个半胱氨酸残基，所述氨基酸突变位于所述轻链可变区的第 67 和/或 68 位氨基酸残基处。

为了将所述 hIL-2 变体和/或所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段中特定位点的氨基酸残基突变为半胱氨酸残基，可以操纵所述 hIL-2 变体和/或抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的编码序列，例如将编码天然残基的密码子取代为编码半胱氨酸残基的密码子，或在编码天然残基的位置或其邻近位置插入或添加编码半胱氨酸残基的密码子。

在一个具体实施方案中，在本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的抗原-抗体结合界面的 hIL-2 变体通过氨基酸突变的方式引入第一半胱氨酸残基，在所述抗原-抗体结合界面的抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过氨基酸突变的方式引入第二半胱氨酸残基，优选的氨基酸突变是氨基酸取代、插入或添加，例如，非半胱氨酸残基可以被取代为半胱氨酸残基，或在非半胱氨酸残基所处位置或其邻近位置插入或添加半胱氨酸残基或包含半胱氨酸残基的多肽片段，取代的位置或者插入或添加的位置可以确定为使得所述非半胱氨酸残基在取代成半胱氨酸残基或者插入或添加半胱氨酸残基或包含半胱氨酸残基的多肽片段之后，在本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的抗原-抗体结合界面的 hIL-2 变体和所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段之间能形成二硫键。为此，可以考虑多个因素，包含例如形成二硫键的半胱氨酸残基足够接近，和/或所述取代或者插入或添加不会显著扰乱所述 hIL-2 变体、或抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白本身的三级结构，并且所形成的二硫键应位于抗原-抗体结合界面。

本领域技术人员可使用本领域公知的适合方法，包括但不限于通过光电探测的距离图谱、计算机建模、NMR 光谱或 X 射线晶体衍射，来确定两个待被突变的氨基酸残基之间的距离和角度。在一个实施例中，对于目标蛋白质（例如，IL-2 与抗 IL-2 抗体所形成的抗原-抗体复合物），其蛋白晶体结构可以获取自公共数据库（如 PDB 数据库），或者使用如 X 射线晶体衍射的方法来阐明；也可以使用计算机软件，基于蛋白晶体结构数据确定氨基酸残基之间的距离和角度。进一步地，需要保证在所述 hIL-2 变体引入第一半胱氨酸残基所在的位点和在所述抗 IL-2 人源化抗体或抗原结合片段引入第二半胱氨酸残基所在的位点能够正确配对，从而能够在所述的 hIL-2 变体和所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面形成稳定连接的二硫键，降低其在体内发生解离以及在生产制备过程中发生错配的风险。在一个实施例中，所述能够正确配对的位点位于所述 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面，并且配对氨基酸残基足够接近，例如配对氨基酸残基之间的空间间距小于 10 埃，优选的空间间距是小于 5 埃。

从公开的关于所述 IL-2 与抗 IL-2 抗体形成的抗原-抗体复合物的晶体结构数据中，可以获得 mIL-2/S4B6 抗原-抗体复合物晶体结构（如 PDB ID: 4YUE 所示）中 mIL-2 与 S4B6 各氨基酸残基的距离，以选择适用于在所述 hIL-2 变体和所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原片段分别引入第一和第二半胱氨酸残基所在的位点，并使得它们能够正确配对。一旦确定了引入半胱氨酸残基的配对位点或待被突变的配对氨基酸残基，本领域技术人员可以容易地通过本领域公知的方法（例如，PCR 诱变）将待突变的密码子突变为半胱氨酸密码子。

所述二硫键的形成可以通过本领域公知的适宜方法确定。例如，通过质谱分析的方法进行判断。

所述二硫键能够稳定所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，这种稳定方面的效果体现在各个方面。例如，所述二硫键可以使所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的表达具有更高比例的单体成分，和/或具有良好的热稳定性及血清稳定性，和/或构建为具有特定的生物活性（例如，能够更好阻断所述 hIL-2 变体与 IL2R 的 α 亚基、或 α/β 二聚体、或 $\alpha/\beta/\gamma$ 三聚体的结合，以及保留对 IL2R β/γ 的结合与功能活性）的稳定融合蛋白，和/或表达并组装为具有特定生物活性和特定稳定性的融合蛋白。

在一个具体实施方案中，在所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的 hIL-2 变体与抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面形成二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的配对选自以下一个、或两个、或两个以上配对氨基酸突变的组合：

(1) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的第 42 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 F42C，或第 64 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 K64C，或第 65 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 P65C，和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在氨基酸序列为 Z2TFZ3YZ4RELRFAY（Z2=V 或 I；

Z3=Y 或 L; Z4=S 或 T; 例如包括 SEQ ID NO: 9、20、21、22、23、24 或 25 示出的序列) 的 HCDR3 第 3 位上引入氨基酸突变 F3C 所获得; 和/或

(2) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的第 60 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 E60C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在氨基酸序列为 QASQZ5IZ6NYLS (Z5=D 或 Y; Z6=G 或 S; 例如包括 SEQ ID NO: 10、26 或 27 示出的序列) 的 LCDR1 第 7 位上引入氨基酸突变 G7C 或 S7C 所获得; 和/或

(3) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的第 61 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 E61C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在氨基酸序列为 QASQZ5IZ6NYLS (Z5=D 或 Y; Z6=G 或 S; 例如包括 SEQ ID NO: 10、26 或 27 示出的序列) 的 LCDR1 第 7 位上引入氨基酸突变 G7C 或 S7C 所获得; 或

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在氨基酸序列为 QASQZ5IZ6NYLS (Z5=D 或 Y; Z6=G 或 S; 例如包括 SEQ ID NO: 10、26 或 27 示出的序列) 的 LCDR1 第 8 位上引入氨基酸突变 N8C 所获得; 或

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在氨基酸序列为 Z7AZ8SLAX4 (Z7=S 或 Q; Z8=T; X4=S; 即, SEQ ID NO: 17 或 28 示出的序列) 的 LCDR2 第 1 位上引入氨基酸突变 S1C 或 Q1C 获得; 和/或

(4) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的第 104 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 M104C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在氨基酸序列为 Z7AZ8SLAX4 (Z7=S 或 Q; Z8=T; X4=S; 即, SEQ ID NO: 17 或 28 示出的序列) 的 LCDR2 第 3 位上引入氨基酸突变 T3C 所获得; 和/或

(5) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的第 102 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T102C, 所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其轻链可变区第 67 位上引入氨基酸突变 S67C 所获得; 或

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其轻链可变区第 68 位上引入氨基酸突变 G68C 所获得; 和/或

(6) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的第 64 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 K64C, 和

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在氨基酸序列为 QASQZ5IZ6NYLS (Z5=D 或 Y; Z6=G 或 S; 例如包括 SEQ ID NO: 10、26 或 27 示出的序列) 的 LCDR1 第 9 位上引入氨基酸突变 Y9C 所获得; 或

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在氨基酸序列为 LQHYSTPYT (SEQ ID NO: 12) 的 LCDR3 第 4 位上引入氨基酸突变 Y4C 所获得。

进一步, 在所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段与 hIL-2 变体的抗原-抗体结合界面形成二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的配对选自以下一个、或两个、或两个以上配对氨基酸突变的组合:

(1) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的第 104 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 M104C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其 LCDR2 第 3 位上引入氨基酸突变 T3C 所获得, 所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 14 (其中 X1=A; X2=M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 19 (其中 Z1=D; X3=G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 24 (其中 Z2=I, Z3=L, Z4=S) 所示的 HCDR3 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 26 (其中 Z5=Y; Z6=S) 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 17 (其中 Z7=S; Z8=T; X4=S) 所示的 LCDR2 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列; 和/或

(2) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的第 102 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T102C, 所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其轻链可变区第 67 位上引入氨基酸突变 S67C 所获得, 所述抗 IL-2 人源化抗体或其结合片段包含与 SEQ ID NO: 77 所示的 VL 具有 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列, 或

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其轻链可变区第 68 位上引入氨基酸突变 G68C 所获得, 所述抗 IL-2 人源化抗体或其结合片段包含与 SEQ ID

NO: 77 所示的 VL 具有 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；和/或

(3) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的第 42 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 F42C，或第 64 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 K64C，或第 65 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 P65C，和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在氨基酸序列为 Z2TFZ3YZ4RELRFAY (Z2=V 或 I; Z3=Y 或 L; Z4=S 或 T; 例如包括 SEQ ID NO: 9、20、21、22、23、24 或 25 示出的序列) 的 HCDR3 第 3 位上引入氨基酸突变 F3C 所获得，所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 14 (其中 X1=A; X2=M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 15 (其中 Z1=E; X3=G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 9 (其中 Z2=V, Z3=Y, Z4=S) 所示的 HCDR3 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 10 (其中 Z5=D; Z6=G) 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 17 (其中 Z7=S; Z8=T; X4=S) 所示的 LCDR2 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列；和/或

更优选地，在所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段与 hIL-2 变体的抗原-抗体结合界面形成二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的配对选自以下一个、或两个、或两个以上配对氨基酸突变的组合：

(1) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的第 104 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 M104C，和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在氨基酸序列为 Z7AZ8SLAX4 (Z7=S 或 Q; Z8=T; X4=S; 即，SEQ ID NO: 17 或 28 示出的序列) 的 LCDR2 第 3 位上引入氨基酸突变 T3C 所获得，所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 14 (其中 X1=A; X2=M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 19 (其中 Z1=D; X3=G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 24 (其中 Z2=I, Z3=L, Z4=S) 所示的 HCDR3 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 26 (其中 Z5=Y; Z6=S) 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 17 (其中 Z7=S; Z8=T; X4=S) 所示的 LCDR2 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列；和/或

(2) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的第 102 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T102C，所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其轻链可变区第 67 位上引入氨基酸突变 S67C 所获得，所述抗 IL-2 人源化抗体或其结合片段包含与 SEQ ID NO: 77 所示的 VL 具有 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列，或

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其轻链可变区第 68 位上引入氨基酸突变 G68C 所获得，所述抗 IL-2 人源化抗体或其结合片段包含与 SEQ ID NO: 77 所示的 VL 具有 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；和/或

(3) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的第 65 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 P65C，和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在氨基酸序列为 Z2TFZ3YZ4RELRFAY (Z2=V 或 I; Z3=Y 或 L; Z4=S 或 T; 例如包括 SEQ ID NO: 9、20、21、22、23、24 或 25 示出的序列) 的 HCDR3 第 3 位上引入氨基酸突变 F3C 所获得，所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 14 (其中 X1=A; X2=M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 15 (其中 Z1=E; X3=G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 9 (其中 Z2=V, Z3=Y, Z4=S) 所示的 HCDR3 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 10 (其中 Z5=D; Z6=G) 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 17 (其中 Z7=S; Z8=T; X4=S) 所示的 LCDR2 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列；和/或

(4) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的第 42 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 F42C，和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在氨基酸序列为 Z2TFZ3YZ4RELRFAY (Z2=V 或 I; Z3=Y 或 L; Z4=S 或 T; 例如包括 SEQ ID NO: 9、20、21、22、23、24 或 25 示出的序列) 的 HCDR3 第 3 位上引入氨基酸突变 F3C 所获得，所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 14 (其中 X1=A; X2=M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 15 (其中 Z1=E; X3=G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 9 (其中 Z2=V, Z3=Y, Z4=S) 所示的 HCDR3 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 10 (其中 Z5=D; Z6=G) 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 17 (其中

Z7=S; Z8=T; X4=S)所示的 LCDR2 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列。

采用上述配对氨基酸突变不仅可以保证在所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段与 hIL-2 变体的抗原-抗体结合界面形成所设计的二硫键连接, 而且保证 hIL-2 变体的 α 受体结合位点全部包埋在 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白分子内部(即抗原-抗体结合界面), 并且所述融合蛋白应用到体内进行治疗时不会发生抗原-抗体解离而暴露 hIL-2 变体的 α 亚基受体结合位点, 以及无法被体内的高亲和力 IL2R 竞争结合于 hIL-2 变体, 从而显著降低因激活高亲和力 IL2R 所带来的系统性毒副作用以及 Treg 细胞介导的免疫抑制作用。

所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白不同于 IL-2 与抗 IL-2 抗体形成的抗原-抗体复合物。事实上, IL-2 与抗 IL-2 抗体形成的抗原-抗体复合物容易发生解离, 且容易被高亲和力 IL2R 竞争结合于 IL-2, 例如, 能在体内及体外刺激高表达 CD25 的 Treg 细胞的增殖并促进免疫抑制反应。

在一些实施方案中, 本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 所述的 HCDR3、LCDR1、LCDR2 和/或 LCDR3 包含一个、或两个、或两个以上半胱氨酸残基突变, 所述重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包括: (1) 氨基酸序列为 X1YYX2H (X1=A; X2=M; 即, SEQ ID NO: 14 所示的序列)的 HCDR1, (2) 氨基酸序列为 RIDPZ1DDSTKYAENFKX3 (Z1=E 或 D; X3=G; 即, SEQ ID NO: 15 或 19 所示的序列)的 HCDR2, (3) 如 SEQ ID NO: 234 所示的氨基酸序列为 Z2TX_{II}Z3YZ4RELRFWYAY (Z2=V 或 I; X_{II}=F 或 C; Z3=Y 或 L; Z4=S 或 T) 的 HCDR3, (4) 如 SEQ ID NO: 235 所示的氨基酸序列为 QASQZ5IZ6X_IX_{IV}LS (Z5=D 或 Y; Z6=G, S 或 C; X_I=N 或 C; X_{IV}=Y 或 C) 的 LCDR1, (5) 如 SEQ ID NO: 236 所示的氨基酸序列为 Z7AZ8SLAX4 (Z7=S, Q 或 C; Z8=T 或 C; X4=S) 的 LCDR2, 和 (6) 如 SEQ ID NO: 237 所示的氨基酸序列为 LQHX_{III}STPYT (X_{III}=Y 或 C) 的 LCDR3。

在一个具体实施方案中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 所述的 HCDR3、LCDR1、LCDR2 和/或 LCDR3 包含一个、或两个、或两个以上半胱氨酸残基突变, 所述重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包括:

(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 (Z1=E; X3=G) 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 (Z2=V; X_{II}=F; Z3=Y; Z4=S) 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 (Z5=D; Z6=C; X_I=N; X_{IV}=Y) 或 31 (Z5=D; Z6=G; X_I=C; X_{IV}=Y) 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 (Z7=S, Z8=T, X4=S) 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 (X_{III}=Y) 所示的 LCDR3; 和/或

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 (Z1=E; X3=G) 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 (Z2=V; X_{II}=F; Z3=Y; Z4=S) 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 (Z5=D; Z6=G; X_I=N; X_{IV}=Y) 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 (Z7=S, Z8=T, X4=S)、32 (Z7=C, Z8=T, X4=S) 或 33 (Z7=S, Z8=C, X4=S) 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 (X_{III}=Y) 所示的 LCDR3; 和/或

(3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 (Z1=E; X3=G) 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 (Z2=V; X_{II}=C; Z3=Y; Z4=S) 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 (Z5=D; Z6=G; X_I=N; X_{IV}=Y) 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 (Z7=S, Z8=T, X4=S) 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 (X_{III}=Y) 所示的 LCDR3; 和/或

(4) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 (Z1=D; X3=G) 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 (Z2=I; X_{II}=F; Z3=L; Z4=S) 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 35 (Z5=Y; Z6=C; X_I=N; X_{IV}=Y) 或 36 (Z5=Y; Z6=S; X_I=C; X_{IV}=Y) 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 (Z7=S, Z8=T, X4=S) 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 (X_{III}=Y) 所示的 LCDR3; 和/或

(5) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 (Z1=D; X3=G) 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 (Z2=I; X_{II}=F; Z3=L; Z4=S) 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 (Z5=Y; Z6=S; X_I=N; X_{IV}=Y) 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 (Z7=S, Z8=T, X4=S)、32 (Z7=C, Z8=T, X4=S) 或 33 (Z7=S, Z8=C, X4=S) 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 (X_{III}=Y) 所示的 LCDR3; 和/或

(6) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 (Z1=D; X3=G) 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 (Z2=I; X_{II}=C; Z3=L; Z4=S) 所示的 HCDR3, 氨基

酸序列如 SEQ ID NO: 26 (Z5=Y; Z6=S; X_I=N; X_{IV}=Y) 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 (Z7=S, Z8=T, X4=S) 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 (X_{III}=Y) 所示的 LCDR3; 和/或

(7) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 (Z1=D; X3=G) 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 (Z2=I; X_{II}=F; Z3=L; Z4=S) 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 (Z5=Y; Z6=S; X_I=N; X_{IV}=Y) 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 (Z7=S, Z8=T, X4=S) 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 38 (X_{III}=C) 所示的 LCDR3; 和/或

(8) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 (Z1=D; X3=G) 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 (Z2=I; X_{II}=F; Z3=L; Z4=S) 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 (Z5=Y; Z6=S; X_I=N; X_{IV}=C) 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 (Z7=S, Z8=T, X4=S) 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 (X_{III}=Y) 所示的 LCDR3。

优选地, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包括:

(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 (Z1=E; X3=G) 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 (Z2=V; X_{II}=C; Z3=Y; Z4=S) 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 (Z5=D; Z6=G; X_I=N; X_{IV}=Y) 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 (Z7=S, Z8=T, X4=S) 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 (X_{III}=Y) 所示的 LCDR3; 和/或

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 (Z1=D; X3=G) 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 (Z2=I; X_{II}=F; Z3=L; Z4=S) 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 (Z5=Y; Z6=S; X_I=N; X_{IV}=Y) 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 (Z7=S, Z8=T, X4=S) 或 33 (Z7=S, Z8=C, X4=S) 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 (X_{III}=Y) 所示的 LCDR3。

在一个具体实施方案中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区, 和/或具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区, 其中所述的 HCDR3、LCDR1、LCDR2 和/或 LCDR3 包含一个、或两个、或两个以上半胱氨酸残基突变, 所述重链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 63、86、74 或 112 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列, 和/或轻链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 64、77、80、81、82、83、84、85、104、105、106、107、108、109、110 或 111 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

优选地, 所述重链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 86 或 74 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列, 和/或轻链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 64、87、88、89、90、91、107、108 或 109 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

更优选地, 所述重链可变区和轻链可变区包括: 分别与 SEQ ID NO: 86 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 64、87、88、89、90 或 91 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或分别与 SEQ ID NO: 74 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 107、108 或 109 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

在本申请 hIL-2 变体和本申请抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段的结合界面引入二硫键, 选择位于所述 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面的空间距离小于 10 埃 (优选小于 5 埃) 的氨基酸残基对突变为半胱氨酸残基, 以实现 hIL-2 变体与人源化 IL-2 抗体之间通过二硫键进一步稳固本申请所述分子的结构, 有效保证本申请的 hIL-2 变体的 IL2R α 结合位点始终包埋在所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白分子内部 (即抗原-抗体结合界面), 并且应用到体内进行治疗时不会发生解离而暴露 hIL-2 变体的 α 亚基受体结合位点, 且无法被体内高亲和力 IL2R 竞争结合于 hIL-2 变体。基于这些特征, 当本申请 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白应用到体内时, 不仅能够显著地促进 Teff 细胞和/或 NK 细胞增殖, 并且还能够诱导 Teff 细胞和/或 NK 细胞中 IL-2 信号传导, 激活其肿瘤杀伤活性; 同时, 由于本申请 hIL-2/IL-2

抗体融合蛋白不与 IL2R 的 α 亚基,或 α/β 二聚体,或 $\alpha/\beta/\gamma$ 三聚体结合,因此不仅阻断了其与 Treg 细胞表面高亲和力 IL2R 的结合,不会激活 Treg 细胞而诱导肿瘤免疫抑制作用,而且也不会与高表达 CD25 或表达高亲和力 IL2R 的细胞或组织结合,从而显著降低了现有 IL-2 产品在体内的毒副作用(例如, VLS、肺水肿、低血压等);此外,本申请 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的施用未发现对常规 CD4⁺T 细胞(Tconv)产生不良影响。

在一些实施方案中,本申请还在野生型 hIL-2 与其它特异性识别 hIL-2 的 IL2R α 位点的抗 IL-2 人源化抗体形成的抗原-抗体复合物的结合界面引入二硫键,所述抗原-抗体复合物选自 hIL-2:NARA1 抗原-抗体复合物和 hIL-2:TCB2 抗原-抗体复合物。将所述复合物的抗原-抗体结合界面中各氨基酸之间的空间距离小于 10 埃(优选小于 5 埃)的氨基酸残基对突变为半胱氨酸残基对,以构建形成二硫键,同样能实现将 IL-2 的 hIL2R α 结合位点更稳定地包埋在抗原-抗体结合界面,进一步降低或消除所述抗原-抗体复合物与 IL2R α 或高亲和力 IL2R 竞争性结合的活性,并且维持了 hIL-2 与 IL2R β/γ 的结合活性。

在一些实施方案中,所述 hIL-2:NARA1 抗原-抗体复合物的结合界面包含了 hIL-2 与 IL2R α 的结合界面,所述的 hIL-2:NARA1 抗原-抗体复合物的结合界面位于所述 hIL-2 的 AB 环、B 螺旋和 BC 环。在具体的实施方案中,所述 hIL-2:NARA1 抗原-抗体复合物的结合界面位于所述 hIL-2 的第 30-43 位或其邻近的氨基酸残基和第 71-77 位或其邻近的氨基酸残基。

在一个实施方案中,所述 hIL-2:NARA1 抗原-抗体复合物的结合界面包含两个或两个以上半胱氨酸残基以形成所述二硫键。在一个具体的实施方案中,所述 hIL-2 相对于 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 在第 34 位、第 37 位、第 41 位、第 42 位、第 68 位、第 73 位、第 75 位、第 77 位和第 111 位氨基酸残基处具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变,以引入第一个半胱氨酸残基。在一个具体实施方案中,在 NARA1 抗体或其抗原结合片段的 CDR 区中特定氨基酸残基处具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变,以引入第二个半胱氨酸残基,所述氨基酸突变包括位于 NARA1 或其抗原结合片段的 HCDR1 第 1 位,和/或位于 HCDR2 第 2 位、第 6 位和/或第 8 位,和/或位于 HCDR3 第 3 位和/或第 8 位,和/或位于 LCDR1 第 9 位,和/或位于 LCDR3 第 3 位、第 4 位和/或第 6 位氨基酸残基。

在一个实施例中,在所述 hIL-2:NARA1 抗原-抗体复合物的结合界面形成二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的配对选自以下一个、或两个、或两个以上配对氨基酸突变的组合:

(1)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 34 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 P34C,和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 8 位上引入氨基酸突变 A8C 所获得,或所述第二半胱氨酸残基是所述抗 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在 LCDR3 第 3 位或第 4 位分别引入氨基酸突变 S3C 或 N4C 所获得;和/或

(2)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 37 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T37C,和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 6 位上引入氨基酸突变 D6C 所获得;和/或

(3)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 41 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T41C,和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 HCDR2 第 2 位上引入氨基酸突变 I2C 所获得;和/或

(4)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 42 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 F42C,和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 HCDR2 第 8 位上引入氨基酸突变 G8C 所获得;和/或

(5)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 68 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 E68C,和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 或其抗原结合片段通过在其 HCDR1 第 1 位上引入氨基酸突变 N1C 所获得;和/或

(6)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 73 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 A73C,和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 3 位上引入氨基酸突变 G3C 所获得;和/或

(7)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 75 位或第 77 位氨基酸残基处分别具有的氨基酸突变 S75C 或 N77C,和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 或其抗原结合片段通过在其 LCDR1 第 9 位上引入氨基酸突变 D9C 所获得;和/或

(8)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 111 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T111C,和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 HCDR2 第 6

位上引入氨基酸突变 S6C 所获得。

优选地，在所述 hIL-2：NARA1 抗原-抗体复合物的结合界面形成二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的配对选自以下一个、或两个、或两个以上配对氨基酸突变的组合：

(1) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 37 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T37C，和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 6 位上引入氨基酸突变 D6C 所获得，或

(2) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 68 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 E68C，和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 HCDR1 第 1 位上引入氨基酸突变 N1C 所获得；和/或

(3) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 75 位或第 77 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 S75C 或 N77C，和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 LCDR1 第 9 位上引入氨基酸突变 D9C 所获得；和/或

(4) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 111 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T111C，和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 HCDR2 第 6 位上引入氨基酸突变 S6C 所获得。

在一些实施方案中，所述的 hIL-2/NARA1 抗体融合蛋白包含重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，所述的 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、和/或 LCDR3 包含一个、或两个、或两个以上半胱氨酸残基取代，所述重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包括：(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 142 或 148 所示的 HCDR1，(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 143、149、150 或 151 所示的 HCDR2，(3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144、152 或 153 所示的 HCDR3，(4) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 145 或 154 所示的 LCDR1，(5) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2，(6) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 147、155、156 或 157 所示的 LCDR3，

进一步，所述重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包括：

(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 149 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144 所示的 HCDR3，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 145 所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 147 所示的 LCDR3；和/或

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 143 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 152 或 153 所示的 HCDR3，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 145 所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 147 所示的 LCDR3；和/或

(3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 143 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144 所示的 HCDR3，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 154 所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 147 所示的 LCDR3；和/或

(4) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 143 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144 所示的 HCDR3，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 145 所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 155、156 或 157 所示的 LCDR3；和/或

(5) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 148 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 143 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144 所示的 HCDR3，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 145 所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 147 所示的 LCDR3；和/或

(6) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 150 或 151 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144 所示的 HCDR3，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 145 所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 147 所示的 LCDR3。

优选地，所述重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包括：

(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 149 所示

的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 145 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 147 所示的 LCDR3; 和/或

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 143 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 154 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 147 所示的 LCDR3; 和/或

(3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 143 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 145 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 157 所示的 LCDR3; 和/或

(4) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 148 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 143 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 145 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 147 所示的 LCDR3。

在一些实施方案中, 所述的 hIL-2/NARA1 抗体融合蛋白包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和/或具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区, 所述的 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、和/或 LCDR3 包含一个、或两个、或两个以上半胱氨酸残基突变, 所述重链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 140、158、159、160、161、162 或 163 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列, 和/或轻链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 141、164、165、166 或 167 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列, 进一步, 所述 hIL-2/NARA1 抗体融合蛋白包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区和轻链可变区包括:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 158、159、160、161、162 或 163 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 141 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 140 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 164、165、166 或 167 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

优选地, 所述 hIL-2/NARA1 抗体融合蛋白包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区和轻链可变区包括:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 158 或 161 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 141 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 140 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 164 或 167 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

本申请所述的 hIL-2/NARA1 抗体融合蛋白不与 IL2R α 的结合活性, 但维持了其 IL2R β/γ 的结合活性。

在一些实施方案中, 所述 hIL-2:TCB2 抗原-抗体复合物的结合界面包含了 hIL-2 与 IL2R α 的结合界面, 所述的 hIL-2:TCB2 抗原-抗体复合物的结合界面位于所述 hIL-2 的 AB 环、B 螺旋和 CD 环。在具体的实施方案中, 所述 hIL-2:TCB2 抗原-抗体复合物的结合界面位于所述 hIL-2 的第 34-45 位或其邻近的氨基酸残基、第 62-76 位或其邻近的氨基酸残基和第 111 位或其邻近的氨基酸残基。

在一个实施方案中, 所述 hIL-2:TCB2 抗原-抗体复合物的结合界面包含两个或两个以上半胱氨酸残基以形成所述二硫键。在一个具体的实施方案中, 所述 hIL-2 相对于 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 在第 34 位、第 36 位、第 37 位、第 38 位、第 42 位、第 68 位和第 109 位氨基酸残基处具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变, 以引入第一个半胱氨酸残基。在一个具体实施方案中, 在 TCB2 抗体或其抗原结合片段的 CDR 区中特定氨基酸残基处具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变, 以引入第二个半胱氨酸残基, 所述氨基酸突变包括位于 TCB2 或其抗原结合片段的 HCDR2 第 6 位, 和/或位于 HCDR3 第 3 位、第 5 位、第 6 位、和/或第 7

位, 和/或位于 LCDR1 第 4 位, 位于 LCDR3 第 4 位、第 5 位、和/或第 6 位氨基酸残基。

在一个实施例中, 在所述 hIL-2:TCB2 抗原-抗体复合物的结合界面形成二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的配对选自以下一个、或两个、或两个以上配对氨基酸突变的组合:

(1)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 34 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 P34C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 LCDR1 第 4 位上引入氨基酸突变 T4C 所获得, 或所述第二半胱氨酸是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 4 位或第 5 位上分别引入氨基酸突变 D4C 或 N5C 所获得; 和/或

(2)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 36 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 L36C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 5 位上引入氨基酸突变 N5C 所获得; 和/或

(3)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 37 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T37C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 5 位或第 6 位上分别引入氨基酸突变 N5C 或 L6C 所获得; 和/或

(4)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 38 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 R38C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 7 位上引入氨基酸突变 F7C 所获得; 和/或

(5)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 42 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 F42C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 5 位上引入氨基酸突变 R5C 所获得; 和/或

(6)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 68 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 E68C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 3 位或第 6 位上分别引入氨基酸突变 A3C 或 G6C 所获得; 和/或

(7)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 109 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 D109C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 HCDR2 第 6 位上引入氨基酸突变 D6C 所获得。

优选地, 在所述 hIL-2:TCB2 抗原-抗体复合物的结合界面形成二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的配对选自以下一个、或两个、或两个以上配对氨基酸突变的组合:

(1)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 34 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 P34C, 和所述第二半胱氨酸是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 4 位或第 5 位上分别引入氨基酸突变 D4C 或 N5C 所获得; 和/或

(2)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 36 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 L36C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 5 位上引入氨基酸突变 N5C 所获得; 和/或

(3)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 37 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T37C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 6 位上分别引入氨基酸突变 L6C 所获得; 和/或

(4)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 42 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 F42C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 5 位上引入氨基酸突变 R5C 所获得; 和/或

(5)所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的第 68 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 E68C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 3 位上分别引入氨基酸突变 A3C 所获得。

在一些实施方案中, 所述的 hIL-2/TCB2 抗体融合蛋白包含重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 所述的 HCDR2、HCDR3、LCDR1、和/或 LCDR3 包含一个、或两个、或两个以上半胱氨酸残基取代, 所述重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包括: (1)氨基酸序列如 SEQ ID NO: 170 所示的 HCDR1, (2)氨基酸序列如 SEQ ID NO: 171 或 176 所示的 HCDR2, (3)氨基酸序列如 SEQ ID NO: 172、177、178、179 或 180 所示的 HCDR3, (4)氨基酸序列如 SEQ ID NO: 173 或 181 所示的 LCDR1, (5)氨基酸序列如 SEQ ID NO: 174 所示的 LCDR2, (6)氨基酸序列如 SEQ ID NO: 175、182、183 或 184 所示的 LCDR3。

在一个实施方案中, 所述的 hIL-2/TCB2 抗体融合蛋白包含所述重链可变区的 HCDR1、

HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，其包括：

(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 170 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 171 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 177、178、179 或 180 所示的 HCDR3，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 173 所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 174 所示的 LCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 175 所示的 LCDR3；和/或

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 170 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 176 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 172 所示的 HCDR3，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 173 所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 174 所示的 LCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 175 所示的 LCDR3；和/或

(3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 170 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 171 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 172 所示的 HCDR3，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 181 所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 174 所示的 LCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 175 所示的 LCDR3；和/或

(4) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 170 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 171 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 172 所示的 HCDR3，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 173 所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 174 所示的 LCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 182、183 或 184 所示的 LCDR3。

在一个具体实施方案中，所述的 hIL-2/TCB2 抗体融合蛋白包含所述重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3，其包括：

(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 170 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 171 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 177 或 178 所示的 HCDR3，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 173 所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 174 所示的 LCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 175 所示的 LCDR3；和/或

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 170 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 171 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 172 所示的 HCDR3，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 173 所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 174 所示的 LCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 182、183 或 184 所示的 LCDR3。

在一些实施方案中，所述 hIL-2/TCB2 抗体融合蛋白包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和/或具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区，所述的 HCDR2、HCDR3、LCDR1、和/或 LCDR3 包含一个、或两个、或两个以上半胱氨酸残基突变，所述重链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 168、185、186、187、188 或 189 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 相同的氨基酸序列，和/或轻链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 169、190、191、192 或 193 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 相同的氨基酸序列。

在一个实施方案中，所述 hIL-2/TCB2 抗体融合蛋白包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区包括：

(1) 分别与 SEQ ID NO: 185、186、187、188 或 189 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 169 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 相同的氨基酸序列；或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 168 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 190、191、192 或 193 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 相同的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中，所述 hIL-2/TCB2 抗体融合蛋白包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区包括：

(1) 分别与 SEQ ID NO: 185 或 186 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 169 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 相同的氨基酸序列；

(2) 分别与 SEQ ID NO: 168 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 191、192 或 193 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 相同的氨基酸序列。

本申请所述的 hIL-2/TCB2 抗体融合蛋白不与 IL2R α 的结合活性，但维持了或增强了其与

IL2R β / γ 的结合活性。

本申请的示例性 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的抗体或其抗原结合片段部分的重链可变区及其 CDR 区和轻链可变区及其 CDR 区（由 Kabat 编号系统定义）编号，如表 3 所示。

表 3. 示例性 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的抗体或其抗原结合片段部分的重链可变区及其 CDR 区和轻链可变区及其 CDR 区（由 Kabat 编号系统定义）编号

hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白编号	SEQ ID No.							
	HCDR1	HCDR2	HCDR3	V _H	LCDR1	LCDR2	LCDR3	V _L
H6K3(H)-Cy-01	14	15	9	63	30 (Z5=D; Z6=C; X _I =N; X _{IV} =Y)	17	12	80
H6K3(H)-Cy-02	14	15	9	63	31 (Z5=D; Z6=G, X _I =C; X _{IV} =Y)	17	12	81
H6K3(H)-Cy-03	14	15	9	63	10	32 (Z7=C, Z8=T, X4=S)	12	82
H6K3(H)-Cy-04	14	15	9	63	10	33 (Z7=S, Z8=C, X4=S)	12	83
H6K3(H)-Cy-05	14	15	9	63	10	17	12	84
H6K3(H)-Cy-06	14	15	9	63	10	17	12	85
H6K3(H)-Cy-07/ Cy-08/Cy-10	14	15	29 (Z2=V, X _{II} =C, Z3=Y, Z4=S)	86	10	17	12	64
H6K3(H)-Cy-08-DE	14	15	29	86	10	17	12	87
H6K3(H)-Cy-08-QD	14	15	29	86	39	17	12	88
H6K3(H)-Cy-08-QE	14	15	29	86	40	17	12	89
H6K3(H)-Cy-08-QS	14	15	29	86	41	17	12	90
H6K3(H)-Cy-08-QG	14	15	29	86	42	17	12	91
H6K3(H)-Cy-08-QK	14	15	29	86	43	17	12	92
H6K3(H)-Cy-08-QR	14	15	29	86	44	17	12	93
K2G11-Cy-01	14	19	24	74	35 (Z5=Y; Z6=C; X _I =N; X _{IV} =Y)	17	12	104
K2G11-Cy-02	14	19	24	74	36 (Z5=Y; Z6=S; X _I =C; X _{IV} =Y)	17	12	105
K2G11-Cy-03	14	19	24	74	26	32 (Z7=C, Z8=T, X4=S)	12	106
K2G11-Cy-04	14	19	24	74	26	33 (Z7=S, Z8=C, X4=S)	12	107
K2G11-Cy-05	14	19	24	74	26	17	12	108
K2G11-Cy-06	14	19	24	74	26	17	12	109
K2G11-Cy-07	14	19	34 (Z2=I, X _{II} =C, Z3=L, Z4=S)	112	26	17	12	77
K2G11-Cy-08	14	19	34 (Z2=I, X _{II} =C, Z3=L, Z4=S)	112	26	17	12	77
K2G11-Cy-09	14	19	24	74	26	17	38(X _{III} =C)	110
K2G11-Cy-10	14	19	34 (Z2=I, X _{II} =C, Z3=L, Z4=S)	112	26	17	12	77
K2G11-Cy-11	14	19	24	74	35	17	12	104
K2G11-Cy-12	14	19	24	74	37 (Z5=Y; Z6=S; X _I =N; X _{IV} =C)	17	12	111

hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白编号	SEQ ID No.							
	HCDR1	HCDR2	HCDR3	V _H	LCDR1	LCDR2	LCDR3	V _L
NARA1-Cy01	142	149	144	158	145	146	147	141
NARA1-Cy02	142	143	152	159	145	146	147	141
NARA1-Cy03	142	143	153	160	145	146	147	141
NARA1-Cy04	142	143	144	140	154	146	147	164
NARA1-Cy05	142	143	144	140	154	146	147	164
NARA1-Cy06	142	143	144	140	145	146	155	165
NARA1-Cy07	142	143	144	140	145	146	156	166
NARA1-Cy08	142	143	144	140	145	146	157	167
NARA1-Cy09	148	143	144	161	145	146	147	141
NARA1-Cy10	142	150	144	162	145	146	147	141
NARA1-Cy11	142	151	144	163	145	146	147	141
TCB2-Cy01	170	171	177	185	173	174	175	169
TCB2-Cy02	170	171	178	186	173	174	175	169
TCB2-Cy03	170	171	179	187	173	174	175	169
TCB2-Cy04	170	171	180	188	173	174	175	169
TCB2-Cy05	170	176	172	189	173	174	175	169
TCB2-Cy06	170	171	172	168	181	174	175	190
TCB2-Cy07	170	171	172	168	173	174	182	191
TCB2-Cy08	170	171	172	168	173	174	183	192
TCB2-Cy09	170	171	172	168	173	174	183	192
TCB2-Cy10	170	171	172	168	173	174	183	192
TCB2-Cy11	170	171	172	168	173	174	184	193

由此可见，本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白：一方面，将 hIL-2 或其变体的 IL2R α 结合位点始终包埋在本申请所述分子内部（即抗原-抗体结合界面），并将 IL-2 或其变体的 IL2R β/γ 结合位点保留在所述分子外部，从而既维持了与 IL2R β/γ 的结合亲和力和特异性激活 IL2R β/γ 的生物学活性（包括促进 Teff 细胞和/或 NK 细胞增殖，激活 Teff 细胞和/或 NK 细胞的肿瘤杀伤活性），又能够消除与高亲和力 IL2R 的结合及其所衍生的毒性（包括正常组织和/或 ILC2 细胞上表达的高亲和力 IL2R 与 hIL-2 或其变体结合后所引发的 VLS、肺水肿、低血压等）和对治疗效果的不良影响（包括表达高亲和力 IL2R 的 Treg 细胞所介导的肿瘤免疫抑制作用）；另一方面，使得本申请所述分子结构稳定，不会出现类似 hIL-2/IL-2 抗体复合物发生解离的情况，且无法被高亲和力 IL2R 竞争结合于 hIL-2 或其变体，从而显著降低了 hIL-2/IL-2 抗体复合物的潜在临床应用风险；第三方面，所构建的分子免疫原性低，极大程度地降低了 ADA 风险；第四方面，所构建的分子容易生产制备，并且所得产物具有良好的同质性，不仅有利于质量控制，而且稳定性高，不易聚集，显著降低因产品质量而引起的潜在不良影响。

连接子

在本申请的特定实施方案中，本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白还包括所述的 hIL-2 或其变体通过连接子序列融合到或可操作地连接到本申请提供的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的重链可变区或轻链可变区。本申请对 hIL-2 或其变体连接至抗 IL-2 抗体或其结合片段的位置、连接子类型及长度、以及连接子是否会影响 hIL-2 或其变体与 IL2R β/γ 的结合活性进行考察，且选择的连接子还应具有低免疫原性。在本文中可以选择柔性肽作为连接子。在一些实施例中，所述连接子序列包括 G4S 或 GAF，可以使用连接子的一个、或两个、或两个以上拷贝。在其它实施例中，可以在本文中使用 G4S 或 GAF 连接子或本领域已知的任何其它适合于本文公开的融合蛋白的连接子序列的 2、3、4 或 5 个拷贝。优选的连接子包括(G4S)₄、(G4S)₃、(GAF)₂，可以保证所构建的 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白内部结构的稳定性，更优选的连接子是(G4S)₄。

如本文所使用的，术语“连接子”是指连接两个化合物，如两个多肽的分子（包括但不限于未修饰或经修饰的氨基酸或氨基酸序列）。连接子可以由单个、或两个、或两个以上连接分子构成，或者可以包括连接分子和至少一个旨在将连接分子和化合物分开特定距离的间隔区分子。

在一些实施方案中，“可操作地连接”是指具有不同功能特性的氨基酸序列、肽或蛋白质的连接，如通过本文所述的连接子序列将 hIL-2 或其变体与抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的连接。

在一些实施方案中，本申请将所述的 hIL-2 变体通过连接子连接至本申请的抗 IL-2 人源化抗体重链可变区或轻链可变区。在一个具体实施方案中，所述连接子与 hIL-2 变体的 C 末端和抗 IL-2 抗体重链 N 末端相连，可保证对 hIL-2 变体与 IL2R β / γ 结合的影响较小。

在一些实施方案中，本申请还将 hIL-2 通过连接子连接至其它特异性识别 hIL-2 的 IL2R α 结合位点的抗 IL-2 人源化抗体重链可变区或轻链可变区。在一个具体实施方案中，所述连接子与 hIL-2 的 C 末端和 NARA1 抗体轻链可变区 N 末端相连，可保证对 hIL-2 与 IL2R β / γ 结合的影响较小。在一个具体实施方案中，可选择 4 个拷贝以上的连接子与 hIL-2 的 C 末端和 NARA1 抗体重链可变区 N 末端相连，同样不会显著影响 hIL-2 与 IL2R β / γ 的结合活性。在一个具体实施方案中，所述连接子与 hIL-2 的 C 末端和 TCB2 抗体轻链可变区 N 末端相连，可保证对 hIL-2 与 IL2R β / γ 结合的影响较小。在一个具体实施方案中，可选择 4 个拷贝以上的连接子与 hIL-2 的 C 末端和 TCB2 抗体重链可变区 N 末端相连，也不会对 hIL-2 与 IL2R β / γ 的结合活性产生显著影响。

本申请所选择的连接子不仅有利于本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白分子的结构稳定，生产制备和产生同质性产物，还具有低免疫原性。

本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的进一步优化

本申请在上述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的基础上开展了进一步优化，包括对融合蛋白分子中抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的优化以及 hIL-2 变体的优化。

在一些实施方案中，本申请将所述抗 IL-2 抗体（包括抗 mIL-2 抗体及其衍生的各人源化抗体）轻链可变区第一位天冬氨酸或第 27 位谷氨酰胺（位于轻链 CDR1）进行了氨基酸突变，所述氨基酸突变包括 D1E、Q27D、Q27E、Q27S、Q27G、Q27K 或 Q27R，优选的氨基酸突变包括 D1E、Q27D、Q27E、Q27S 或 Q27G，可显著提高本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的表达量。

在一些具体实施方案中，所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含如下的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和 LCDR1、LCDR2、LCDR3：氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的 HCDR3，氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 39-44 任一个所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2，和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3。

在一个具体实施方案中，所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含如下的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和 LCDR1、LCDR2、LCDR3：氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的 HCDR3，氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 39-42 任一个所示的 LCDR1，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2，和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3。

在一些具体实施方案中，所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含如下的重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 86 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列，和/或轻链可变区包含分别与 SEQ ID NOs: 87-93 任一个所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中，所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含如下的重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含与 SEQ ID NO: 86 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列，和/或轻链可变区包含分别与 SEQ ID NOs: 87-91 任一个所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

在一些实施方案中，为了利于本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的生产制备，提高表达率，以及利于质量控制和产生同质性产物，降低潜在的 ADA 风险，本申请对 hIL-2 变体分子进行进一步优化，包括：

(i) 消除糖基化修饰, 避免生产制备过程中出现糖基化异构体:

在一些实施方案中, 在本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中, hIL-2 变体中存在的糖基化位点可被突变(例如删除)或保持不变。本申请中的术语“糖基化位点”用于多肽序列时是指侧链能够与碳水化合物部分(例如寡糖结构)连接的氨基酸残基, 可以通过对此氨基酸残基进行突变的方式方便地实现对天然糖基化修饰的消除。

在一些具体实施方案中, 在本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中, 至少一个天然糖基化位点在所述 hIL-2 变体中不存在或存在。在一个实施例中, 在本申请所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中, 所述 hIL-2 变体部分糖基化位点被删除, 包括删除 hIL-2 变体的 N 末端前 3 个或 5 个氨基酸残基, 或将第 3 位苏氨酸残基进行突变, 优选删除 N 末端前 3 个氨基酸残基(例如, 如 SEQ ID NO: 134 所示); 和/或

(ii) 消除游离半胱氨酸残基以避免形成错配二硫键: 将 hIL-2 变体的第 125 位半胱氨酸残基突变为丙氨酸、亮氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺或缬氨酸。

本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的第一多肽和第二多肽

本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含第一多肽和第二多肽, 所述第一多肽包含具有半胱氨酸残基突变的 hIL-2 或其变体可操作地连接至来源于所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的一个可变区, 第二多肽包含所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的另一个可变区。进一步, 所述第一多肽包含具有半胱氨酸残基突变的 hIL-2 或其变体、连接子和所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的一个可变区, 可以选择在所述第一多肽中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的一个可变区和/或第二多肽中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的另一个可变区进行半胱氨酸残基突变, 由此可与具有半胱氨酸残基突变的 hIL-2 或其变体形成正确配对且稳定的二硫键, 且所述二硫键位于所述 hIL-2 或其变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面。

在一些实施方案中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含第一多肽和第二多肽, 所述第一多肽包含具有半胱氨酸残基突变的 hIL-2 变体、连接子和所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的重链可变区, 第二多肽包含所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的轻链可变区。

进一步, 所述第一多肽包含与 SEQ ID NO: 95-103、113-120、或 133-138 任意一个所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列, 和/或所述第二多肽包含与 SEQ ID NO: 64、77、80-85、87-93、或 104-111 任意一个所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含第一多肽和第二多肽, 其包括:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 95 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 80 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 96 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 81 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(3) 分别与 SEQ ID NO: 97 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 82 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(4) 分别与 SEQ ID NO: 98 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 83 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(5) 分别与 SEQ ID NO: 99 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 84 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(6) 分别与 SEQ ID NO: 100 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 85 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(7) 分别与 SEQ ID NO: 101、102、103、133-138 任意一个所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 64 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(8) 分别与 SEQ ID NO: 102 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 87-93 任意一个所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

优选地, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含第一多肽和第二多肽, 其包括:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 101、102、103、133-138 任意一个所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 64 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 102 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 87-91 任意一个所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含第一多肽和第二多肽, 其包括:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 113 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 104、105 或 106 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 114 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 107 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(3) 分别与 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 108 或 109 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(4) 分别与 SEQ ID NO: 116、117 或 119 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 77 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(5) 分别与 SEQ ID NO: 118 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 110 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(6) 分别与 SEQ ID NO: 120 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 104 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(7) 分别与 SEQ ID NO: 118 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 111 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

优选地, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含第一多肽和第二多肽, 其包括:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 114 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 107 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 108 或 109 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含第一多肽和第二多肽, 所述第一多肽包含具有半胱氨酸残基突变的 hIL-2、连接子和所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的轻链可变区, 第二多肽包含所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的重链可变区。

进一步, 所述第一多肽包含与 SEQ ID NO: 206-226 任意一个所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列, 和/或所述第二多肽包含与 SEQ ID NO: 140、158-163、168、或 185-189 任意一个所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含第一多肽和第二多肽, 其包括:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 206 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 158 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 207 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 159 所示的第二多肽具有至少

85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(3) 分别与 SEQ ID NO: 208 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 160 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(4) 分别与 SEQ ID NO: 209-213 任意一个所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 140 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(5) 分别与 SEQ ID NO: 214 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 161 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(6) 分别与 SEQ ID NO: 215 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 162 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(7) 分别与 SEQ ID NO: 216 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 163 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

优选地，所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含第一多肽和第二多肽，其包括：

(1) 分别与 SEQ ID NO: 206 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 158 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 209、210 或 213 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 140 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(3) 分别与 SEQ ID NO: 214 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 161 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

在一个具体实施方案中，所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含第一多肽和第二多肽，其包括：

(1) 分别与 SEQ ID NO: 217 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 185 或 187 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 218 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 186 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(3) 分别与 SEQ ID NO: 219 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 188 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(4) 分别与 SEQ ID NO: 220 任意一个所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 189 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(5) 分别与 SEQ ID NO: 221-226 任意一个所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 168 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

优选地，所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含第一多肽和第二多肽，其包括：

(1) 分别与 SEQ ID NO: 217 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 185 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 218 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 186 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(3) 分别与 SEQ ID NO: 222、223、224 或 226 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 168 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

4、恒定区

本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段和/或本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白还可以包含恒定区,所述恒定区包括抗体重链恒定区和轻链恒定区。本申请的重链恒定区包括人 IgG 重链恒定区 Fc 区的天然和突变蛋白形式,还包括含有促进二聚体形成的铰链区的多肽截短形式。在某些实施方案中, Fc 区包含抗体 CH2 和 CH3 域。包含 Fc 部分的融合蛋白(和由此形成的低聚物)提供了容易通过蛋白 A 或蛋白 G 进行亲和和色谱法纯化的优点,以及延长血清半衰期。优选的 Fc 区来源于人 IgG, 包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。在本文中, Fc 区的特定氨基酸残基的位置是依据 EU 编号系统来确定的。

抗体的 Fc 区的一个功能是在抗体结合其靶标时与免疫系统产生“效应功能”,包括产生抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。ADCC 和 ADCP 通过 Fc 与免疫细胞表面上 Fc 受体(FcR)的结合来介导(Raghavan 等, Annu Rev Cell Dev Biol 1996, 12:181-220; Ghetie 等, Annu Rev Immunol 2000, 18:739-766; Ravetch 等, Annu Rev Immunol 2001, 19:275-290),所述的免疫细胞包括单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、嗜曙红细胞、肥大细胞、血小板、B 细胞、大颗粒淋巴细胞、朗格汉斯细胞、NK 细胞和 T 细胞。CDC 通过 Fc 与例如 C1q 等补体系统的蛋白质结合来介导(Ward 等, Ther Immunol 1995, 2:77-94)。

在一些实施方案中,本申请的抗 IL-2 抗体和/或本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含经工程化改造的 IgG Fc 区,以降低其介导的效应功能。具有降低的效应功能的示例性 Fc 分子包括具有以下氨基酸取代的 Fc 分子:

N297A 或 N297Q (IgG1)
L234A/L235A (IgG1)
V234A/G237A (IgG2)
L235A/G237A/E318A (IgG4)
H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)
C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)
C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)
L234F/L235E/P331S (IgG1)
S267E/L328F (IgG1)

优选的工程化的 Fc 区是具有 L234F/L235E/P331S(EU 编号系统)氨基酸取代的人 IgG1 Fc,能够降低 Fc 区与一个或多个 FcγR 和 C1q 的结合(Oganesyan V 等, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2008, 64:700-704; 美国专利号: US5624821, US6194551)。FcγRs 蛋白家族包括 FcγRI(又称为 CD64),包括同工型 FcγRIa、FcγRIb 和 FcγRIc; FcγRII(又称为 CD32),包括同工型 FcγRIIa、FcγRIIb 和 FcγRIIc; 以及 FcγRIII(又称为 CD16),包括同工型 FcγRIIIa 和 FcγRIIIb(Jefferis 等, Immunol Lett 2002, 82:57-65)。其中, FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIc 以及 FcγRIIIa 可诱导 ADCC、内吞作用、吞噬作用和/或细胞因子释放。结合性质包括但不限于结合特异性、结合亲和力常数(K_D)、解离和结合速率(分别为 K_{dis} 和 K_a)以及结合亲和力,本领域技术人员可通过任意一种或多种结合性质来分析工程化的 Fc 区是否具有改变的 ADCC 和/或 CDC 活性。

在一些实施例中,在本申请的抗 IL-2 抗体和/或本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白重链恒定区中引入 L234F/L235E/P331S 具有对一个或多个 FcγR 降低的结合亲和力,所述 FcγR 可以是 FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa(158F)和 FcγRIIIa(158V)。在一个实施例中,在重链恒定区中引入 L234F/L235E/P331S 突变能使得抗 IL-2 抗体和/或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白与 FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa(158F)和/或 FcγRIIIa(158V)基本不结合。在一个实施例中,在重链恒定区中引入 L234F/L235E/P331S 突变能使得抗 IL-2 抗体和/或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白与 C1q 基本不结合。在一个实施例中,在重链恒定区中引入 L234F/L235E/P331S 突变不会影响抗 IL-2 抗体和/或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白与 FcRn 的结合亲和力。

优选的工程化的 Fc 区是具有 L234F/L235E/P331S(EU 编号系统)氨基酸取代的人 IgG1 Fc。在一些实施例中,在重链恒定区中引入 L234F/L235E/P331S 可显著降低本申请的抗 IL-2 抗体和/或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的 ADCC 活性。在一个实施例中,本申请的抗 IL-2 抗体和/或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白相较于 Fc 区不含有氨基酸突变的抗体,ADCC 活性显著减弱或消除。在一个实施例中,本申请的抗 IL-2 抗体和/或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白显示其 ADCC 活性减弱至检测不到,ADCC 活性的减弱或消除可能是由本申请抗体和/或融合蛋白对 FcγR 的亲和力显

著降低所致。

在一些实施方案中，本申请的抗 IL-2 抗体和/或本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含经工程化改造的 IgG1 恒定区，通过降低所述抗体和/或融合蛋白的等电点 (pI) 以延长其在体内的半衰期。抗体和/或融合蛋白的等电点的变化会影响其组织分布和药代动力学 (PK) 特性；通常，pI 的降低会导致非特异性组织吸收与代谢/降解的减少以及体内半衰期的延长 (Boswell CA 等, Bioconjug Chem 2010, 21:2153-2163; Li 等, MAbs 2014, 6:1255-1264)。在一些实施例中，通过对本申请的抗 IL-2 抗体和/或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白重链恒定区特定位点的氨基酸进行突变，例如，用酸性氨基酸 (如天冬氨酸或谷氨酸) 取代碱性氨基酸 (如赖氨酸或精氨酸) 或中性氨基酸 (如天冬酰胺或谷氨酰胺)，能够降低所述抗体和/或抗体融合蛋白的 pI。具体的突变位点选择取决于多种因素，包括在所述抗体和/或融合蛋白结构域中的位置、功能作用以及潜在免疫原性等。所述突变对所述抗体和/或融合蛋白结构域的生物物理学特性没有显著影响。在一个实施方案中，为了使所述突变引起的免疫原性风险最小化的一个方法是利用人类蛋白质天然同种型之间的氨基酸序列差异来进行取代。就本申请的抗 IL-2 抗体和/或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白重链恒定区的突变位点的选择来说，人 IgG 亚类 (即 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4) 之间的同种型差异提供了免疫原性低风险位的突变。具体地，所述的突变可以通过比对 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恒定区的氨基酸序列，将 IgG1 恒定区中的非酸性或碱性氨基酸残基突变为在其它 IgG 亚型相应位点是酸性或非碱性的氨基酸残基，例如表 4 所示，所述突变可以选自 N203D、K274Q 以及 Q419E 的一种或多种，以降低 IgG1 蛋白的 pI 值。在一个实施例中，本申请的抗 IL-2 抗体和/或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含具有突变的重链恒定区，所述突变包含 N203D/K274Q/Q419E (EU 编号系统)，相对于重链恒定区未经该突变的抗体和/或融合蛋白，本申请的抗 IL-2 抗体和/或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的 pI 值降低了约 1-2 个单位。所述 pI 值可以通过理论计算或实验测定得到。在一个实施例中，具有 pI 值降低的本申请的抗 IL-2 抗体和/或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白表现出显著改善的药代动力学特征，所述特征包括相对于未突变的抗体和/或融合蛋白，本申请的抗 IL-2 抗体和/或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白获得了至少 2-3 倍以上增加的消除半衰期 ($t_{1/2}$)，和/或 30% 以上增加的药时曲线下面积 (AUC)。

表 4. 抗体重链 hIgG1 恒定区 pI 突变

pI 突变位点 (EU numbering)	hIgG1	hIgG2	hIgG3	hIgG4
第 203 位	N	D	N	D
第 274 位	K	Q	Q	Q
第 419 位	Q	Q	Q	E

5、多核苷酸、载体和宿主细胞

一方面，本申请提供了一种编码 hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的核酸。本申请还包括编码本文所述氨基酸序列的多核苷酸变体。

对应于本申请所述的氨基酸序列、用作核酸分离的探针或引物或者数据库提供可查询的核苷酸序列可以通过氨基酸序列回译来获得。聚合酶链反应 (PCR) 程序可以用以分离和扩增编码本申请的 hIL-2 变体、突变蛋白和抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的 DNA 序列。界定 DNA 片段组合的所需末端的寡核苷酸用作 5' 和 3' 引物。寡核苷酸可以另外含有限制内切核酸酶的识别位点，以促进扩增 DNA 片段组合插入表达载体中。PCR 技术参见于 Saiki 等人, Science 1988, 239:487-491; Recombinant DNA Methodology, Wu 等人编辑, Academic Press, Inc., San Diego (1989), 第 189-196 页; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis 等人编辑, Academic Press, Inc. (1990)。

本申请的核酸分子包括单股和双股形式 DNA 和 RNA，以及对应的互补序列，包括分离的核酸分子，优选来源于至少一次呈基本上纯的形式分离并且数量或浓度能够通过标准生物化学法鉴别、操作和回收其组分核苷酸序列的 DNA 或 RNA (例如 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) 中所述的方法)。优选地，此类序列包括以不常存在于真核基因中的内部非翻译序列或内含子中断的开放阅读框的形式所提供和/或构建。非翻译 DNA 的序列可以存在于开放阅读框的 5' 或 3'，其中所述序列不干扰编码区的操控或表达。

本申请的 hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白通过以下步骤来制备：使用 PCR 诱变或本领域一般技术人员已知的其它技术对编码 hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的 DNA 中的核苷酸进行位点特异性诱变

以产生编码变异体的 DNA，此后在如本文中概述的细胞培养物中表达重组 DNA。此外，hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、和 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白也可以通过使用已建立的技术体外合成来制备。

如本领域技术人员所已知的，由于遗传密码的简并，本申请的 hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白由极其大量的核酸进行编码，每个部分的核酸都在本申请的范围内并且可以使用标准技术制成。因此，鉴别了特定的氨基酸序列，本领域的技术人员可以通过以不改变本申请的 hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白氨基酸序列的方式来简单对其各自的编码序列进行一个、或两个、或两个以上密码子修饰以制备许多不同的核酸。

另一方面，本申请还提供了编码本文的 hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的核酸的表达载体。

可以将编码本申请的 hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的核酸构建在合适的载体中，以导入宿主细胞进行目的蛋白的表达。载体组分通常包括但不限于以下一种或多种：信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。载体中编码目标蛋白的核酸与启动子可操作地连接。

如本文所使用的，术语“可操作地连接”是指核酸表达控制序列（例如，启动子、信号序列或转录调节因子结合位点的阵列）与另一个核酸序列之间的功能性连接，并因此该控制序列控制其他核酸序列的转录和/或翻译。

合适的载体包括质粒、噬菌粒、柯斯质粒、人工染色体如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 衍生的人工染色体（PAC）、噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体，以及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。载体可含有多种控制表达的元件，包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体还可包括协助其进入细胞的成分，包括但不限于病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳。

另一方面，本申请还提供了包含编码本申请的 hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的核酸或表达载体的宿主细胞。

该细胞可以是真核细胞，例如，哺乳动物宿主细胞，包括但不限于，SV40 转化的猴肾细胞 CV1 系（COS-7, ATCC, CRL-1651）、人胚胎肾细胞系（293 或悬浮培养的 293 细胞亚克隆，Graham 等, J Gen Virol 1977, 36:59-74）、幼地鼠肾细胞（BHK-21, ATCC, CCL-10）、中国仓鼠卵巢细胞/DHFR（CHO, Urlaub 等, Proc Natl Acad Sci USA 1980, 77:4216-4220）、小鼠睾丸支持细胞（TM4, Mather, Biol Reprod 1980, 23:243-251）、猴肾细胞（CV1, ATCC, CCL-70）、非洲绿猴肾细胞（VERO-76, ATCC, CRL-1587）、人宫颈癌细胞（HELA, ATCC, CCL-2）、犬肾细胞（MDCK, ATCC, CCL-34）、布法罗大鼠肝细胞（BRL 3A, ATCC, CRL-1442）、人肺细胞（W138, ATCC, CCL-75）、人肝癌细胞系（HepG2, ATCC, HB-8065）、小鼠乳腺癌（MMT060562, ATCC, CCL-51）、TRI 细胞（Mather 等, Ann NY Acad Sci 1982, 383:44-68）、MRC5 细胞、或 FS4 细胞。

6、制备方法

本申请提供了使用所述宿主细胞制备本申请的 hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、和 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的方法。

所述方法包括将编码本申请的 hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的核酸或表达载体转染到宿主细胞中，并在培养基中培养宿主细胞一段时间以表达本申请的 hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白。不受限制地，商业上可获得的培养基可以用作培养基。

优选地，表达的 hIL-2 变体、抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白可分泌到培养宿主细胞生长的培养基中。使用标准蛋白质纯化的方法从培养基中回收抗体，例如通过离心或超滤除去杂质，或通过亲和色谱法纯化所得物；还可以使用其他纯化技术，例如阴离子或阳离子交换色谱法、疏水相互作用色谱法和羟基磷灰石色谱法。

7、双特异性分子

本申请还提供了一种双特异性抗体，其包含本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，所述双特异性抗体的两个臂之一包含本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原

片段, 或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 而另一个臂包含对 hIL-2 以外的抗原 (优选与癌症相关的抗原或免疫检查点蛋白抗原) 具有特异性的抗体, 或与免疫效应器细胞相关的抗原特异性结合的抗体或其抗原结合片段。所述与癌症相关的抗原可以选自 HER2、EGFR、VEGF、VEGFR、CD19、CD20、CD30、CD33、CD52、BCMA、SLAMF7、MUC1、MUC16、EphB2、E-选择素、EpCam、CEA、PSMA、PSA、ERBB3、c-MET、ILT3、ILT7、5T4、GPC-3、DLL3 等, 所述免疫检查点蛋白抗原可以选自 PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、CTLA-4、LAG-3、CD47、CEACAM-1、CEACAM-5、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD40、CD40L、OX40、CD160、2B4 或 TGFR。

本申请的双特异性分子可以具有许多不同的形式。例如, 双特异性分子保留了传统的抗体形式, 不同的是, 它不具有相同特异性的两个结合臂, 而是具有不同特异性的两个结合臂, 每个结合臂可以是由通过肽链连接的两个单链抗体片段 (scFv) 组成, 以构建为双特异性分子, 即所谓的 Bs(scFv)₂ 结构。双特异性分子还可以包括通过肽基接头连接的两个不同的 F(ab) 片段。这些和其它形式的双特异性分子可以通过基因工程、体细胞杂交或化学合成的方法制备得到。参见例如, Kufer 等, 同前; Cao 和 Suresh, *Bioconjugate Chemistry* 1998, 9:635-644; 以及 van Spriel 等, *Immunology Today* 2000, 21:391-397, 及其引用的参考文献。

8、免疫缀合物、嵌合抗原受体、工程化 T 细胞受体、或溶瘤病毒

一方面, 本申请提供了一种包含本文的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的免疫缀合物。

本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白可与治疗剂缀合形成免疫偶联物, 例如抗体-药物偶联物 (ADC)。合适的治疗剂包括细胞毒素、烷基化试剂、DNA 小沟结合剂、DNA 嵌入剂、DNA 交联剂、组蛋白脱乙酰基酶抑制剂、核输出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶 I 或 II 抑制剂、热休克蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗生素和抗有丝分裂剂。在 ADC 中, 抗体和治疗剂偶联的接头可以选择可裂解接头 (Cleavable linker), 如肽基接头、二硫键或胺接头, 也可以选择不可裂解接头 (Non-cleavable linker)。可以如美国专利号 7,087,600、6,989,452 和 7,129,261; PCT 公开文本 WO 02/096910、WO 07/038,658、WO 07/051,081、WO 07/059,404、WO 08/083,312 和 WO 08/103,693; 美国专利公开 20060024317、20060004081 和 20060247295 所述的方法制备 ADC, 以引用的方式将其公开内容并入本文。

另一方面, 本申请还提供了包含本文的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的嵌合抗原受体、工程化 T 细胞受体、或溶瘤病毒。

9、药物组合物

本申请提供了药物组合物, 该组合物包含本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 (或免疫缀合物、或双特异分子、或嵌合抗原受体、或工程化 T 细胞受体、或溶瘤病毒), 以及药学上可接受的载体。

所述药物组合物可以包含任何种类的赋形剂。可以使用的赋形剂包括载体、表面活性剂、增稠剂或乳化剂、固体粘合剂、分散或悬浮助剂、增溶剂、着色剂、调味剂、包衣剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、防腐剂、等渗剂或其组合。在如下中教导了选择和使用合适的赋形剂, Gennaro 编著, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 第 20 版 (Lippincott Williams & Wilkins 2003), 以引用的方式将其公开内容并入本文。

优选地, 药物组合物适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮给药 (例如, 通过注射或输注)。鉴于不同的给药途径, 可以将活性成分包被在材料中以保护其免受酸和可能使其失活的其它自然条件的作用。如本申请所使用的, 术语“肠胃外给药”是非肠内和局部的给药方式, 包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、包膜下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。或者, 本申请的抗体可以通过非肠胃外途径 (例如, 局部、表皮或粘膜给予途径) 给药, 例如, 鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部给药。

药物组合物可以是无菌水性溶液或分散剂。它们也能够形成微乳液、脂质体、或其它适合于高药物浓度的有序结构组合形式。

可以与载体材料组合以形成单一剂型的活性成分的量是依据受试者和特定的给药方式所确定的, 并且通常也是能够产生治疗效果的组合物的量。通常, 与药学上可接受的载体形成的组合物包含约 0.01% 至约 99% 的活性成分, 优选约 0.1% 至约 70%、最优选约 1% 至约 30% 的活性成分。

调整剂量方案以提供最佳的预期应答（例如治疗应答）。例如，可以单次给药，可以分数次给药，或者可以根据治疗情况按比例减少或增加剂量。以剂量单位形式配制肠胃外给药的组合物是特别有利的，使给药方便和给药剂量均匀。如本申请所使用的，剂量单位形式是指物理上离散的单位，其适合作为治疗受试者的单位剂量；每个单位剂量包含预定量的活性成分，所述活性成分的预定量是通过计算活性成分与所需的药物载体一起施用产生预期治疗效果而得到的。另外，本申请的抗 IL-2 抗体，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白也可以作为缓释制剂给药，这样可减少给药频率。

抗 IL-2 抗体，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，或包含抗 IL-2 抗体或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的组合物给药剂量的范围可为约 0.0001mg/kg 至 100mg/kg 体重，通常为 0.001mg/kg 至 50mg/kg 体重。

本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白、或双特异分子、或免疫缀合物、或嵌合抗原受体、或工程化 T 细胞受体、或溶瘤病毒的“治疗有效剂量”优选可使得疾病症状严重性降低、疾病症状无进展期的频率和持续时间增加、或预防由疾病困扰所造成的机体损伤或失能。例如，相对于未治疗的受试者，荷瘤受试者的“治疗有效剂量”优选抑制肿瘤生长至少约 20%、更优选至少约 40%、甚至更优选至少约 60%、还可以更优选至少约 80%。治疗性抗体的治疗有效量可以减少肿瘤的大小、或改善受试者的症状，所述受试者通常是人或其它哺乳动物。“治疗有效剂量”还可以根据各种因素而不同地确定，所述的各种因素包括但不限于配制方法、给药方法、年龄、身体、体重、患者的性别或病理状况、饮食、给药时间、给药间隔、给药途径、排泄率和反应敏感性。

药物组合物可以选择控释制剂，包括植入物、透皮贴剂和微囊化的递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。参见例如，*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson 编著，Marcel Dekker, Inc., 纽约，1978。

可以通过如下的医疗装置来传输治疗性药物组合物，所述医疗装置选自：（1）无针皮下注射装置（例如，美国专利号 5,399,163；5,383,851；5,312,335；5,064,413；4,941,880；4,790,824 和 4,596,556）；（2）微型输注泵（美国专利号 4,487,603）；（3）透皮装置（美国专利号 4,486,194）；（4）输注设备（美国专利号 4,447,233 和 4,447,224）；以及（5）渗透装置（美国专利号 4,439,196 和 4,475,196）；以引用的方式将其公开内容并入本文。

在某些实施方案中，可以配制本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白以确保在体内的生物分布。例如，为了确保本申请的治疗性抗体或抗体融合蛋白穿过血脑屏障，可以将其配制成脂质体，所述脂质体可以另外包含靶向部分，以增强向特定细胞或器官的选择性运送。参见例如，美国专利号 4,522,811、5,374,548、5,416,016 和 5,399,331；Ranade VV, *J Clin Pharmacol* 1989, 29:685-694；Umezawa 等, *Biochem Biophys Res Commun* 1988, 153:1038-1044；Bloeman 等, *FEBS Lett* 1995, 357:140-144；Owais M 等, *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39:180-184；Briscoe 等, *Am J Physiol* 1995, 268:L374-380；Schreier 等, *J Biol Chem* 1994, 269:9090-9098；Keinanen 和 Laukkanen, *FEBS Lett* 1994, 346:123-126；以及 Killion 和 Fidler, *Immunomethods* 1994, 4:273-279。

10、药盒/组合产品、试剂盒

一方面，本申请提供了一种药盒，其包含本申请的抗 IL-2 抗体或抗原结合片段或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药物组合物、另一种抗癌剂和/或免疫调节剂，所述抗癌剂包括但不限于微管破坏物、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、DNA 嵌入剂、烷化剂、激素治疗物、激酶抑制剂（例如，酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于 EGFR 抑制剂、HER2 抑制剂、HER3 抑制剂、IGFR 抑制剂和 Met 抑制剂）、受体拮抗剂、肿瘤细胞凋亡的激活剂（包括但不限于 IAP 抑制剂、Bcl2 抑制剂、MC11 抑制剂、TRAIL 抑制剂、CHK 抑制剂）、或任何抗血管生成的药物；所述免疫调节剂包括但不限于 PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、CTLA-4、LAG-3、CD47、CEACAM-1、CEACAM-5、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4 或 TGFR 抑制剂。

在另一个方面，本申请涉及一种试剂盒，所述试剂盒包括有效量的本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，或包括本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药物组合物。

11、治疗方法和用途

一方面，本申请涉及本文的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白在

用于制备治疗疾病的药物组合物或制剂中的用途，所述疾病包括但不限于增殖性疾病或感染、免疫缺陷疾病，所述增殖性疾病包括但不限于癌症和其它细胞增殖病症。

或者，本申请涉及用于治疗增殖性疾病或感染、免疫缺陷疾病的本文的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白、或包含其的药物组合物。

在一些实施方案中，所述癌症包括但不限于黑色素瘤、肺癌、结直肠癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肾癌、肝癌、脑癌、食道癌、胆囊癌、胰腺癌、胃癌、甲状腺癌、膀胱癌和淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述其它细胞增殖病症包括但不限于高丙种球蛋白血症(hypergammaglobulinemia)、淋巴增生性疾病、病变蛋白血症(paraproteinemia)、紫癜(purpura)、结节病、塞扎里综合征(Sezary Syndrome)、华氏巨球蛋白血症(Waldenström macroglobulinemia)、组织细胞增生(Histiocytosis)以及任何位于例如腹部、骨、乳房、消化系统、肝、胰、腹膜、内分泌腺(如肾上腺、副甲状腺、垂体、睾丸、卵巢、胸腺、甲状腺)、眼、头和颈、神经系统、淋巴系统、骨盆、皮肤、软组织、脾、和泌尿生殖系统中的瘤形成(neoplasia)外的细胞增殖疾病。

在一些实施方案中，所述免疫缺陷疾病包括但不限于 HIV 阳性、免疫抑制疾病、慢性感染。

在另一个方面，本申请涉及一种通过提高宿主免疫响应来治疗疾病、病状或病症的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白、或包括本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药物组合物、或包括本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的试剂盒或试剂盒来特异性地激活表达 IL2R β/γ 的效应细胞(例如，CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞)，从而改善疾病状况。

在另一个方面，本申请涉及一种刺激免疫系统的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白、包含本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药物组合物、或包含本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的试剂盒或试剂盒来刺激免疫系统，所述刺激免疫系统包括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、IL2R β/γ 表达升高、T 细胞应答性升高、天然杀伤细胞活性或淋巴因子激活的杀伤细胞活性升高、受试者体内 CD8⁺ T 细胞与 CD4⁺ T 细胞比率升高等。

在另一个方面，本申请涉及一种治疗、缓解或预防对宿主免疫系统的刺激是有益的疾病状况的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，或包含本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药物组合物，或包含本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的试剂盒或试剂盒，以通过增强所述受试者细胞免疫应答来改善疾病状况，所述疾病状况包括宿主免疫应答不足或免疫缺陷，进一步所述疾病状况是增殖性疾病或感染、免疫缺陷疾病。所述增殖性疾病包括癌症和其它细胞增殖病症。

在一些实施方案中，所述癌症选自鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、和肺的鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌和胃肠基质癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、尿道癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、黑色素瘤、浅表扩散性黑色素瘤、恶性雀斑样痣黑色素瘤、肢端黑色素瘤、结节性黑色素瘤、多发性骨髓瘤和 B 细胞淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤(Non-Hodgkin lymphoma, NHL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞性白血病、慢性成髓细胞性白血病、和移植后淋巴增殖性疾病(PTLD)、以及与癰疽病、水肿(例如与脑瘤有关的)和梅格斯氏(Meigs)综合征有关的异常血管增殖、脑瘤和脑癌、以及头颈癌。

在一些实施方案中，所述治疗、缓解或预防对宿主免疫系统的刺激是有益的疾病状况的方法，进一步包含施用免疫检查点抑制剂、抗原特异性免疫治疗剂、化疗试剂、表观遗传修饰剂、细胞因子、生长因子、抑制剂、靶向肿瘤抗原的抗体、肿瘤疫苗、和/或其他癌症疗法。在一个实施方案中，所述的免疫检查点包括但不限于 PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、CTLA-4、LAG-3、CD47、CEACAM-1、CEACAM-5、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4 或 TGFR。在一个实施方案中，所述的抗原特异性免疫治疗剂包含嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)、嵌合抗原受体 NK 细胞(CAR-NK 细胞)、和/或肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。在一个实施方案中，所述的其他癌症疗法包括但不限于外

科手术、化学疗法、细胞毒性剂、光动力疗法、免疫调节或放射疗法。

在一个实施方案中，本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，或包含本申请的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的药物组合物，可以与其它治疗剂（例如，免疫检查点抑制剂、抗原特异性免疫治疗剂、化疗试剂、表观遗传修饰剂、细胞因子、生长因子、抑制剂、靶向肿瘤抗原的抗体、和/或肿瘤疫苗）联合治疗，并且可以同时、顺序或以相反顺序施用。

通过以下的实施例进一步阐释了本申请，其不应被解释为进一步限制。本申请全文中引用的所有附图和所有参考文献、专利和专利申请的内容以引用的方式明确地并入本文。

实施例

实施例 1. 对人 IL-2 (hIL-2) 的改造

1.1 hIL-2 突变体的筛选及构建、表达

通过 MOE (Molecular Operating Environment) 软件分析显示 mIL-2 与 hIL-2 的三级结构几乎一致，在与大鼠抗小鼠 IL-2 抗体 S4B6 (S4B6) 的关键接触位点上仅有两处存在明显不同，即 mIL-2 第 78 位甘氨酸 (mIL-2/G78) 所对应的 hIL-2 第 64 位赖氨酸 (hIL-2/K64) 和 mIL-2 第 105 位精氨酸 (mIL-2/R105) 所对应的 hIL-2 第 90 位天冬酰胺 (hIL-2/N90)，而此两个位点的不同可能会阻碍 hIL-2 与 S4B6 抗体的结合，其中 hIL-2/N90 位点尤其关键，其所对应的 mIL-2/R105 与 S4B6 存在多个相互作用力，例如，盐键和氢键；hIL-2/K64 会与 S4B6 轻链 CDR3 形成严重的阻碍/冲突 (clash)。除此之外，与 mIL-2 第 119 位谷氨酸 (mIL-2/E119) 相比，其对应的 hIL-2 第 104 位甲硫氨酸残基 (hIL-2/M104) 侧链稍长，因此也有可能对抗体的结合产生阻碍。

基于上述分析结果，分别构建、表达了包含 K64G 和 N90R 两个点突变的 hIL-2 变体（该变体具有 his 标签，命名为 hIL2-DM-his），以及包含 K64G、N90R 和 M104E 三个点突变的 hIL-2 变体（该变体具有 his 标签，命名为 hIL2-TM-his），并以野生型小鼠 IL-2（具有 his 标签，称为 mIL2-his）作为对照组。各 hIL-2 变体的构建、表达和纯化的方法是通过基因合成得到编码野生型 hIL-2 的基因序列，利用 PCR 对 hIL-2 进行 K64G、N90R 和/或 M104E 的定点突变，将含有不同定点突变的 hIL-2 目的片段插入到 pcDNA3.1 表达载体中，并瞬转到 ExpiCHO-S 细胞 (Thermo, A29127) 中，进行无血清表达培养，并利用 AKTA Pure 系统进行镍柱亲和层析纯化。

1.2 hIL-2 变体与 chS4B6 结合动力学检测

通过分子相互作用仪 (ForteBio, 型号 R8) 分别对上述三种 IL-2 抗原与 S4B6 嵌合抗体 (chS4B6，由 S4B6 抗体的可变区和人 IgG1 的恒定区组成) 进行结合动力学检测，具体方法如下：用 1×PBS 溶液将待检测抗体 chS4B6 稀释至 5 μg/mL，并以 200 μL 每孔加入 96 孔黑板内；然后用 1×PBS 溶液将待检测抗原稀释至 100 nM，并作 1:2 梯度稀释后，以 200 μL 每孔加入同一个 96 孔黑板内。将盛有待测样品的 96 孔黑板和 Protein A 检测探针放置于机器内，设置程序，使 Protein A 探针结合待测抗体 chS4B6，随后进行与待测抗原的结合与解离检测。每一次结合与解离循环完毕后设置将探针浸没于 10 mM 甘氨酸缓冲液 (pH 1.5) 中使探针再生，并开始下一循环检测。待检测完毕后使用分析软件对相应抗体与抗原之间的结合常数和解离常数进行拟合计算，并得到亲和力和常数 (K_D) 数值。

检测结果如表 5 所示，表明对 hIL-2 进行突变而获得的 hIL-2 变体能够与 chS4B6 结合。

表 5. chS4B6 与抗原结合动力学分析结果

抗体：抗原	K _{off} (1/s)	K _{on} (1/Ms)	K _D (M)	Full R ²
chS4B6:hIL2-DM-his	1.060E-02	2.691E05	3.939E-08	0.9968
chS4B6:hIL2-TM-his	4.761E-03	2.104E05	2.263E-08	0.9955
chS4B6:mIL2-his	1.823E-04	1.829E05	9.964E-10	0.9995

(Full R² 表示拟合曲线与实测曲线的相似度)

1.3 hIL-2 变体生物学活性检测

分别使用 CTLL-2 细胞株 (购自 ATCC) 和 NK-92 细胞株 (购自 ATCC) 检测 hIL-2 变体的生物学活性，检测方法如下：于 1000 rpm 离心以收集处于对数生长期的 CTLL-2 细胞或 NK-92 细胞，然后用未添加 hIL-2 的完全培养基重悬细胞，并以每孔 1×10⁴ 个细胞接种到 96 孔细胞培养白板上。用未添加 hIL-2 的完全培养基将待检测样品 hIL-2 变体 (包括 hIL2-DM-his 和 hIL2-TM-his)，以及对照组样品 mIL2-his 和 hIL-2 (近岸蛋白) 稀释至 500 nM (用于 CTLL-2 细胞) 或 50 nM (用于 NK-92 细胞)，并作 1:5 梯度稀释；将稀释好的待测样品以每孔 20 μL 加入含有细胞的 96 孔细胞培养白板

中，并轻拍混匀。将细胞培养板置于 37℃/5% CO₂ 孵箱中静置培养 3 天，然后将细胞培养板从孵箱中取出，待细胞培养板降温至室温后每孔加入检测试剂 Cell Counting-Lite 2.0（南京诺唯赞）。将细胞培养板振荡并静置 10 min 后，于多功能酶标仪（Thermo, Varioskan）中进行检测，读取各孔化学发光值，并计算样品孔与对照孔的比值。

检测结果如图 1 和表 6 所示，hIL2-DM-his 和 hIL2-TM-his 均能促进 CTLL-2 细胞株和 NK-92 细胞株的增殖，且增殖活性（EC50 值）与对照组 hIL-2 相当，表明本申请的 hIL-2 变体均保留了 hIL-2 的生物学活性。

表 6. CTLL-2 细胞株和 NK-92 细胞株检测 hIL-2 变体的生物学活性

样品	CTLL-2 细胞增殖活性（EC50, nM）	NK-92 细胞增殖活性（EC50, nM）
hIL2-DM-his	0.2739	0.03904
hIL2-TM-his	0.209	0.04434
mIL2-his	0.4878	0.07761
hIL-2	0.1615	0.02033

（mIL-2-his 和 hIL-2 是对照组样品）

由此，通过对野生型 hIL-2 上关键位点的突变，所述关键位点是 IL-2 抗原与所述 IL-2 抗体结合部位的氨基酸，本申请获得了能够与 mIL-2 抗体 S4B6 结合的 hIL-2 变体，且保留了 hIL-2 的生物学活性。

实施例 2. 对大鼠抗小鼠 IL-2 抗体 S4B6 的人源化改造

为了减少宿主对大鼠抗小鼠 IL-2 抗体 S4B6 的免疫应答，将 S4B6 进行人源化改造，使其能够应用到人体内。

2.1 CDR 移植

使用 CDR 移植方法对 S4B6 抗体进行人源化改造，具体为：根据 S4B6 氨基酸序列，按照 MOE 软件分析推荐模板进行 CDR 移植，即将 S4B6 的轻链可变区和重链可变区与人类免疫球蛋白基因数据库进行 Blast 比对，选择与 S4B6 抗体同源性最高的人种系（germline）IGVH 和 IGVK 作为用于人源化改造的受体框架。将 S4B6 抗体重链可变区或轻链可变区的 CDR 移植到所选择的人种系框架区中，得到如表 7 所示的 4 条人源化 hS4B6 抗体氨基酸序列。

表 7. 抗小鼠 IL-2 抗体 S4B6 人源化序列分析

抗体编号	重链编号	重链 Germline	重链匹配度	轻链编号	轻链 Germline	轻链匹配度
S4B6	S4B6	IGHV1-69-2*01	62%	S4B6	IGKV1-39*01	66%
H1K1	H1	IGHV4-59*02	98%	K1	IGKV3-20*01	98%
H3K3	H3	IGHV2-5*02	96%	K3	IGKV3-11*01	98%
H6K3	H6	IGHV1-69-2*01	96%	K3	IGKV3-11*01	98%
H6K7	H6	IGHV1-69-2*01	96%	K7	IGKV1-39*01	98%

基因合成编码表 7 所示各人源化抗体的序列，将各编码序列分别插入 pcDNA3.1 表达载体中，瞬转 ExpiCHO-S 细胞进行无血清表达培养，并利用 AKTA pure 系统进行 Protein A 亲和层析纯化，获得表 7 所示的人源化抗体后，分别使用 ELISA 和 ForteBio 动力学检测 hS4B6 人源化抗体与抗原 mIL2-his 或 hIL2-his 的结合活性以及结合亲和力。

2.1.1 ELISA 检测 hS4B6 人源化抗体与抗原 mIL2-his 或 hIL2-his 的结合活性

ELISA 检测方法如下：用 1×PBS 缓冲液稀释羊抗人 IgG（Jackson Immunoresearch）至 1 μg/mL，并以 100 μL/孔加入到 ELISA 板中，4℃孵育过夜。PBS 洗板后每孔加入封闭液（含有 1% BSA 的 PBST），室温静置孵育 1 小时。PBST 洗板后每孔加入终浓度为 13.3 nM 的待测样品（包括 hS4B6 人源化抗体和对照嵌合抗体 chS4B6），室温静置孵育 2 小时。PBST 洗板后每孔中加入 100 μL 含有梯度稀释后不同浓度的 IL-2 抗原（mIL2-his 或 hIL2-his）的封闭液，室温静置孵育 2 小时。PBST 洗板；然后每孔加入以 1：10,000 稀释于封闭液中的 HRP-标记的抗 6×His 标签二抗（Proteintech），室温静置孵育 1 小时。PBST 洗板后每孔加入 TMB 显色液（Thermo），室温避光孵育 3-10 分钟；每孔加入终止液（2 M HCl）后于多功能酶标仪（Thermo, Varioskan）中读取 OD(450-570)值。

检测结果如图 2 和表 8 所示,在经过初步人源化之后的 IL-2 抗体中,人源化抗体 H6K3 与 mIL-2 的结合活性与 chS4B6 相当, H1K1 和 H6K7 与 mIL-2 的结合活性略低于 chS4B6, 表明这三株人源化抗体保留了鼠源抗体 S4B6 与 mIL-2 的结合活性, 其中, H6K3 最大程度地保留了 S4B6 与 mIL-2 的结合活性, 而 H1K1 和 H6K7 次之。

表 8. ELISA 检测 S4B6 人源化抗体 (hS4B6) 与抗原 mIL2-his 的结合活性

	chS4B6	hS4B6			
		H1K1	H3K3	H6K3	H6K7
EC50 (μg/mL)	0.01388	0.03569	0.1851	0.01832	0.03565

2.1.2 hS4B6 人源化抗体与抗原 mIL2-his 的结合动力学检测

使用实施例 1 中 1.2 所述方法检测 hS4B6 人源化抗体和对照嵌合抗体 chS4B6 与抗原 mIL2-his 的结合动力学。结果如表 9 所示, 在经过初步人源化之后的抗 IL-2 抗体中, H6K3 和 H6K7 均能以高亲和力与 mIL-2 结合, 而 H1K1 和 H3K3 均以中等亲和力与 mIL-2 的结合, 表明初步人源化后的 hS4B6 抗体均能与 mIL-2 特异性结合。

表 9. hS4B6 人源化抗体与抗原结合动力学分析结果

抗体：抗原	K _{off} (1/s)	K _{on} (1/Ms)	K _D (M)	Full R ²
chS4B6:mIL2-his	1.823E-04	1.829E05	9.964E-10	0.9995
H1K1:mIL2-his	7.186E-04	2.769E04	2.595E-08	0.9993
H3K3:mIL2-his	2.646E-03	2.005E05	1.320E-08	0.8133
H6K3:mIL2-his	1.799E-04	1.792E05	1.004E-09	0.9993
H6K7:mIL2-his	1.212E-03	8.638E05	1.403E-09	0.9984

(Full R² 表示拟合曲线与实测曲线的相似度)

2.1.3 人源化抗体 H6K3 与抗原 hIL-2 变体的结合动力学检测

使用实施例 1 中 1.2 所述方法检测人源化抗体 H6K3 与抗原 hIL-2 变体 (hIL2-DM-his 或 hIL2-TM-his) 的结合动力学。结果如表 10 所示, 人源化抗体 H6K3 与两种 hIL-2 变体均具有良好的结合动力学特征, 且 H6K3 与 hIL2-DM-his 和 hIL2-TM-his 的结合亲和力无显著差异。相比之下, 如图 2 所示, 人源化抗体 H6K3 基本上不与 hIL-2 结合, 表明了所述的抗原 hIL-2 变体获得与抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段结合的能力。

表 10. 人源化抗体 H6K3 与抗原 hIL-2 变体结合动力学分析结果

抗体：抗原	K _{off} (1/s)	K _{on} (1/Ms)	K _D (M)	Full R ²
H6K3:hIL2-DM-his	1.005E-02	2.220E05	4.529E-08	0.9976
H6K3:hIL2-TM-his	5.688E-03	2.372E04	2.398E-08	0.9963

(Full R² 表示拟合曲线与实测曲线的相似度)

2.2 深度人源化

为了进一步提高上述抗体人源化程度, 通过在线网站 abYsis (<http://abysis.org/abysis/index.html>) 和 MOE 软件对人源化抗体 H6K3 的轻、重链 CDR 序列中相对低频的氨基酸残基以及 FR 区中的鼠源氨基酸残基进行分析, 并开展深度人源化研究。深度人源化突变位点如表 11 所示。

表 11. 抗体 H6K3 深度人源化位点

深度人源化抗体编号	位置	突变情况
H6K3-hu01	H27	D27Y
H6K3-hu02	H29	I29F
H6K3-hu03	H31	A31D
H6K3-hu04	H34	<u>L34M</u>
H6K3-hu05	H48	I48M

H6K3-hu06	H65	N65S
H6K3-hu07	H65	N65G
H6K3-hu08	H76	N76D
H6K3-hu09	L56	D56S
H6K3-hu10	L56	D56T
H6K3-hu11	L66	R66G
H6K3-hu12	L71	Y71F

按照实施例 2 中 2.1 所述方法构建、表达表 11 中 12 个深度人源化抗体样品，经深度人源化改造后的各抗体均具有较高的表达量。在进一步纯化得到 12 个深度人源化抗体样品后，使用实施例 1 中 1.2 所述方法检测深度人源化抗体与抗原 hIL2-DM-his 的结合动力学。检测结果如表 12 所示，深度人源化抗体 H6K3-hu04、H6K3-hu06、H6K3-hu07、H6K3-hu08、H6K3-hu09、H6K3-hu10 和 H6K3-hu12 均能与 hIL2-DM-his 结合，且具有良好的结合动力学特征，表明这些深度人源化抗体能够特异性结合 hIL-2 变体 hIL2-DM。

表 12. hS4B6-H6K3 深度人源化抗体与抗原 hIL2-DM-his 结合动力学分析结果

抗体：抗原	K _{off} (1/s)	K _{on} (1/Ms)	K _D (M)	结合响应值 (nm)
H6K3-hu01:hIL2-DM-his	/	/	/	不结合
H6K3-hu02:hIL2-DM-his	/	/	/	不结合
H6K3-hu03:hIL2-DM-his	/	/	/	不结合
H6K3-hu04:hIL2-DM-his	1.486E-02	4.298E05	3.457E-08	0.1429
H6K3-hu05:hIL2-DM-his	1.525E-02	3.874E05	3.937E-08	0.1387
H6K3-hu06:hIL2-DM-his	1.917E-02	3.647E05	5.255E-08	0.1345
H6K3-hu07:hIL2-DM-his	1.811E-02	4.001E05	4.528E-08	0.1296
H6K3-hu08:hIL2-DM-his	2.068E-02	3.559E05	5.810E-08	0.1269
H6K3-hu09:hIL2-DM-his	8.673E-03	3.669E05	2.364E-08	0.1804
H6K3-hu10:hIL2-DM-his	1.055E-02	3.725E05	2.833E-08	0.1716
H6K3-hu11:hIL2-DM-his	/	/	/	不结合
H6K3-hu12:hIL2-DM-his	1.736E-02	5.368E05	3.233E-08	0.1517
H6K3:hIL2-DM-his	1.935E-02	4.130E05	4.686E-08	0.1330

根据表 12 所示结果，进一步选择 H6K3-hu04（突变位点为 L34M）、H6K3-hu07（突变位点为 N65G）和 H6K3-hu08（突变位点为 N76D）突变组合为深度人源化抗体分子重链可变区，H6K3-hu09（突变位点为 D56S）和 H6K3-hu12（突变位点为 Y71F）组合为轻链可变区，并将含有这些突变组合的人源化抗体编号为 hS4B6-H6K3(H)，该人源化抗体也可显著降低在生产制备过程中潜在的天冬氨酸异构化风险。

按照实施例 2 中 2.1 所述方法构建、表达和纯化 hS4B6-H6K3(H)抗体样品后，使用实施例 1 中 1.2 所述方法检测 hS4B6-H6K3(H)与抗原 hIL2-DM-his、hIL2-TM-his、或对照 mL2-his 的结合动力学。检测结果如表 13 所示，hS4B6-H6K3(H)抗体不仅具备了更高程度的人源化水平，而且还保持了与 hIL-2 变体高特异性结合的生物学特性。

表 13. hS4B6-H6K3(H)抗体与抗原结合动力学分析结果

抗体：抗原	K _{off} (1/s)	K _{on} (1/Ms)	K _D (M)	Full R ²
hS4B6-H6K3(H):mIL2-his	2.359E-04	9.277E05	2.543E-10	0.9998
hS4B6-H6K3(H):hIL2-DM-his	3.843E-03	2.421E04	1.587E-08	0.9971

hS4B6-H6K3(H):hIL2-TM-his	2.702E-03	2.735E05	9.879E-09	0.9963
---------------------------	-----------	----------	-----------	--------

(Full R² 表示拟合曲线与实测曲线的相似度)

实施例 3. 抗体 hS4B6-H6K3(H)的亲合力成熟

为了进一步增强抗体 hS4B6-H6K3(H)与 hIL-2 变体的结合亲和力, 根据已解析的 S4B6:mIL2 抗体-抗原复合物的晶体结构, 通过 MOE 软件模拟计算抗体 hS4B6-H6K3(H)重链 CDR 区和轻链 CDR 区中定点突变的位点。按照实施例 2 中 2.1 所述方法构建、表达重链 CDR 区或轻链 CDR 区单点突变的抗体 hS4B6-H6K3(H)样品, 使用实施例 1 中 1.2 所述方法检测 hS4B6-H6K3(H)亲和力成熟单点突变体与抗原 hIL2-DM-his 的结合动力学, 发现重链亲和力成熟突变 E53D、V95I、Y98L 或 S100T, 以及轻链亲和力成熟突变 D28N、D28H、D28L、D28Y、G30I、G30S、G30T、S50Q 或 T52G 均表现出优于母本抗体 hS4B6-H6K3(H)与 hIL-2 变体的结合亲和力。

进一步对所述重链 CDR 区和轻链 CDR 区单点突变进行组合, 按照实施例 2 中 2.1 所述方法构建、表达亲和力成熟的人源化抗体样品, 使用实施例 1 中 1.2 所述方法检测 hS4B6-H6K3(H)和/或其亲和力成熟抗体与抗原 hIL2-DM-his 的结合动力学, 检测结果如表 14 所示。选择母本抗体 hS4B6-H6K3(H)轻链 CDR 区突变 D28Y、或 D28Y/S50Q、或 D28Y/G30S、或 D28Y/G30S/S50Q, 或其与所述重链 CDR 区突变组合, 所得到的亲和力成熟抗体均显著提高了与 hIL-2 变体的结合亲和力, 且 hS4B6-H6K3(H)亲和力成熟抗体与 hIL-2 变体结合亲和力 (平衡解离常数 K_D) 能够达到 10⁻⁹ M, 甚至 10⁻¹⁰ M。

表 14. hS4B6-H6K3(H)亲和力成熟抗体与抗原 hIL2-DM-his 的结合动力学分析结果

hS4B6-H6K3(H)亲和力成熟抗体			K _D (M)	K _a (1/Ms)	K _{dis} (1/s)	Full R ²
编号	重链 CDR 区突变	轻链 CDR 区突变				
K1G1	无	D28Y+G30S+S50Q	1.433E-09	3.427E05	4.911E-04	0.9134
K1G2	V95I		1.537E-09	3.372E05	5.181E-04	0.9092
K1G3	E53D		1.353E-09	3.978E05	5.381E-04	0.8953
K1G4	Y98L		1.403E-09	3.637E05	5.102E-04	0.9161
K1G5	S100T		1.472E-09	4.253E05	6.262E-04	0.8891
K1G6	V95I+E53D		1.076E-09	3.897E05	4.193E-04	0.8981
K1G7	V95I+S100T		1.375E-09	4.527E05	6.225E-04	0.8598
K1G8	V95I+Y98L		7.782E-10	3.737E05	2.909E-04	0.9157
K1G9	V95I+S100T+Y98L		8.564E-10	3.331E05	2.852E-04	0.9272
K1G10	V95I+E53D+S100T		9.571E-10	3.887E05	3.720E-04	0.8895
K1G11	V95I+E53D+Y98L		9.284E-10	4.012E05	3.725E-04	0.9037
K1G12	V95I+S100T+Y98L+E53D		9.267E-10	4.278E05	3.964E-04	0.8976
K2G1	无	D28Y+G30S	1.534E-09	4.413E05	6.769E-04	0.9167
K2G2	V95I		1.326E-09	4.238E05	5.620E-04	0.9141
K2G3	E53D		1.318E-09	3.886E05	5.122E-04	0.9038
K2G4	Y98L		1.081E-09	4.206E05	4.547E-04	0.917
K2G5	S100T		1.396E-09	3.963E05	5.531E-04	0.9138
K2G6	V95I+E53D		1.331E-09	4.456E05	5.932E-04	0.8858
K2G7	V95I+S100T		1.355E-09	3.610E05	4.892E-04	0.9085
K2G8	V95I+Y98L		1.133E-09	4.476E05	5.069E-04	0.9043
K2G9	V95I+S100T+Y98L		9.241E-10	4.621E05	4.270E-04	0.8997
K2G10	V95I+E53D+S100T		9.734E-10	4.293E05	4.179E-04	0.8973

K2G11	V95I+E53D+Y98L		5.442E-10	4.586E05	2.496E-04	0.919
K2G12	V95I+S100T+Y98L+E53D		7.437E-10	4.647E05	3.456E-04	0.9004
K3G1	无	D28Y+S50Q	4.401E-09	4.237E05	1.865E-03	0.9138
K3G2	V95I		2.912E-09	4.067E05	1.184E-03	0.9023
K3G3	E53D		3.337E-09	4.002E05	1.335E-03	0.9084
K3G4	Y98L		2.999E-09	4.080E05	1.224E-03	0.9206
K3G5	S100T		3.722E-09	3.335E05	1.241E-03	0.9173
K3G6	V95I+E53D		2.129E-09	3.966E05	8.442E-04	0.8889
K3G7	V95I+S100T		1.956E-09	3.356E05	6.563E-04	0.9154
K3G8	V95I+Y98L		1.502E-09	2.969E05	4.460E-04	0.9339
K3G9	V95I+S100T+Y98L		1.486E-09	3.559E05	5.288E-04	0.9297
K3G10	V95I+E53D+S100T		1.455E-09	4.018E05	5.848E-04	0.903
K3G11	V95I+E53D+Y98L		6.145E-10	3.911E05	2.403E-04	0.9318
K3G12	V95I+S100T+Y98L+E53D		1.102E-09	3.441E05	3.793E-04	0.9077
K4G1	无	D28Y	4.277E-09	3.521E05	1.506E-03	0.9424
K4G2	V95I		3.718E-09	3.835E05	1.426E-03	0.9326
K4G3	E53D		3.084E-09	3.511E05	1.083E-03	0.9373
K4G4	Y98L		2.251E-09	3.644E05	8.201E-04	0.9602
K4G5	S100T		2.699E-09	4.184E05	1.129E-03	0.949
K4G6	V95I+E53D		2.332E-09	4.264E05	9.943E-04	0.9287
K4G7	V95I+S100T		3.203E-09	3.958E05	1.268E-03	0.9128
K4G8	V95I+Y98L		2.490E-09	3.436E05	8.557E-04	0.9366
K4G9	V95I+S100T+Y98L		2.216E-09	3.916E05	8.679E-04	0.9157
K4G10	V95I+E53D+S100T		2.472E-09	3.669E05	9.071E-04	0.9118
K4G11	V95I+E53D+Y98L		1.564E-09	4.125E05	6.451E-04	0.9278
K4G12	V95I+S100T+Y98L+E53D		6.858E-10	4.759E05	3.264E-04	0.9269

(Full R²表示拟合曲线与实测曲线的相似度)

通过分子相互作用仪(ForteBio, 型号 Qke)对 hIL2-DM 在与抗体 K2G11 结合形成复合物后与 IL2R α 和 IL2R β 的结合进行检测,具体方法如下:用 1×PBS 溶液将待检测抗体 K2G11 稀释至 5 μ g/mL,并以每孔 200 μ L 加入 96 孔黑板内,然后用 1×PBS 溶液将抗原 hIL2-DM 稀释至 100 nM,并以每孔 200 μ L 加入上述 96 孔黑板内。用 1×PBS 溶液将受体蛋白 IL2R α 和 IL2R β 稀释至 1000 nM,并作 1:2 梯度稀释,随后以每孔 200 μ L 加入上述 96 孔黑板内。将盛有待测样品的 96 孔黑板和 Protein A 检测探针放置于机器内,设置程序,使 Protein A 探针结合待测抗体 K2G11 后,与抗原 hIL2-DM 结合至饱和,随后依次与受体蛋白 CD25 和 CD122 进行结合-解离检测。每一次结合-解离循环完毕后将探针浸没于 10 mM 甘氨酸缓冲液(pH 1.5)中使探针再生,并开始下一个循环检测。

检测结果如图 3 所示,表明抗体 K2G11 能够阻断 hIL2-DM 与 hIL2R α 的结合(图3A),但是不影响其与 hIL2R β 的结合(图3B)。

实施例 4. IL-2/IL-2 抗体融合蛋白的构建及生物学活性检测

4.1 连接子的筛选

通过 MOE 软件对 hIL2-DM 连接抗体 hS4B6-H6K3(H)的位置、连接子类型及长度、以及连接子是否会影响 hIL2-DM 与 hIL2R β / γ 的结合活性进行模拟分析,结果显示,当选择(G4S)₄、(G4S)₃、(GAF)₂序列作为连接子时,不仅能保证所构建的融合蛋白内部结构的稳定性,而且所述连接子与 hIL2-DM

的 C 末端和抗体重链 N 末端连接时,对 hIL2-DM 与 hIL2Rβ结合的影响较小,而所述连接子与 hIL2-DM 的 C 末端和抗体轻链 N 末端连接时,对 hIL2-DM 与 hIL2Rβ结合的影响较大,且会影响所述融合蛋白的产量;此外,(G4S)₄序列的连接子还具有低免疫原性。因此,优选 hIL2-DM 通过 4 个串联的 G4S 序列连接到抗体重链 N 末端的方式构建 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白。

4.2 二硫键的筛选

为了确保所构建的融合蛋白中的抗原-抗体复合物在体内处于稳定的结合状态,不发生解离,且无法被高亲和力 IL2R 竞争结合于 IL-2,通过 MOE 软件计算 S4B6/mIL-2 抗原-抗体复合物晶体结构中各氨基酸残基间的距离,并选取部分空间距离在 10 埃范围以内的氨基酸残基突变为半胱氨酸,使得 hIL-2 变体与 hS4B6-H6K3(H)抗体之间通过形成二硫键进一步稳固结合。表 15 显示了 hIL-2 变体与 hS4B6-H6K3(H)抗体之间二硫键形成部位的氨基酸突变位点。包含二硫键的构建体结构如图 4 所示。

表 15. hIL-2 变体与 hS4B6-H6K3(H)抗体之间二硫键形成部位的氨基酸突变位点

编号	氨基酸残基位点	hIL2 序列	hS4B6-H6K3(H)序列	hS4B6-H6K3(H)引入半胱氨酸残基突变点位置
IC-Cy01	IL:61-L:30	<u>E</u> 61	<u>C</u> 30	LCDR1
IC-Cy02	IL:61-L:31	<u>E</u> 61	<u>N</u> 31	LCDR1
IC-Cy03	IL:61-L:50	<u>E</u> 61	<u>S</u> 50	LCDR2
IC-Cy04	IL:104-L:52	<u>M</u> 104	<u>T</u> 52	LCDR2
IC-Cy05	IL:102-L:67	<u>T</u> 102	<u>S</u> 67	LFR3
IC-Cy06	IL:102-L:68	<u>T</u> 102	<u>G</u> 68	LFR3
IC-Cy07	IL:64-H:97	<u>K</u> 64	<u>F</u> 97	HCDR3
IC-Cy08	IL:65-H:97	<u>P</u> 65	<u>F</u> 97	HCDR3

(IL 表示 IL-2, L 表示抗体轻链, H 表示抗体重链, IL 或 L/H 后的数字表示突变点所对应的氨基酸位点)

将表 15 中的构建体按照实施例 2 中 2.1 所述方法构建、表达和纯化后通过 SEC-HPLC 分析,挑选能形成稳定单体的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy07 (即 H6K3(H)-Cy07) 和 IC-Cy08 (即 H6K3(H)-Cy08) 进行进一步的研究。

4.2.1 ELISA 分别检测 IC-Cy07 和 IC-Cy08 与 hIL2α (hCD25) 和 hIL2β (hCD122) 的结合活性

按照实施例 2 中 2.1.1 所述 ELISA 检测方法,并将抗原分别替换为 hCD25 (Acro) 和 hCD122 (Acro),分别检测 IC-Cy07 和 IC-Cy08 与 hCD25 和 hCD122 的结合活性,设置 hIL2-DM-Fc 为对照组。与 hCD25 的结合活性如图 5A 所示,与对照 hIL2-DM-Fc 相比,IC-Cy08 几乎不与 hCD25 结合,而 IC-Cy07 仅具有小幅降低了的 hCD25 结合活性;与 hCD122 的结合活性如图 5B 所示,相对于对照组 hIL2-DM-Fc, IC-Cy08 和 IC-Cy07 与 hCD122 的结合活性都得到了一定程度的增强,该结果与文献报道一致,即与 S4B6 结合后 mIL-2 的 C-螺旋会发生变构从而增强与 mCD122 结合。此外,IC-Cy08 与 hCD122 的结合活性显著高于 IC-Cy07 和 hIL2-DM-Fc。

综上, IC-Cy08 和 IC-Cy07 均具有增强的与 hCD122 结合的活性,且 IC-Cy08 还几乎完全丧失了与 hCD25 结合的能力,这也进一步表明 IC-Cy08 中 hIL-2 变体的 α 受体结合位点完全被包埋在抗体融合蛋白分子内部且不易解离,因而不能与 hCD25 结合。

4.2.2 IC-Cy07 和 IC-Cy08 生物学活性检测

按照实施例 1 中 1.3 所述方法,通过 CTLL-2 细胞株和 NK-92 细胞株增殖实验分别检测 IC-Cy07 和 IC-Cy08 的生物学活性,对照组为野生型 hIL-2。检测结果如图 6 所示, IC-Cy08 促进高表达 CD25 的 CTLL-2 细胞增殖的活性 (EC50 值) 显著低于对照组 hIL-2 (图 6A 和表 16), 而促进 CD25 低表达的 NK-92 细胞增殖的活性与对照组 hIL-2 相当 (图 6B 和表 16); IC-Cy07 对 CTLL-2 细胞增殖活性与对照组 hIL-2 相当 (图 6A 和表 16), 而对 NK-92 细胞的增殖活性则略强于对照组 hIL-2 (图 6B 和表 16)。

表 16. CTLL-2 和 NK-92 细胞增殖实验检测含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy07 和 IC-Cy08 的生物学活性

样品	CTLL-2 细胞增殖活性 (EC50, nM)	NK-92 细胞增殖活性 (EC50, nM)
hIL-2	0.1615	0.03056

IC-Cy07	0.1494	0.01481
IC-Cy08	1.316	0.03399

(hIL-2 为对照组)

4.2.3 流式细胞术检测 IC-Cy08 对 CTLL-2 细胞株中 IL-2 信号通路的激活作用

IL-2 与 IL2R 的结合能够诱导胞内 JAK 激酶的活化,进而磷酸化激活信号转导及转录激活因子 5 (Signal transduction and activator of transcription 5, STAT5),最终调控参与细胞过程(例如增殖、存活和凋亡)的多种基因的表达。通过检测表达高亲和力 IL2R 的 CTLL2 细胞株中 STAT5 磷酸化情况来评价含有二硫键的 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy08 对 IL-2 信号通路的激活作用,具体方法如下:离心收集 CTLL-2 细胞,然后用完全培养基重悬细胞并置于 37℃/5% CO₂ 孵箱中静置饥饿培养 4 小时。离心收集细胞并再次用完全培养基重悬细胞,以每孔 5×10⁵ 个细胞铺入 96 孔细胞培养 U 型板中;用完全培养基以 1:5 的比例梯度稀释待检测样品 (IC-Cy08 以及对照组野生型 hIL-2),并以每孔 50 μL 的体积加入上述细胞培养板中,然后将细胞培养板置于 37℃/5% CO₂ 孵箱中静置培养 15-30 分钟。每孔加入 37℃ 预热的固定缓冲液 (Biolegend),充分混匀后于 37℃ 静置 15-30 分钟。离心收集细胞,并用 FACS 缓冲液(含有 1% BSA 的 1×PBS)清洗细胞 2 次。每孔加入 -20℃ 预冷的 True-Phos Perm 缓冲液 (Biolegend),充分混匀后于 -20℃ 静置 1 小时。离心收集细胞,并用 FACS 缓冲液清洗细胞 2 次,然后每孔加入 100 μL 以 1:50 稀释于 FACS 缓冲液中的 anti-pSTAT5 (Tyr694) -PE 抗体 (Thermo),重悬细胞后置于冰上孵育 40 分钟。离心收集细胞,并用 FACS 缓冲液清洗细胞 2 次,再用 FACS 缓冲液重悬细胞并置于流式细胞仪进行检测。

检测结果如图 7 和表 17 所示,相对于对照组 hIL-2, CTLL-2 细胞在 IC-Cy08 的作用下表现出显著降低的 pSTAT5 水平,由此进一步表明包含二硫键的复合物构建体 IC-Cy08 分子中 hIL-2 变体的 α 受体结合位点由于与抗体部分稳定结合而未暴露于分子表面,因此显著降低了与 CTLL-2 细胞表面高亲和力 IL2R 的结合,从而下调了细胞内 IL-2 信号通路的传导。

表 17. 流式细胞术检测经含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy08 以及对照(hIL-2)的处理,在 CTLL-2 细胞株 IL-2 信号通路传导中 STAT5 磷酸化水平

	hIL-2	IC-Cy08
EC50 (nM)	0.006492	0.2335

实施例 5. hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白结构的进一步优化

5.1 S4B6 抗体与 CD122 位阻分析及优化

通过分析 S4B6/mIL-2 抗原-抗体复合物晶体结构 (PDB:4YUE),发现抗体轻链第 27 位 Gln (位于 LCDR1) 可能会与 CD122 第 43 位 Arg 形成空间位阻,进而抑制本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中 hIL-2 与 hCD122 的结合。为了检测该位阻是否真实存在,且是否会影响 IC-Cy08 的生物学活性,设计并构建表达了一系列对 IC-Cy08 抗体轻链进行点突变的突变体,此外还对抗体轻链第 1 位 Asp 进行突变 (如表 18 所示),以评价这些突变体与 hCD122 的结合活性以及生物学活性。

表 18. 经 hS4B6-H6K3(H)轻链优化的 IC-Cy08 突变体

突变体编号	待突变残基位点及氨基酸	突变前 a.a.残基	突变后 a.a.残基
IC-Cy08-DE	L1: D L27: Q	D	E
IC-Cy08-QD			D
IC-Cy08-QE			E
IC-Cy08-QS			S
IC-Cy08-QG		Q	G
IC-Cy08-QK			K
IC-Cy08-QR			R

(L 表示轻链, L 后面的数字表示突变氨基酸的位点)

5.1.1 ELISA 检测 IC-Cy08 突变体分别与 hIL2Rα (hCD25) 和 hIL2Rβ (hCD122) 的结合活性

按照实施例 2 中 2.1.1 所述 ELISA 检测方法,并将抗原分别替换为 hCD25 (Acro) 和 hCD122 (Acro),分别检测表 18 中 IC-Cy08 突变体与 hIL2Rα (hCD25) 和 hIL2Rβ (hCD122) 的结合活性,并设置 hIL2-DM-Fc 为对照组。其中, IC-Cy08 突变体与 hCD25 的结合活性如图 8A 所示,各突变体与母本 IC-Cy08 相比与 hCD25 的结合活性并未发生明显变化,与对照组 hIL2-DM-Fc 相比则具有显著降低的 hCD25 结合活性。然而,突变体 IC-Cy08-QS、IC-Cy08-QG、IC-Cy08-QK 和 IC-Cy08-QR 相对于母本 IC-Cy08 表现出一定程度减弱的 hCD122 结合活性,且具有与对照组 hIL2-DM-Fc 相当的

hCD122 结合活性；其他三个突变体 IC-Cy08-DE、IC-Cy08-QD 和 IC-Cy08-QE 具有与母本 IC-Cy08 相当的 hCD122 结合活性，且具有比对照组 hIL2-DM-Fc 增加了的 hCD122 结合活性（图 8B）。

5.1.2 IC-Cy08 突变体生物学活性检测

按照实施例 1 中 1.3 所述方法，通过 CTLL-2 细胞株和 NK-92 细胞株增殖实验分别检测 IC-Cy08 突变体的生物学活性，对照组为野生型 hIL-2。检测结果如图 9 所示，7 个 IC-Cy08 突变体均保留了母本 IC-Cy08 对 CTLL-2 细胞（图 9A 和表 19）和 NK-92 细胞（图 9B 和表 19）的促增殖活性，且与对照组 hIL-2 相比，7 个 IC-Cy08 突变体和母本 IC-Cy08 均具有显著降低了的 CTLL-2 细胞促增殖活性（图 9A 和表 19）以及相当的 NK-92 细胞增殖活性（图 9B 和表 19）。

表 19. CTLL-2 和 NK-92 细胞增殖实验检测经抗体轻链优化的含有二硫键的 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy08 突变体的生物学活性

样品	CTLL-2 细胞增殖活性（EC50, nM）	NK-92 细胞增殖活性（EC50, nM）
hIL-2	0.1469	0.01572
IC-Cy08	3.352	0.02635
IC-Cy08-DE	3.36	0.02332
IC-Cy08-QD	3.621	0.02743
IC-Cy08-QE	3.847	0.02612
IC-Cy08-QS	4.64	0.03701
IC-Cy08-QG	3.991	0.0301
IC-Cy08-QK	3.518	0.02691
IC-Cy08-QR	3.061	0.0247

（hIL-2、母本 IC-Cy08 是对照组）

尽管 IC-Cy08-QS、IC-Cy08-QG、IC-Cy08-QK 和 IC-Cy08-QR 相对于母本 IC-Cy08 表现出减弱的 hCD122 结合活性，但是对 CTLL-2 细胞和 NK 细胞的增殖活性与 IC-Cy08 的相当，即并未降低 CTLL-2 细胞和 NK 细胞的增殖活性。由此表明 IC-Cy08 分子中抗体轻链第 27 位 Gln 不会显著影响 hIL2 与 hCD122 的结合活性及其功能活性。

此外，在表达制备上述 IC-Cy08 突变体样品时发现 IC-Cy08-QD、IC-Cy08-QE、IC-Cy08-QS 和 IC-Cy08-QG 的表达量较母本 IC-Cy08 均有翻倍的提升（表 20）。

表 20. 各 IC-Cy08 突变体的表达量

IC-Cy08 突变体样品	表达量(mg/L)
IC-Cy08	40
IC-Cy08-DE	93
IC-Cy08-QD	158
IC-Cy08-QE	140
IC-Cy08-QS	113
IC-Cy08-QG	154
IC-Cy08-QK	28
IC-Cy08-QR	47

5.2 hIL-2 氨基酸序列优化

通过分析 hIL-2 氨基酸序列，发现其第 3 位苏氨酸残基会在真核细胞表达过程中发生糖基化修饰，且第 125 位存在游离半胱氨酸残基，可能会在下游生产制备过程中发生二硫键错配而聚集，不利于产品的质量。因此采取删除 N 端前 3 个氨基酸，并对 hIL-2 第 125 位半胱氨酸残基进行突变的方式以消除这些位点可能带来的不利影响。如表 21 所示，本申请设计了包含删除 hIL-2-DM 的 N 末端前 3 个氨基酸和对第 125 位半胱氨酸进行不同氨基酸替换的一系列 IC-Cy08 突变体。

表 21. 经 hIL-2-DM 氨基酸序列优化的 IC-Cy08 突变体

突变体编号	hIL-2 N 端前三个氨基酸 APT	hIL-2 第 125 位氨基酸残基
IC-Cy08 (Δ3,WT)	删除 APT	C
IC-Cy08 (Δ3,C125A)	删除 APT	A
IC-Cy08 (Δ3,C125L)	删除 APT	L
IC-Cy08 (Δ3,C125S)	删除 APT	S
IC-Cy08 (Δ3,C125Q)	删除 APT	Q
IC-Cy08 (Δ3,C125V)	删除 APT	V

按照实施例 2 中 2.1 所述方法表达、纯化表 21 中各 IC-Cy08 突变体，并按照实施例 1 中 1.3 所述方法检测其分别对 CTLL-2 和 NK-92 细胞的增殖活性。实验结果如图 10 所示，各 IC-Cy08 突变体对 CTLL-2 细胞（图 10A 和表 22）和 NK-92 细胞（图 10B 和表 22）增殖活性与母本 IC-Cy08 相当，且与对照组 hIL-2 相比，具有显著降低的 CTLL-2 细胞增殖活性（图 10A 和表 22）和略微降低的 NK-92 细胞增殖活性（图 10B 和表 22）。由此表明，通过删除 hIL-2 的 N 末端前三个氨基酸以及突变第 125 位半胱氨酸能够在对活性不造成显著影响的前提下解决该分子在生产制备过程中的潜在风险。

表 22. CTLL-2 和 NK-92 细胞增殖实验检测经 hIL-2 氨基酸序列优化的含有二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy08 突变体的生物学活性

样品	CTLL-2 细胞增殖活性 (EC50, nM)	NK-92 细胞增殖活性 (EC50, nM)
hIL-2	0.1956	0.008233
IC-Cy08	2.332	0.01564
IC-Cy08 (Δ3, WT)	2.140	0.02636
IC-Cy08 (Δ3, C125A)	2.270	0.02469
IC-Cy08 (Δ3, C125L)	3.158	0.02812
IC-Cy08 (Δ3, C125S)	3.260	0.02886
IC-Cy08 (Δ3, C125Q)	4.425	0.03354
IC-Cy08 (Δ3, C125V)	2.407	0.02878

(hIL-2、母本 IC-Cy08 是对照组)

5.3 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中抗体部分重链恒定区的改造

为了延长本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白在体内的半衰期以及为了防止抗体 Fc 区介导的效应子功能对靶细胞或非靶细胞造成杀伤作用，对所述分子中抗体部分重链恒定区进行了工程化改造。

5.3.1 对抗体重链恒定区进行等电点 (pI) 工程化改造

为了延长本申请的融合蛋白在体内的半衰期，在 IC-Cy08 的抗体部分重链 IgG1 恒定区中引入了 N203D/K274Q/Q419E (EU numbering) 突变 (定义为“pI 突变”)。

5.3.2 对抗体 Fc 片段进行工程化改造

为了防止抗体 Fc 区介导的效应子功能对本申请的融合蛋白的靶细胞或非靶细胞造成杀伤作用，通过在 Fc 区中引入了 L234F/L235E/P331S (EU numbering) 突变 (定义为“TM 突变”) 以降低 Fc 区与 FcγRs 和 C1q 的结合，从而消除 Fc 介导的效应子功能。

5.3.3 抗体部分重链恒定区经 pI 突变和 TM 突变后的 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白生物学活性

按照实施例 2 中 2.1 所述方法表达、纯化包含上述抗体部分重链恒定区经 pI 突变和 TM 突变后的 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy08-pITM，并按照实施例 1 中 1.3 所述方法检测其分别对 CTLL-2 和 NK-92 细胞的增殖活性。实验结果如图 11 所示，IC-Cy08-pITM 具有与母本 IC-Cy08 几乎相同的 CTLL-2 (图 11A 和表 23) 和 NK-92 (图 11B 和表 23) 细胞促增殖活性。

表 23. CTLL-2 和 NK-92 细胞增殖检测对抗体部分重链恒定区经 pI 突变和 TM 突变后的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy08-pITM 的生物学活性

样品	CTLL-2 细胞增殖活性 (EC50, nM)	NK-92 细胞增殖活性 (EC50, nM)
hIL-2	0.1469	0.01626
IC-Cy08	3.159	0.03117
IC-Cy08-pITM	3.352	0.02929

实施例 6. 由 hS4B6-H6K3(H)亲和力和成熟抗体所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白及其生物学活性检测

6.1 二硫键筛选

在筛选得到显著增强与 hIL2-DM 结合的 hS4B6-H6K3(H)亲和力和成熟抗体 K2G11 后，按照实施例 4 所述方法构建 hIL2-DM (Δ3, C125L) 与 K2G11 的抗原-抗体融合蛋白，以期得到结构更稳定的候选分子。融合蛋白构建选择(G4S)₄为连接子，并通过 hIL2-DM (Δ3, C125L) 的 C 末端与 K2G11 抗体重链 N 末端相连。hIL2-DM (Δ3, C125L) 与 K2G11 抗体之间二硫键形成部位的氨基酸突变位点如表 24 所示，以进一步评价二硫键正确形成的可能。包含二硫键的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的结构如图 4 所示。

表 24. hIL-2 变体与亲和力和成熟抗体 K2G11 之间二硫键形成部位的氨基酸突变位点

编号	氨基酸残基位点	hIL2 序列	K2G11 序列	K2G11 引入半胱氨酸残基突变点位置
K2G11-Cy01	IL:61-L:30	<u>E61</u>	<u>S30</u>	LCDR1
K2G11-Cy02	IL:61-L:31	<u>E61</u>	<u>N31</u>	LCDR1
K2G11-Cy03	IL:61-L:50	<u>E61</u>	<u>S50</u>	LCDR2
K2G11-Cy04	IL:104-L:52	<u>M104</u>	<u>T52</u>	LCDR2
K2G11-Cy05	IL:102-L:67	<u>T102</u>	<u>S67</u>	LFR3
K2G11-Cy06	IL:102-L:68	<u>T102</u>	<u>G68</u>	LFR3
K2G11-Cy07	IL:64-H:97	<u>K64</u>	<u>F97</u>	HCDR3
K2G11-Cy08	IL:65-H:97	<u>P65</u>	<u>F97</u>	HCDR3
K2G11-Cy09	IL:64-L:92	<u>K64</u>	<u>Y92</u>	LCDR3
K2G11-Cy10	IL:42-H:97	<u>F42</u>	<u>F97</u>	HCDR3
K2G11-Cy11	IL:60-L:30	<u>E60</u>	<u>S30</u>	LCDR1
K2G11-Cy12	IL:64-L:32	<u>K64</u>	<u>Y32</u>	LCDR1
H6K3(H)-Cy10	IL:42-H:97	<u>F42</u>	<u>F97</u>	HCDR3

(IL 表示 IL-2, L 表示抗体轻链, H 表示抗体重链, IL 或 L/H 后的数字表示突变点所对应的氨基酸位点)

将表 24 中的构建体按照实施例 2 中 2.1 所述方法构建、表达和纯化后通过 SEC-HPLC 分析, 挑选能形成稳定单体的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy04、K2G11-Cy05 和 K2G11-Cy06 进行进一步的研究, 并以基于母本 hS4B6-H6K3(H) 抗体所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 IC-Cy08 (H6K3(H)-Cy08) 和 H6K3(H)-Cy10 作为对照。

6.2 ELISA 检测基于 K2G11 所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白与 hIL2R α (hCD25)和 hIL2R β (hCD122) 的结合活性

按照实施例 4 中 4.2.1 所述 ELISA 检测方法, 分别检测 K2G11-Cy04、K2G11-Cy05 和 K2G11-Cy06 与 hCD25 和 hCD122 的结合活性, 设置 hIL2-DM-Fc、H6K3(H)-Cy08 以及 H6K3(H)-Cy10 为对照组, 检测结果如图 12A 所示, 与对照 hIL2-DM-Fc 相比, K2G11-Cy04、K2G11-Cy05、K2G11-Cy06 以及 H6K3(H)-Cy10 几乎完全不与 hCD25 结合, 而 H6K3(H)-Cy08 在高浓度下表现出小幅的 hCD25 结合活性; 与 hCD122 的结合活性如图 12B 所示, 各样品均表现出无明显差异的结合活性。

综上, K2G11-Cy04、K2G11-Cy05、K2G11-Cy06 以及 H6K3(H)-Cy10 相较于 H6K3(H)-Cy08 即使在高浓度下也能够完全抑制 hIL-2 变体与 hCD25 的结合, 这也进一步表明它们中 IL-2 的 α 亚基受体结合位点被更加稳定地包埋在抗体融合蛋白分子内部且不会被 hCD25 竞争性结合。

6.3 基于 K2G11 所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的生物学活性检测

按照实施例 1 中 1.3 所述方法, 通过 CTLL-2 细胞株和 NK-92 细胞株增殖实验检测基于 K2G11 抗体与 hIL2-DM (Δ 3, 125L) 的 hIL2/IL2 抗体融合蛋白的生物学活性。检测结果如图 13 所示, 相较于对照组 hIL-2 (购自近岸蛋白)、hIL-2 变体 hIL2-DM (Δ 3, C125L), 以及预孵育 K2G11 抗体与 hIL2-DM (Δ 3, 125L) 而形成的抗原-抗体复合物, K2G11-Cy04、K2G11-Cy05、K2G11-Cy06 以及 H6K3(H)-Cy10 在促进高表达 CD25 的 CTLL-2 细胞增殖活性 (EC50 值) 中表现出大幅的降低, 且降低的程度显著大于 H6K3(H)-Cy08 (图 13A, 表 25), 而在低表达 CD25 的 NK-92 细胞中, K2G11-Cy04、K2G11-Cy05、K2G11-Cy06 和 H6K3(H)-Cy10 相对于对照组 hIL-2、hIL-2 变体 hIL2-DM (Δ 3, C125L) 以及 K2G11: hIL2-DM (Δ 3, 125L) 抗原-抗体复合物表现出的细胞增殖活性无显著差异 (图 13B, 表 25), 该结果表明 K2G11-Cy04、K2G11-Cy05、K2G11-Cy06 和 H6K3(H)-Cy10 分子中 IL-2 的 α 亚基受体结合位点由于二硫键的形成更加稳定地被包埋在分子内部, 而不会被高亲和力和 IL2R 所竞争结合。

表 25. CTLL-2 和 NK-92 细胞增殖实验检测基于 K2G11 抗体含有二硫键 IL-2/IL-2 抗体融合蛋白的生物学活性

样品	CTLL-2 细胞增殖活性 (EC50, nM)	NK-92 细胞增殖活性 (EC50, nM)
----	-----------------------------	----------------------------

hIL-2	0.0959	0.01552
hIL2-DM(Δ3, 125L)	0.1556	0.02585
K2G11: hIL2-DM(Δ3, 125L)	0.0642	0.01276
K2G11-Cy04	9.174	0.04227
K2G11-Cy05	11.23	0.04152
K2G11-Cy06	5.773	0.05182
H6K3(H)-Cy10	11.68	0.04628
H6K3(H)-Cy08	0.4255	0.01554
K2G11	-	-

(hIL-2 为对照组)

实施例 7. ForteBio 检测基于 K2G11 所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白与 hIL2Rα、hIL2Rα/β以及 hIL2Rα/β/γ的结合

通过分子相互作用仪 (ForteBio, 型号 Qke) 对基于 K2G11 与 hIL2-DM (Δ3, 125L) 所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白与 IL2Rα、IL2Rα/β及 IL2Rα/β/γ的结合进行检测, 具体方法如下: 用 1×PBS 溶液将 Biotin-CD25 (Acro) 稀释至 5 μg/mL, 并以每孔 200 μL 加入 96 孔黑板内; 再用 1×PBS 溶液将 hIL2Rβ (Acro) 稀释至 5 μg/mL, 并以每孔 200 μL 加入上述 96 孔黑板内; 然后以 1×PBS、5 μg/mL hIL2Rβ (Acro) 和 5 μg/mL hIL2Rγ (Acro) 稀释样品 hIL2-DM (Δ3, C125L) 和 K2G11-Cy05 至 100 nM, 并以每孔 200 μL 加入上述 96 孔黑板内。将盛有待测样品的 96 孔黑板和 SA 检测探针放置于机器内并设置程序, 首先使 SA 探针结合 Biotin-CD25 (Acro), 随后与 hIL2Rβ (Acro) 结合至饱和, 再使探针浸没于样品孔中, 并对结合信号进行实时检测。每一次结合-解离循环完毕后将探针浸没于 500 mM 磷酸缓冲液中使探针再生, 并开始下一次循环检测。

检测结果如图 14 所示, 表明基于 K2G11 与 hIL2-DM (Δ3, 125L) 所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy05 不仅抑制了与 hIL2Rα的结合 (图 14A), 还由于位阻效应抑制了与包含 hIL2Rα亚基在内的 hIL2Rα/β (图 14B) 及 hIL2Rα/β/γ (图 14C) 聚合体的结合。

实施例 8. ELISA 法比较 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy05 和 NARA1leukin 与 hCD25 的结合

用 hCD25 (Acro) 包被 ELISA 板, 并以 HRP anti-human IgG Fc (H+L) (Jackson Immunoresearch) 作为二抗, 按照实施例 4 中 4.2.1 所述方法, 检测实施例 6 制备得到的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy05 和采用由专利申请 WO2017122130 所述方法制备得到的 NARA1leukin 蛋白与 CD25 的结合活性。

检测结果如图 15 所示, 随着抗体浓度的增加, NARA1leukin 逐渐表现出与 hCD25 的结合, 而本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy05 在检测范围内均未表现出与 hCD25 的结合, 表明通过本申请所采用的二硫键共价连接方式构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其分子内部的 hIL-2 变体与抗 IL-2 抗体之间的结合更加稳定, 能够更大程度的阻止 hCD25 与融合蛋白中 IL-2 组分的竞争性结合。

实施例 9. 利用报告基因法和细胞增殖法检测本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的生物学活性

9.1 报告基因法检测

通过报告基因方法检测实施例 6 制备得到的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy05 在高表达 CD25 细胞株中激活 IL-2 下游信号通路的活性, 以 NARA1leukin 蛋白为对照分子。具体方法如下: 离心收集 IL-2 Bioassay 细胞 (Promega), 并用培养基重悬至 8×10⁵ 细胞/mL, 然后加入 96 孔白板上, 于 37℃/5% CO₂ 过夜孵育。用培养基梯度稀释 K2G11-Cy05 和 NARA1leukin, 并以野生型 hIL-2 作为阳性对照; 将稀释好的样品加入上述 96 孔白板上并于 37℃/5% CO₂ 孵育 6 小时。将 96 孔板置于室温平衡 30 分钟, 然后加入检测试剂 One-Lite Luciferase agent (南京诺唯赞), 并用多功能酶标仪读取化学发光值。

检测结果如图 16A 所示, 在高表达 CD25 的细胞株中, NARA1leukin 在高浓度下表现出一定的激活 IL-2 下游信号通路的活性, 而本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy05 在检测范围内均未表现出明显的激活信号通路的活性。

9.2 细胞增殖法检测

按照实施例 1 中 1.3 所述方法, 通过 CTLL-2 细胞株和 CD25 敲除的 NK-92 (CD25-KO) 细胞株增殖实验检测 hIL2/IL2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy05 以及 NARA1leukin 的生物学活性。检测结果如图 16B 和表 26 所示, 相较于对照组 hIL-2, K2G11-Cy05 对高表达 CD25 的 CTLL-2 细胞的促增殖活性表现出大幅的降低, 且降低程度显著大于 NARA1leukin; 而在 CD25 敲除的 NK-92 (CD25-KO) 细胞中, K2G11-Cy05 和 NARA1leukin 相对于 hIL-2 表现出的促细胞增殖活性无显著差异。

以上结果进一步证明通过本申请所采用的二硫键连接方式能够更好的稳定 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白结构, 并能够更大程度的阻止 hCD25 与本申请的融合蛋白中 IL-2 组分的竞争性结合。

表 26. CTLL-2 和 NK-92 细胞增殖实验检测 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy05 以及 NARA1leukin 的生物学活性

样品	CTLL-2 细胞增殖活性 (EC50, nM)	NK-92 (CD25-KO) 细胞增殖活性 (EC50, nM)
hIL-2	0.210	0.027
NARA1leukin	1.318	0.054
K2G11-Cy05	9.170	0.065

实施例 10. 对抗体部分重链恒定区包含 pI 突变和 TM 突变的抗 IL-2 抗体以及基于此抗体所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白热稳定性检测

利用 nanoTemper Prometheus Panta 对抗体部分重链恒定区包含 pI 突变和 TM 突变的抗 IL-2 抗体以及基于此所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的热稳定性进行检测, 以考察在重链恒定区引入 pI 突变和 TM 突变对所述抗 IL-2 抗体稳定性的影响, 以及基于此抗体和 hIL-2 变体 (hIL2-DM (Δ 3, C125L)) 所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白及其分子内部引入的二硫键是否稳定。其中, 重链恒定区经 pI 突变和 TM 突变后的抗 IL-2 抗体 K2G11-pITM 按照实施例 5 所述方法构建, 其对照为实施例 3 所得到的重链恒定区未经突变的抗 IL-2 人源化抗体 K2G11; hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白是按照实施例 6 所述方法制备得到的抗体部分重链恒定区包含 pI 突变和 TM 突变的 K2G11-Cy04、K2G11-Cy05 和 K2G11-Cy06。具体检测方法如下: 将各样品分别用 1×PBS 稀释至 1 mg/mL 并于 4℃ 离心 15 分钟, 然后用毛细检测管吸取样品上清并放置于检测台上, 各样品进行 2 个重复管检测。设置检测程序, 温度范围设定为 25 至 95℃; 运行程序并进行数据记录。待程序运行完毕后, 用分析软件对数据进行分析。

抗 IL-2 抗体稳定性检测结果如表 27 所示, 尽管 K2G11-pITM 的 T_{m1} 值 (65.94℃) 较对照抗体 K2G11 (70.44℃) 有所下降, 但从整体来看, K2G11-pITM 的 T_{onset} 值和 $T_{turbidity}$ 值分别约为 60℃ 左右和 80℃ 左右, 与对照抗体 K2G11 相当, 属于抗体表现的正常范围。因此, 在重链恒定区引入 pI 突变和 TM 突变不会对本申请的抗 IL-2 抗体的稳定性造成严重影响。

对 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白稳定性检测的结果如表 28 所示, 抗体部分重链恒定区包含 pI 突变和 TM 突变的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy04、K2G11-Cy05 和 K2G11-Cy06 的 T_{m1} 值约为 65℃, 与抗 IL-2 人源化抗体 K2G11-pITM 的相似, 均为抗体部分重链恒定区 CH2 结构域的变性温度; 反映三个 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白样品的抗体部分 Fab 区与 hIL-2 变体 (hIL2-DM (Δ 3, C125L)) 结合稳定性的 T_{m2} 值均在 80℃ 以上, 且整个分子的 $T_{turbidity}$ 值较 K2G11-pITM 也表现出显著的提高, 表明在抗 IL-2 人源化抗体和 hIL-2 变体中分别引入的半胱氨酸残基取代不仅能够在二者之间形成稳定的二硫键, 而且能够显著提高由此所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白分子的稳定性。

表 27. K2G11 以及重链恒定区经 pI 突变和 TM 突变的 K2G11-pITM 热稳定性

样品	T_{m1} (°C)		T_{m2} (°C)		T_{onset} (°C)		$T_{turbidity}$ (°C)	
	f	s	f	s	f	s	f	s
K2G11	70.44	0.03	78.54	0.06	63.84	0.29	78.27	0.15
K2G11-pITM	65.94	0.03	79.25	0.05	58.54	0.44	79.42	0.00

(f: 平均值; s: 标准偏差)

表 28 抗体部分重链恒定区包含 pI 突变和 TM 突变的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白热稳定性

样品	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	T_{m3} (°C)	T_{onset} (°C)	$T_{turbidity}$ (°C)
----	---------------	---------------	---------------	------------------	----------------------

	f	s	f	s	f	s	f	s	f	s
K2G11-Cy04	65.82	0.05	81.90	0.12	89.75	0.07	58.55	0.15	88.97	0.29
K2G11-Cy05	65.81	/	82.29	/	88.82	/	59.48	/	86.9	/
K2G11-Cy06	65.86	0.09	83.56	0.15	87.92	0.04	57.29	0.14	84.89	0.19

(f: 平均值; s: 标准偏差)

实施例 11. 重链恒定区包含 pI 突变和 TM 突变的抗 IL-2 人源化抗体以及基于此所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白与 Fc 受体和 FcRn 的结合动力学检测

使用实施例 1 中 1.2 所述方法检测重链恒定区包含 pI 突变和 TM 突变的抗 IL-2 人源化抗体 K2G11-pITM 以及基于此所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy05 和对照抗体 K2G11 与 FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa-158F、FcγRIIIa-158V、FcRn、C1q 以及 FcRn 的结合动力学。

检测结果如图 17 所示，相对于对照抗体 K2G11，K2G11-pITM 和 K2G11-Cy05 与 Fc 受体（包括 FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa-158F 和 FcγRIIIa-158V）以及 C1q 均基本不结合（图 17A 和图 17B），而与 FcRn 的结合亲和力则无显著差异（图 17C），表明在重链恒定区引入 TM 突变能够降低抗体 Fc 区与 Fc 受体的结合，从而减弱抗体和/或抗体融合蛋白 Fc 端介导的效应功能（包括 ADCC 和 CDC 作用），但是 pITM 突变却不影响其与 FcRn 的结合。

实施例 12. 报告基因法检测 hIL-2/hIL-2 抗体融合蛋白的 ADCC 活性

为了进一步验证在抗体部分重链恒定区引入 TM 突变能够减弱 Fc 介导的效应功能，本申请利用表达 FcγRIIIa-158V 和 NFAT 反应元件调控萤火虫荧光素酶表达的 Jurkat 细胞（Promega）作为效应细胞，利用表达 IL2R 的 NK-92 细胞作为靶向细胞，对实施例 6 制备得到的抗体部分重链恒定区含有 TM 突变的 K2G11-Cy05 的 ADCC 活性进行检测，并设置抗 EGFR 抗体西妥昔单抗和 A431 细胞为阳性对照组。具体方法如下：分别离心收集 NK-92 细胞和 A431 细胞，用 ADCC 检测缓冲液（含有 0.5% FBS 的 RPMI-1640）重悬后，以 1.5×10^4 /孔加入 96 孔白板中。用 ADCC 检测缓冲液梯度稀释待检测样品，以 25 μL/孔加入上述 96 孔板中。离心收集效应细胞（Jurkat 细胞）并用 ADCC 检测缓冲液重悬后，以 1.5×10^5 /孔加入上述 96 孔板中，然后置于 37℃/5% CO₂ 孵箱中孵育过夜。第二天将 96 孔板置于室温平衡，然后加入检测试剂 One-Lite Luciferase agent（南京诺唯赞），使用多功能酶标仪读取化学发光值。

检测结果如图 18 所示，与阳性对照组（西妥昔单抗+A431 细胞）相比，K2G11-Cy05 即使在最高浓度下也没有显著刺激效应细胞表达荧光素酶，表明在抗体部分重链恒定区引入 TM 突变可以显著降低 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白与 Fc 受体的亲和力，从而使得所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 Fc 所介导的 ADCC 活性显著降低。

实施例 13. hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白分别在食蟹猴和健康人血清中的稳定性

本实验用于研究实施例 6 制备得到的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy04 和 K2G11-Cy05 在食蟹猴和健康人血清中的稳定性。

13.1 NK-92 细胞检测 K2G11-Cy04 和 K2G11-Cy05 分别经食蟹猴和人血清孵育处理后的生物学活性的变化

具体方法如下：将 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy04 和 K2G11-Cy05 分别稀释于采自两食蟹猴（一雌一雄，M6 和 M7）和两健康人（H2 和 H3）的血清中，终浓度为 100 μg/mL，混匀分装至离心管中，分别制备为经食蟹猴血清处理的样品 M6-Cy04、M7-Cy04、M6-Cy05 和 M7-Cy05，以及经健康人血清处理的样品 H2-Cy04、H3-Cy04、H2-Cy05 和 H3-Cy05，并置于 37℃ 孵箱中静置孵育，开始孵育的时间点定义为第 0 天（0 小时）。分别于指定时间点进行取样并保存于 -80℃ 待检；经食蟹猴血清处理的样品的取样时间点为第 3 天（72 小时）、第 7 天（168 小时）和第 14 天（336 小时）；经健康人血清处理的样品的取样时间点为第 7 天（168 小时）、第 14 天（336 小时）和第 21 天（504 小时）。待所有样品收集完毕后，按照实施例 1 所述方法利用 NK-92 细胞检测各样品的生物学活性，并设置未经血清处理的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白样品 K2G11-Cy04 和 K2G11-Cy05，以及 hIL-2 作为对照组。

检测结果如表 29、表 30、图 19A 和图 19B 所示，与未经血清处理的样品相比，hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy04 和 K2G11-Cy05 即使在 37℃ 下于食蟹猴血清（图 19A）和人血清（图 19B）中处理长达 14 天和 21 天，仍能完全保留其生物学活性，表明本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白具

有良好的血清稳定性。

表 29. hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白在食蟹猴血清中的稳定性

孵育时间	EC50 (nM)					
	M6-Cy04	M7-Cy04	M6-Cy05	M7-Cy05	K2G11-Cy04	K2G11-Cy05
第 3 天	0.02452	0.03409	0.03991	0.03235	0.03450	0.03437
第 7 天	0.03132	0.03609	0.02518	0.03246	0.03795	0.03653
第 14 天	0.03234	0.03441	0.02422	0.02731	0.03795	0.03653

表 30. hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白在健康人血清中的稳定性

孵育时间	EC50 (nM)						
	H2-Cy04	H3-Cy04	H2-Cy05	H3-Cy05	K2G11-Cy04	K2G11-Cy05	hIL-2
第 7 天	0.04715	0.03973	0.04523	0.04897	0.04821	0.05252	0.03448
第 14 天	0.04616	0.02624	0.05170	0.04103	0.04821	0.05252	0.03448
第 21 天	0.04731	0.04436	0.05538	0.04546	0.04821	0.05252	0.03448

13.2 报告基因法检测 K2G11-Cy04 和 K2G11-Cy05 分别经健康人血清孵育处理后的生物学活性的变化

将上述经健康人血清处理的样品 H2-Cy04、H3-Cy04、H2-Cy05 和 H3-Cy05 按照实施例 9 所述方法检测其在高表达 CD25 细胞株中激活 IL-2 下游信号通路的活性。

检测结果如图 19C 所示，即使 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy04 和 K2G11-Cy05 在 37℃ 下于人血清中分别处理长达 21 天和 7 天，其激活高表达 CD25 细胞株中 IL-2 下游信号通路的活性与未经处理的样品（K2G11-Cy04 和 K2G11-Cy05）相较无显著差异，表明 K2G11-Cy04 和 K2G11-Cy05 各自在人血清中处理 21 天和 7 天后，其 IL-2 组分和抗 IL-2 抗体组分结合界面的结构稳定性未受影响，依然能够保护所述融合蛋白中的 IL-2 组分不被高亲和力 IL2R 结合。因此，本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白具有良好的血清稳定性。

实施例 14. 本申请的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中二硫键的检测

通过液相色谱-质谱联用（LC-MS）检测实施例 6 制备得到的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy04 和 K2G11-Cy05 中的 hIL-2 变体与抗 IL-2 人源化抗体 K2G11 之间是否形成了正确配对的二硫键。具体方法如下所述。

K2G11-Cy04 中的二硫键检测：样品经盐酸胍变性、N-乙基马来酰亚胺（NEM）烷基化，换液脱盐后使用胰蛋白酶（Trypsin）(Promega, V5113)酶切，取一部分酶切样品 DTT 还原后加入 TFA (Thermo, 28904)终止反应，另一部分酶切样品直接加入 TFA 终止，得到最终样品后进行 LC-MS 检测。通过 UNIFI 软件分析数据得到实测二硫键连接数据。

K2G11-Cy05 中的二硫键检测：样品经盐酸胍变性、N-乙基马来酰亚胺（NEM）烷基化，换液脱盐后先使用 Trypsin 酶切，Trypsin 酶切后的样品均分成两份，一份补加 Chymotrypsin (Promega, V106A)继续酶切，一份补加 GluC (Promega, V165A)继续酶切，全部酶切结束后直接加入 TFA 终止，得到最终样品进行 LC-MS 检测。通过 UNIFI 软件分析数据得到实测二硫键连接数据。

检测结果如表 31 和表 32 所示，K2G11-Cy04 和 K2G11-Cy05 均在酶切后检测到了与理论片段大小相同的吸收峰，表明本申请所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白通过在 hIL-2 变体与抗 IL-2 人源化抗体 K2G11 的抗原-抗体结合界面引入半胱氨酸残基取代能够形成正确配对的二硫键。

表 31. K2G11-Cy04 中的二硫键检测

检测到的多肽片段	多肽片段中所包含的二硫键	蛋白酶
SS1	LC:C23-LC:C88	Trypsin
SS2	<u>LC:C52-HC:C101</u>	Trypsin
SS3	HC:C55-HC:C102	
SS4	LC:C134-LC:C194	Trypsin
SS5	LC:C214-HC:C376	Trypsin

检测到的多肽片段	多肽片段中所包含的二硫键	蛋白酶
SS6	HC:C172-HC:C246	Trypsin
SS7	HC:C300-HC:C356	Trypsin
SS8	HC:C382-HC:C382 HC:C385-HC:C385	Trypsin
SS9		
SS10	HC:C417-HC:C477	Trypsin
SS11	HC:C533-HC:C581	Trypsin

(下划线表示新构建的二硫键)

表 32. K2G11-Cy05 中的二硫键检测

检测到的多肽片段	多肽片段中所包含的二硫键	蛋白酶
SS1	LC:C23-LC:C88	Trypsin + Chymotrypsin
SS2	<u>LC:C67-HC:C99</u>	Trypsin + Chymotrypsin
SS3	HC:C55-HC:C102	Trypsin + GluC
SS4	LC:C134-LC:C194	Trypsin + Chymotrypsin
SS5	LC:C214-HC:C376	Trypsin + Chymotrypsin
SS6	HC:C172-HC:C246	Trypsin + Chymotrypsin
SS7	HC:C300-HC:C356	Trypsin + Chymotrypsin
SS8	HC:C382-HC:C382	Trypsin + Chymotrypsin
SS9	HC:C385-HC:C385	
SS10	HC:C417-HC:C477	Trypsin + Chymotrypsin
SS11	HC:C533-HC:C581	Trypsin + GluC

(下划线表示新构建的二硫键)

实施例 15. 重链恒定区包含 pI 突变和 TM 突变的抗 IL-2 抗体的药代动力学检测

为了验证在重链恒定区引入 pI 突变,使得抗 IL-2 抗体 K2G11 的 pI 值从 7.56 (计算值)降低至 6.54 (计算值) 是否能够延长其在体内的半衰期,利用 BALB/c 小鼠检测了未经 pI 突变的抗 IL-2 抗体 K2G11,以及重链恒定区引入 pI 突变和 TM 突变的抗 IL-2 抗体 K2G11-pITM 的半衰期。具体方法如下: BALB/c 小鼠通过尾静脉分别单次注射 K2G11 和 K2G11-pITM,给药剂量分别为 10 mg/kg 和 1 mg/kg。于给药结束后 0.25、1、3、8、24、48、96、168、240、336、408 和 504 小时对给药小鼠进行采血; 4℃ 离心后收取上清血浆并保存于 -80℃,待所有血样采集完毕后统一进行检测。小鼠血浆中药物浓度的检测采用 ELISA 方法,具体步骤如下: 将羊抗人 IgG Fc 片段抗体 (Jackson ImmunoResearch) 用 PBS 稀释至 1 µg/mL,以 50 µL/孔包被 96 孔 ELISA 板,于 4℃ 静置包被过夜。PBS 洗板后于每孔加入 1% BSA 进行封闭,室温静置 1 小时。用 1% BSA 稀释待测小鼠血浆样品; 同时用 1% BSA 稀释小鼠空白血浆至与稀释后待测样品中血浆基质浓度一致,并以此为缓冲液稀释 K2G11 和 K2G11-pITM 标准品至 1 µg/mL,随后进行 3 倍倍比稀释以制备标准样品。于上述 ELISA 板中加入稀释后的待测样品和标准样品,每孔 50 µL,室温静置孵育 2 小时。PBST (PBS, pH7.4; 0.1% Tween-20) 洗板后每孔加入 50 µL 1:10,000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 IgG F(ab)2 片段二抗 (Jackson ImmunoResearch),室温孵育 1 小时。PBST 洗板后于每孔加入 TMB 显色液,室温避光孵育 3-10 分钟后加入 2 M HCl 终止反应。通过多功能酶标仪 (Thermo Varioskan) 读取各孔 OD450 和 OD570 吸光值。将 OD450 值减去 OD570 值得出 OD(450/570)值,以标准曲线理论浓度为横坐标,OD (450/570) 值为纵坐标,用 Graphpad Prism 9 软件进行标准曲线绘制和标准样品回收率计算,回收率偏差=[(测定浓度-理论浓度)/理论浓度] × 100%,以±10%作为可接受的回收率偏差来确定定量范围。如待测样品 OD (450/570)值在标准曲线定量范围之内,则代入并计算得到血浆样品中药物浓度;若不在定量范围之内,则根据读值调整血浆样品的稀释比例重新进行 ELISA 检测。将待测样品 OD(450-570)值代入标准曲线,计算得到的浓度按稀释比例回算后,根据取样时间制作药-时曲线图。药代动力学分析采用 Microsoft EXCEL 软件中 PKSolver 2.0 插件,药代动力学参数的计算采用针对静脉注射给药的非房室模型而得出。

药-时曲线如图 20 所示。通过在重链恒定区引入 pI 突变使得抗 IL-2 抗体 K2G11-pITM 相较于重链恒定区未引入 pI 突变的 K2G11 抗体具有显著改善的药代动力学特征, 给药剂量为 1 mg/kg 的 K2G11-pITM 组消除半衰期 ($t_{1/2}$) 和药时曲线下面积 (AUC) 分别是相同剂量的 K2G11 组的约 2.5 倍和 1.3 倍; 给药剂量为 10 mg/kg 的 K2G11-pITM 组半衰期和 AUC 分别是相同剂量的 K2G11 组的约 3.3 倍和 1.4 倍。由此表明, 通过在重链恒定区引入 pI 突变降低了抗 IL-2 抗体 K2G11-pITM 的 pI 值, 导致其在小鼠体内的半衰期显著延长和 AUC 显著增加。

实施例 16. hIL-2/hIL-2 抗体融合蛋白的体内药效评价

16.1 hIL-2/hIL-2 抗体融合蛋白在食蟹猴体内药效评价

在如下所述接受实施例 6 制备得到的 hIL-2/hIL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy05 的食蟹猴外周血中测定 CD8⁺ T 细胞、NK 细胞和 Treg 细胞数以及增殖标志物 Ki-67 的表达变化; 具体方法如下所述。

给药及样品采集: 选取一雌一雄两只食蟹猴通过静脉注射 K2G11-Cy05, 每间隔 7 天以剂量递增方式依次给药 10、100 和 300 $\mu\text{g/kg}$, 各剂量给药一次; 并于给药前, 给药后 24 h、72 h、168 h 取外周血; 高剂量 (300 $\mu\text{g/kg}$) 额外于给药后 336 h 再取外周血一次。在取样当天对外周血样进行流式细胞术检测分析。

流式细胞术检测分析方法: 在流式管中加入 5 μL Human TruStain FcX (Biolegend), 再向各流式管中加入 100 μL 含抗凝剂全血, 室温静置孵育 10 min。取表染流式抗体 BV510 anti-human CD3 (BD), FITC anti-human CD4 (Biolegend), APC anti-human CD25 (Biolegend), AF700 anti-human CD8 (Biolegend) 和 PE-Cy7 anti-human CD16 (Biolegend) 混合后加入流式管中, 混匀静置冰上孵育 60 min。稀释 RBC 缓冲液 (Biolegend) 至 1 $\times$ 后加入到上述流式管中, 温和振荡后室温避光孵育 10-30 min。离心收集细胞并加入预冷 FACS 缓冲液 (含有 1% BSA 的 PBS 缓冲液) 清洗一次。每管加入 True-Nuclear 1 $\times$ Fix (Biolegend), 温和振荡后室温避光孵育 60 min, 然后每管加入 tube True-Nuclear 1 $\times$ Perm 缓冲液并离心去上清, 重复此步骤一次。各管用 True-Nuclear 1 $\times$ Perm 缓冲液重悬, 加入 PE anti-human Foxp3 (Biolegend) 和 eFluor 450 anti-human Ki-67 (Thermo) 流式抗体, 室温避光孵育 40 分钟。各管中细胞用 FACS 缓冲液清洗后重悬于 FACS 缓冲液, 然后置于流式仪 (Agilent, NovoCyte 3005) 中进行检测。

检测结果如图 21 所示, K2G11-Cy05 能够显著激活并提高食蟹猴外周血中 CD8⁺ T 细胞 (图 21A) 和 NK 细胞 (图 21B) 的增殖, 而 Treg 细胞数仅在中、高剂量给药下表现出瞬间的小幅增加, 但 Ki-67 表达基本维持不变 (图 21C), 其可能是由内源性 IL-2 的反馈调控所引起。由此可见, K2G11-Cy05 在食蟹猴体内能够选择性作用于表达 IL2R β/γ 的 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞, 并促进其增殖, 而不会通过 IL2R $\alpha/\beta/\gamma$ 显著激活 Treg 细胞。实验期间受试动物体重未发生明显改变, 未观察到临床症状上的严重不良反应。

16.2 hIL-2/hIL-2 抗体融合蛋白在 C57BL/6 小鼠体内药效评价

在如下所述接受实施例 6 制备得到的 hIL-2/hIL-2 抗体融合蛋白 K2G11-Cy05 的 C57BL/6 小鼠脾脏组织中测定记忆型 CD8⁺ T 细胞、NK 细胞、Treg 细胞、常规 CD4⁺ T 细胞数, 以及计算记忆型 CD8⁺ T 细胞与 Treg 细胞的比率、NK 细胞与 Treg 细胞的比率, 并统计各试验小鼠体重变化。具体方法如下所述。

试验分组及给药方式: 将 C57BL/6 小鼠分为 8 组 (每组 5 只小鼠), 具体为一组阴性对照组: PBS; 一组阳性对照组: hIL-2 (75 $\mu\text{g/kg}$); 三组实验对照组: hIL-2-DM ($\Delta 3$, C125L) 与抗 IL-2 抗体 K2G11-pITM 以摩尔比 2 : 1 形成的 hIL-2-DM ($\Delta 3$, C125L) : K2G11-pITM 免疫复合物【其中 hIL-2-DM ($\Delta 3$, C125L) 的剂量为 1.5 $\mu\text{g/kg}$, 5 $\mu\text{g/kg}$ 和 15 $\mu\text{g/kg}$ 】; 以及三组实验组: K2G11-Cy05 (10 $\mu\text{g/kg}$, 30 $\mu\text{g/kg}$ 和 100 $\mu\text{g/kg}$)。PBS 组和 hIL-2 组每天经尾静脉给药 1 次, 一共给药 4 次; 实验对照组 hIL-2-DM ($\Delta 3$, C125L) : K2G11-pITM 免疫复合物和实验组 K2G11-Cy05 每两天经尾静脉给药 1 次, 一共给药 2 次。隔天称量各组小鼠体重。所有组小鼠于最后一次给药后的第二天施行安乐死, 并提取小鼠脾脏细胞进行流式细胞术检测分析。

流式细胞术检测分析方法: 小鼠脾脏称重后, 用预冷 PBS 洗净并置于 200 目 (75 μm) 细胞筛网 (15-1070-ZX, Biologix) 上进行研磨, 以制备脾脏单细胞悬液。离心收集细胞后, 每管加入 1 $\times$ RBC 缓冲液 (Biolegend), 温和振荡后室温静置 5 分钟, 然后加入预冷 PBS 终止反应, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心收集细胞并用预冷 PBS 洗涤一次, 将细胞重悬于预冷的 PBS, 并加入到 96 孔 U 型深孔板中, 各样品加一个复孔。每孔加入用预冷的 PBS 以 1 : 500 倍稀释的 Zombie Yellow (Biolegend) 进行死活细胞染色, 室温避光孵育 15 分钟。每孔加入 FACS 缓冲液 (PBS, pH7.4; 1% BSA; 2 mM EDTA) 终止染色, 离心收集细胞。配制 Fc 受体封闭试剂, 以 2 μL 小鼠 TruStain FcX (Biolegend)/40 μL FACS 缓冲液/孔重

悬细胞，冰上静置 10 分钟。混合表染流式抗体 FITC anti-mouse CD3 (Biolegend), BV650 anti-mouse CD4 (Biolegend), AF700 anti-mouse CD8a (Biolegend), APC anti-mouse NK1.1(Biolegend), PE anti-mouse CD25 (Biolegend) 和 BV510 anti-mouse CD44 (Biolegend), 其中各抗体用量 2 μ L/孔, 加入上述各孔后,冰上静置孵育 40 分钟。用 FACS 缓冲液清洗细胞一次后每孔加入 True-Nuclear 1 $\times$ Fix, 室温下振荡避光孵育 60 分钟, 然后每孔加入 True-Nuclear 1 $\times$ Perm 缓冲液, 离心去上清; 重复此步骤一次。以 True-Nuclear 1 $\times$ Perm 缓冲液配制 BV421 anti-mouse Foxp3 (Biolegend), 抗体用量 2 μ L/50 μ L 缓冲液/孔, 以此重悬细胞后室温静置 60 min。用 True-Nuclear 1 $\times$ Perm 缓冲液清洗细胞 2 次后将细胞重悬于 FACS 缓冲液中, 通过流式细胞仪 (Agilent NovoCyte 3005) 进行检测分析。实验数据通过 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析, 各实验组间的数据差异在进行单向方差分析 (ANOVA) 后再对各实验组与溶媒对照组间的差异进行 Dunnett 检验, 若 p 值小于 0.05 则表示两者间具有显著的统计学差异。

检测结果如图 22 所示, 相较于 PBS 对照组, hIL-2 给药组小鼠体内的 Treg 细胞数极显著升高 ($p<0.0001$) (图 22A), 记忆型 CD8⁺ T 细胞 (CD8⁺CD44^{high}) 细胞数 (图 22A) 和 NK 细胞数 (图 22A) 虽也有一定上升, 但无统计学差异, 表明高剂量 hIL-2 在体内会优先刺激和促进 Treg 细胞增殖。在 K2G11-Cy05 各剂量组小鼠中, 发现其体内记忆型 CD8⁺ T 细胞 (图 22A) 和 NK 细胞 (图 22A) 的绝对数较 PBS 对照组和 hIL-2 组有极显著的增加 ($p<0.0001$), 并呈现剂量依赖性; Treg 细胞的绝对数 (图 22A) 虽也表现出些许的增加, 但与 PBS 对照组相比均不具有统计学差异, 也无剂量依赖性, 且均低于 hIL-2 给药组小鼠; 记忆型 CD8⁺ T 细胞与 Treg 细胞绝对计数比 (图 22B) 和 NK 细胞与 Treg 细胞的绝对计数比 (图 22B) 最高分别可达到 100 和 40 左右, 表明 K2G11-Cy05 在体内选择性地激活和促进记忆型 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞的增殖。hIL-2-DM (Δ 3,C125L): K2G11-pITM 免疫复合物给药组与 hIL-2 给药组相比, 免疫复合物仅在高剂量 (15 μ g/kg) 下显示出一定程度地选择性激活 NK 细胞 ($p<0.05$), 而记忆型 CD8⁺ T 细胞和 Treg 细胞绝对计数均无显著差异; 其它两个剂量组小鼠的记忆型 CD8⁺ T 细胞、NK 细胞和 Treg 细胞绝对计数与 hIL-2 给药组相比均无统计学差异。hIL-2-DM (Δ 3,C125L): K2G11-pITM 免疫复合物各剂量组与 K2G11-Cy05 各剂量组相比, 虽然在 hIL-2 给药量上相当, 但后者在诱导记忆型 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞增殖方面的效果显著优于前者。各组小鼠的常规 CD4⁺ T 细胞数均无显著变化 (图 22C), 并且各组小鼠在实验过程中均未发生死亡, 也未观察到临床症状上的任何不良反应, 并且体重变化不显著 (图 22D), 因此显示 K2G11-Cy05 体内安全性良好。

16.3 hIL-2/hIL-2 抗体融合蛋白在 CT26 小鼠肿瘤模型中的抗肿瘤作用

将 5×10^5 的 CT26 结肠癌细胞皮下注射到 Balb/C 小鼠中, 待平均肿瘤体积长到约 100 mm³ 时记为第一天, 并对荷瘤小鼠进行分组, 包括对照组 PBS 和 NARA1leukin (0.3 mg/kg), 以及试验组 K2G11-Cy05 (0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg 和 0.3 mg/kg), 共 5 组, 每组 8 只小鼠。每组荷瘤小鼠分别于第 1 天、第 4 天、第 8 天和第 11 天经尾静脉各给药 1 次, 并于给药当天测量荷瘤小鼠肿瘤大小, 并根据公式: 体积=(长) $\times$ (宽)² $\times$ 0.5 计算肿瘤体积。

实验结果如图 23 所示, K2G11-Cy05 各剂量组对荷瘤小鼠肿瘤的生长抑制作用呈剂量依赖性, 且 K2G11-Cy05 给药剂量 0.3 mg/kg 组的小鼠肿瘤体积显著小于 PBS 对照组。此外, 在相同剂量下, K2G11-Cy05 对肿瘤生长的抑制作用优于 NARA1leukin。由此表明本申请的 hIL-2/hIL-2 抗体融合蛋白通过在体内选择性地激活和促进记忆型 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞增殖, 从而发挥良好的抗肿瘤作用。

实施例 17. 由其它 hIL-2 抗体与 hIL-2 通过二硫键连接而构建为稳定的 hIL-2/hIL-2 抗体融合蛋白

17.1 hIL-2/NARA1 抗体融合蛋白和 hIL-2/TCB2 抗体融合蛋白的构建

按照实施例 4 所述方法分别构建 hIL-2/NARA1 抗体融合蛋白和 hIL-2/TCB2 抗体融合蛋白, 简言之, 首先, hIL-2 通过 4 个串联的 G4S 序列连接到 NARA1 或 TCB2 轻链 N 末端, 可以保证所构建的融合蛋白内部结构的稳定性, 以及所述融合蛋白对 hIL-2 与 hIL2R β 结合的影响较小。然后, 在 hIL-2/NARA1 或 hIL-2/TCB2 抗原-抗体复合物的抗原-抗体结合部位中, 选择空间距离在 5 埃范围以内的部分氨基酸残基突变为半胱氨酸, 使得 hIL-2 与 NARA1 或 TCB2 抗体之间通过二硫键进一步稳定结合, 所构建的 hIL-2/hIL-2 抗体融合蛋白结构如图 4 所示。表 33 和表 34 分别显示了 hIL-2 与 NARA1 和 TCB2 抗体之间二硫键形成部位的氨基酸突变位点。

表 33. hIL-2 与 NARA1 抗体二硫键形成部位的氨基酸突变位点

编号	氨基酸残基位点	hIL2 序列	NARA1 序列	NARA1 引入半胱氨酸突变点位置
NARA1-Cy01	IL:111-H:54	T111	S54	HCDR2

NARA1-Cy02	IL:73-H:97	A73	G97	HCDR3
NARA1-Cy03	IL:34-H:100B	P34	A100B	HCDR3
NARA1-Cy04	IL:75-L:28	S75	D28	LCDR1
NARA1-Cy05	IL:77-L:28	N77	D28	LCDR1
NARA1-Cy06	IL:34-L:91	P34	S91	LCDR3
NARA1-Cy07	IL:34-L:92	P34	N92	LCDR3
NARA1-Cy08	IL:37-L:94	T37	D94	LCDR3
NARA1-Cy09	IL:68-H:31	E68	N31	HCDR1
NARA1-Cy10	IL:41-H:51	T41	I51	HCDR2
NARA1-Cy11	IL:42-H:56	F42	G56	HCDR2

(IL 表示 IL-2, L 表示抗体轻链, H 表示抗体重链, IL 或 L/H 后的数字表示突变点所对应的氨基酸位点)

表 34. hIL-2 与 TCB2 抗体二硫键形成部位的氨基酸突变位点

编号	氨基酸残基位点	hIL2 序列	TCB2 序列	TCB2 引入半胱氨酸突变点位置
TCB2-Cy01	IL:68-H:97	E68	A97	HCDR3
TCB2-Cy02	IL:42-H:99	F42	R99	HCDR3
TCB2-Cy03	IL:68-H:100	E68	G100	HCDR3
TCB2-Cy04	IL:38-H:100A	R38	F100A	HCDR3
TCB2-Cy05	IL:109-H:54	D109	D54	HCDR2
TCB2-Cy06	IL:34-L:27	P34	T27	LCDR1
TCB2-Cy07	IL:34-L:92	P34	D92	LCDR3
TCB2-Cy08	IL:34-L:93	P34	N93	LCDR3
TCB2-Cy09	IL:36-L:93	L36	N93	LCDR3
TCB2-Cy10	IL:37-L:93	T37	N93	LCDR3
TCB2-Cy11	IL:37-L:94	T37	L94	LCDR3

(IL 表示 IL-2, L 表示抗体轻链, H 表示抗体重链, IL 或 L/H 后的数字表示突变点所对应的氨基酸位点)

将表 33 和表 34 中的构建体按照实施例 2 中 2.1 所述方法构建、表达和纯化后通过 SEC-HPLC 分析,挑选能形成稳定单体的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白 NARA1-Cy01、NARA1-Cy04、NARA1-Cy05、NARA1-Cy08 和 NARA1-Cy09; 或 TCB2-Cy01、TCB2-Cy02、TCB2-Cy07、TCB2-Cy08、TCB2-Cy09 和 TCB2-Cy11 进行进一步的研究。

17.2 ELISA 法检测基于 NARA1 或 TCB2 抗体所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白与 hIL2R α (hCD25) 和 hIL2R β (hCD122) 的结合活性

按照实施例 2 中 2.1.1 所述 ELISA 检测方法,并将抗原分别替换为 hCD25 和 hCD122,分别检测基于 NARA1 或 TCB2 抗体所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白分别与 hCD25 和 hCD122 的结合活性,并设置 hIL2-DM-Fc 为对照组。

检测结果如图 24 和图 25 所示,基于 NARA1 或 TCB2 抗体构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白与对照组相比均表现出显著降低的 hCD25 结合活性(图 24A 和图 25A),而与 hCD122 的结合活性甚至表现出一定的增强(图 24B 和图 25B),表明基于 NARA1 或 TCB2 抗体构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白均能维持或增强 hIL-2 与 hCD122 的结合活性,且能在一定程度上抑制 hIL-2 与 hCD25 的结合,进一步表明在 hIL-2/NARA1 或 hIL-2/TCB2 抗原-抗体复合物的抗原-抗体结合部位中引入二硫键能够使 hIL-2 的 α 受体结合位点被包埋在抗体融合蛋白分子内部且不易因解离而被 hCD25 竞争性结合。

17.3 基于 NARA1 或 TCB2 抗体所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的生物学活性检测

按照实施例 1 中 1.3 所述方法,通过 CTLL-2 细胞和 NK-92 细胞增殖实验分别检测基于 NARA1

或 TCB2 抗体所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的生物学活性，对照组为野生型 hIL-2。

检测结果表明，hIL-2/NARA1 抗体融合蛋白（图 26A 和表 35）和 hIL-2/TCB2 抗体融合蛋白（图 27A 和表 36）促进高表达 CD25 的 CTLL-2 细胞的增殖活性（EC50 值）较对照组 hIL-2 相比表现出不同程度的降低，而促进 CD25 低表达的 NK-92 细胞增殖活性则与对照组 hIL-2 相当（图 26B 和表 35，图 27B 和表 36）。

表 35. CTLL-2 和 NK-92 细胞增殖实验检测基于 NARA1 抗体所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的生物学活性

样品	CTLL-2 细胞增殖活性（EC50, nM）	NK-92 细胞增殖活性（EC50, nM）
hIL-2	0.2101	0.03322
NARA1-Cy01	2.915	0.1279
NARA1-Cy04	7.464	0.1314
NARA1-Cy05	1.340	0.1383
NARA1-Cy08	21.31	0.1201
NARA1-Cy09	3.359	0.1463

表 36. CTLL-2 细胞株和 NK-92 细胞株增殖实验检测基于 TCB2 抗体所构建的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的生物学活性

样品	CTLL-2 细胞增殖活性（EC50, nM）	NK-92 细胞增殖活性（EC50, nM）
hIL-2	0.2101	0.03322
TCB2-Cy01	1.338	0.05139
TCB2-Cy02	10.73	0.08893
TCB2-Cy07	9.278	0.07600
TCB2-Cy08	13.06	0.05778
TCB2-Cy09	3.763	0.07453
TCB2-Cy11	3.766	0.09515

综上，通过在 hIL-2 与特异性识别 IL-2 的 IL2R α 结合位点的抗 IL-2 抗体（如 NARA1 或 TCB2）的结合界面中引入二硫键的方式不仅能够使 hIL-2 与抗 IL-2 抗体形成超稳定的复合物结构，抑制 hIL-2 与 IL2R α 结合，而且还不会影响 hIL-2 与 hIL2R $\beta\gamma$ 的结合。

尽管本申请已通过一个、或两个、或两个以上实施方案来描述，但是应当理解的是，本申请不限于这些实施方案，并且本申请说明书旨在涵盖落在所附权利要求的精神和宽范围内的所有替代、修改和变动。本申请所引用的所有参考文献均通过引用整体的方式并入本申请中。

权利要求书

1、一种人白细胞介素-2 (hIL-2) 变体, 其中, 所述 hIL-2 变体包含以下至少一个特性:

(1) 所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 包含至少一个氨基酸突变;

(2) 所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 获得了与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段结合的能力; 以及

(3) 所述氨基酸突变对 hIL-2 的生物学活性没有明显影响,

优选地, 所述 hIL-2 变体维持了野生型 hIL-2 的生物学活性; 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段能够与 IL2 受体 α 亚基 (IL2R α) 竞争性地结合所述 hIL-2 变体; 所述 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段结合后可以阻断所述 hIL-2 变体与 IL-2R α 的结合,

优选地, 所述 hIL-2 变体与 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 相比具有 90% 以上的氨基酸序列同一性, 更优选 93% 以上的氨基酸序列同一性,

优选地, 所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 包含一个、或两个、或两个以上氨基酸突变。

2、如权利要求 1 所述的 hIL-2 变体, 其中, 所述 hIL-2 变体的所述氨基酸突变位于所述 hIL-2 变体与抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的结合界面之内, 优选地, 所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列在第 64 位、第 90 位和/或第 104 位包含一种、两种或两种以上氨基酸突变。

3、如权利要求 1 或 2 所述的 hIL-2 变体, 其中, 相对于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列, 所述 hIL-2 变体包含如下的至少一种突变: (1) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 64 位氨基酸残基处的 K 突变为 G、S、T、C、Y、N 或 Q; (2) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 90 位氨基酸残基处的 N 突变为 R、K 或 H; 或 (3) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 104 位氨基酸残基处的 M 突变为 E 或 D。

4、如权利要求 1-3 中任一项所述的 hIL-2 变体, 其中, 所述的 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列包含以下一种、两种、或两种以上氨基酸突变:

(1) 相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 64 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 K64G,

(2) 相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 90 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 N90R, 和

(3) 相对于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 104 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 M104E;

优选地, 所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列具有氨基酸突变 K64G 和/或 N90R; 或优选地, 所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列具有氨基酸突变 K64G、N90R 和 M104E;

更优选地, 所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列具有氨基酸突变 K64G 和 N90R。

5、如权利要求 1-4 中任一项所述的 hIL-2 变体, 其中, 所述 hIL-2 变体的所述氨基酸突变位于所述 hIL-2 变体与抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的结合界面之外, 优选地, 所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的 N 端前三个或前五个氨基酸存在缺失, 或相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的 N 端第三个氨基酸残基具有氨基酸突变, 和/或相对于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 125 位氨基酸残基处具有氨基酸突变;

优选地, 所述 hIL-2 变体的所述氨基酸突变包含对 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的 N 端前三个进行缺失, 和/或相对于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 125 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 C125A、C125L、C125S、C125Q 或 C125V。

6、一种抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含以下至少一个特性:

(1) 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段能够与 IL2R α 竞争性结合权利要求 1-5 中任一项所述 hIL-2 变体并且竞争性地阻断权利要求 1-5 中任一项所述 hIL-2 变体与 IL2R α 或包含有 α 亚基的 IL-2 受体聚合体的结合;

(2) 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段与权利要求 1-5 中任一项所述 hIL-2 变体的结合亲和力 (K_D) 值 $< 5 \times 10^{-8}$ M, 优选地, $< 1 \times 10^{-8}$ M, $< 5 \times 10^{-9}$ M, 或 $< 1 \times 10^{-9}$ M, 或 $< 5 \times 10^{-10}$ M, 更优选

地, $<6 \times 10^{-10}$ M; 和/或

(3) 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段与权利要求 1-5 中任一项所述 hIL-2 变体的解离常数 (K_{dis}) $<5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、 $<5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或 $<3 \times 10^{-4} s^{-1}$ 。

7、如权利要求 6 所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 IL-2 抗体选自抗小鼠 IL-2 抗体及其人源化抗体, 进一步, 所述抗小鼠 IL-2 抗体选自特异性识别小鼠 IL-2 (mIL-2) 与小鼠 IL2R α (mIL2R α) 结合位点的抗 mIL-2 抗体, 所述抗 mIL-2 抗体能够与权利要求 1-5 中任一项所述的 hIL-2 变体发生交叉反应;

优选地, 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: (1) X1YYX2H (其中 X1=A 或 D; X2=L 或 M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列, (2) RIDPZ1DDSTKYAENFKX3 (其中 Z1=E 或 D; X3=N, S 或 G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列, (3) Z2TFZ3YZ4RELRFAY (其中 Z2=V, I, R 或 T; Z3=Y, L, H 或 W; Z4=S, T, A, R, N, D, Q, E, H, I, L, K, F, P, W, Y 或 V) 所示的 HCDR3 氨基酸序列, 优选地, Z2=V 或 I; Z3=Y 或 L; Z4=S 或 T, (4) QASQZ5IZ6NYLS (其中 Z5=D, Y, N, H, I, L 或 F; Z6=G, S, A, R, N, Q, I, L, T 或 D) 所示的 LCDR1 氨基酸序列, 优选地, Z5=D 或 Y; Z6=G 或 S, (5) Z7AZ8SLAX4 (其中, Z7=S, Q, R, T, W 或 Y; Z8=T 或 G; X4=D, S 或 T) 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 优选地, Z7=S 或 Q; Z8=T; X4=S, 和 (6) 氨基酸序列为 LQHYSTPYT (如 SEQ ID NO: 12 所示) 的 LCDR3 氨基酸序列。

8、如权利要求 6 或 7 所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含: 如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1; 如 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2; 如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 34 所示的 HCDR3; 以及

如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43 或 SEQ ID NO: 44 所示的 LCDR1; 如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 33 所示的 LCDR2; 如 SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR3。

9、如权利要求 6-8 中任一项所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3:

(1) SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列, 或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列; 或

(2) SEQ ID NO: 13 或 14 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列, 或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列; 或

(3) SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 15 或 16 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列, 或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列; 或

(4) SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 17 或 18 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列, 或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、

88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(5) SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列, 或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

10、如权利要求 6-9 中任一项所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: (1) X1YYX2H (其中 X1=A; X2=M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列, (2) RIDPZ1DDSTKYAENFKX3 (其中 Z1=E 或 D; X3=G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列, (3) Z2TFZ3YZ4RELRFAY (其中 Z2=V, I, R 或 T; Z3=Y, L, H 或 W; Z4=S, T, A, R, N, D, Q, E, H, I, L, K, F, P, W, Y 或 V) 所示的 HCDR3 氨基酸序列, 优选地, Z2=V 或 I; Z3=Y 或 L; Z4=S 或 T, (4) QASQZ5IZ6NYLS (其中 Z5=D, Y, N, H, I, L 或 F; Z6=G, S, A, R, N, Q, I, L, T 或 D) 所示的 LCDR1 氨基酸序列, 优选地, Z5=D 或 Y; Z6=G 或 S, (5) Z7AZ8SLAX4 (其中, Z7=S, Q, R, T, W 或 Y; Z8=T 或 G; X4=D, S 或 T) 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 优选地, Z7=S 或 Q; Z8=T; X4=S, 和 (6) 氨基酸序列为 LQHYSTPYT (SEQ ID NO: 12 所示) 的 LCDR3 氨基酸序列。

11、如权利要求 10 所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段, 其中, 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3:

(1) SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 26 或 27 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 17 或 28 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列, 或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(2) SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 20、21、22、23、24 或 25 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 26 或 27 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 17 或 28 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列, 或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(3) SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 9、20、23、24 或 25 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 26 或 27 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 17 或 28 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列, 或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；

或者优选地, 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3:

(1) SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 24 或 25 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 26 或 27 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 17 或 28 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列, 或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(2) SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 24 或 25 所示的 HCDR3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 26 或 27 所示的 LCDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO: 17 或 28 所示的 LCDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列, 或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%

相同的氨基酸序列；

更优选地，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：SEQ ID NO:14 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2 氨基酸序列，SEQ ID NO: 24 所示的 HCDR3 氨基酸序列，SEQ ID NO:26 所示的 LCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 氨基酸序列，和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

12、如权利要求 6-11 中任一项所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含：与 SEQ ID NO: 5、45、47、49、51、52、53、54、55、56、57、58、63、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、86 或 112 所示的序列具有至少 85%同一性的重链可变区 VH；以及

与 SEQ ID NO: 6、46、48、50、59、60、61、62、64、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、87、88、89、90、91、92、93、104、105、106、107、108、109、110 或 111 所示的序列具有至少 85%同一性的轻链可变区 VL。

13、如权利要求 6-12 中任一项所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区，和/或具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区：

(1) 分别与 SEQ ID NO: 45、47 或 49 所示的 VH 和/或 SEQ ID NO: 46、48 或 50 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列，

优选地，分别与 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 氨基酸序列和/或 SEQ ID NO: 48 或 50 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 54、55、56、57 或 58 所示的 VH 和/或 SEQ ID NO: 48 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(3) 分别与 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 氨基酸序列和/或 SEQ ID NO: 59、60 或 62 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(4) 分别与 SEQ ID NO: 63 所示的 VH 和/或 SEQ ID NO: 64 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；

或者，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区，和/或具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区：分别与 SEQ ID NOs: 63 和 65-75 任意一个所示的 VH 和/或 SEQ ID NOs: 76-79 任意一个所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；

或者，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区，和/或具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区：

(1) 分别与 SEQ ID NO:71 所示的 VH 和/或 SEQ ID NO: 76 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(2) 分别与 SEQ ID NO:72 所示的 VH 和/或 SEQ ID NO: 77 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(3) 分别与 SEQ ID NO:72 或 74 所示的 VH 和/或 SEQ ID NO: 76 或 79 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(4) 分别与 SEQ ID NO:74 或 75 所示的 VH 和/或 SEQ ID NO: 77 或 78 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

14、一种 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其包含：

- (1) 如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 或其变体,
- (2) 抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段, 以及
- (3) 所述 hIL-2 或其变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面包含的二硫键,

其中, 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段能够特异性地结合所述 hIL-2 或其变体并且竞争性地阻断所述 hIL-2 或其变体与 IL2R α 或包含有 α 亚基的 IL-2 受体聚合体 (即 IL2R α/β 或 IL2R $\alpha/\beta/\gamma$) 的结合, 以及

所述二硫键是通过在所述抗原-抗体结合界面的 hIL-2 或其变体的序列中引入的至少一个半胱氨酸残基与通过所述抗原-抗体结合界面的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的序列中引入的至少一个半胱氨酸残基所形成的,

所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白能够不与 IL2R 的 α 亚基、或 α/β 二聚体、或 $\alpha/\beta/\gamma$ 三聚体的结合, 但是保留了对 IL2R β 和 γ 受体亚基二聚体 (IL2R β/γ) 的结合以及功能活性。

15、如权利要求 14 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段与 hIL-2 变体的结合亲和力 (K_D) $< 5 \times 10^{-8}$ M, 优选地, $< 1 \times 10^{-8}$ M, $< 5 \times 10^{-9}$ M, 或 $< 1 \times 10^{-9}$ M, 或 $< 5 \times 10^{-10}$ M, 更优选地, $< 6 \times 10^{-10}$ M; 和/或所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段与 hIL-2 变体的解离常数 (K_{dis}) $< 5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、 $< 5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或 $< 3 \times 10^{-4} s^{-1}$ 。

16、如权利要求 14 或 15 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2 或其变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面包含了 hIL-2 或其变体与 IL2R α 的结合界面, 或所述的抗原-抗体结合界面与 hIL-2 或其变体与 IL2R α 的结合界面存在部分重叠;

或者, 所述 hIL-2 或其变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面位于所述 hIL-2 或其变体的 AB 环、B 螺旋、C 螺旋、BC 环和/或 CD 环, 优选位于所述 hIL-2 或其变体的 AB 环、B 螺旋、C 螺旋和 CD 环; 所述的 hIL-2 或其变体的 IL2R α 结合界面位于 hIL-2 或其变体的 AB 环和 B 螺旋;

或者, 所述 hIL-2 或其变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面位于所述 hIL-2 或其变体的第 30-45 位或其邻近的氨基酸残基, 第 57-77 位或其邻近的氨基酸残基, 和/或第 90-111 位或其邻近的氨基酸残基。

17、如权利要求 14-16 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2 变体的氨基酸突变位点位于所述 hIL-2 变体与抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的结合界面之内, 优选地, 所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列在第 64 位、第 90 位和/或第 104 位包含一种、两种或两种以上氨基酸突变。

18、如权利要求 14-17 中任一项所述的 hIL-2 变体, 其中, 相对于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列, 所述 hIL-2 变体包含如下的至少一种突变: (1) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 64 位氨基酸残基处的 K 突变为 G、S、T、C、Y、N 或 Q; (2) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 90 位氨基酸残基处的 N 突变为 R、K 或 H; 或 (3) 在对应于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第 104 位氨基酸残基处的 M 突变为 E 或 D。

19、如权利要求 14-18 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述的 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列包含以下一种、两种或两种以上氨基酸突变:

(1) 相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 64 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 K64G,

(2) 相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 90 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 N90R, 和

(3) 相对于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 104 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 M104E;

优选地, 所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列具有氨基酸突变 K64G 和/或 N90R; 或优选地, 所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列具有氨基酸突变 K64G、N90R 和 M104E (如 SEQ ID NO: 3 所示);

更优选地, 所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列具有氨基酸突变 K64G 和 N90R (如 SEQ ID NO: 2 所示)。

20、如权利要求 14-19 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段选自抗小鼠 IL-2 抗体及其人源化抗体, 进一步, 所述抗小鼠 IL-2 抗体选自特异性识别小鼠 IL-2 (mIL-2) 与小鼠 IL2R α (mIL2R α) 结合位点的抗 mIL-2 抗体, 所述抗 mIL-2 抗体能够与

所述的 hIL-2 变体发生交叉反应；所述抗 IL-2 抗体也可以是其它能够特异性识别 hIL-2 上 IL2R α 结合位点的抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段，优选的其它抗 IL-2 人源化抗体选自 NARA1 和 TCB2；

优选地，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：(1) X1YYX2H (其中 X1=A 或 D；X2=L 或 M) 所示的 HCDR1 氨基酸序列，(2) RIDPZ1DDSTKYAENFKX3 (其中 Z1=E 或 D；X3=N, S 或 G) 所示的 HCDR2 氨基酸序列，(3) Z2TFZ3YZ4RELRFAY (其中 Z2=V, I, R 或 T；Z3=Y, L, H 或 W；Z4=S, T, A, R, N, D, Q, E, H, I, L, K, F, P, W, Y 或 V) 所示的 HCDR3 氨基酸序列，优选地，Z2=V 或 I；Z3=Y 或 L；Z4=S 或 T，(4) QASQZ5IZ6NYLS (其中 Z5=D, Y, N, H, I, L 或 F；Z6=G, S, A, R, N, Q, I, L, T 或 D) 所示的 LCDR1 氨基酸序列，优选地，Z5=D 或 Y；Z6=G 或 S，(5) Z7AZ8SLAX4 (其中，Z7=S, Q, R, T, W 或 Y；Z8=T 或 G；X4=D, S 或 T) 所示的 LCDR2 氨基酸序列，优选地，Z7=S 或 Q；Z8=T；X4=S，和 (6) 氨基酸序列为 LQHYSTPYT (SEQ ID NO: 12 所示) 的 LCDR3 氨基酸序列。

21、如权利要求 14-20 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1；如 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2；如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 34 所示的 HCDR3；以及

如 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36 或 SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43 或 SEQ ID NO: 44 所示的 LCDR1；如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 33 所示的 LCDR2；如 SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR3。

22、如权利要求 20 或 21 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：

(1) SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2 氨基酸序列，SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列，SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 氨基酸序列，和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(2) SEQ ID NO: 13 或 14 所示的 HCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2 氨基酸序列，SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列，SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 氨基酸序列，和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(3) SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 15 或 16 所示的 HCDR2 氨基酸序列，SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列，SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 氨基酸序列，SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(4) SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2 氨基酸序列，SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列，SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 17 或 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR2 氨基酸序列，和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(5) SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 氨基酸序列，SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列，SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 氨基酸序列，和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列，或分别

与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；

优选地，所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：SEQ ID NO:14 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列、SEQ ID NO:10 所示的 LCDR1 氨基酸酸序列、SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 氨基酸序列，和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

23、如权利要求 20-22 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：

(1) X1YYX2H（其中 X1=A；X2=M）所示的 HCDR1 氨基酸序列，
(2) RIDPZ1DDSTKYAENFKX3（其中 Z1=E 或 D；X3=G）所示的 HCDR2 氨基酸序列，(3) Z2TFZ3YZ4RELRFAY（其中 Z2=V, I, R 或 T；Z3=Y, L, H 或 W；Z4=S, T, A, R, N, D, Q, E, H, I, L, K, F, P, W, Y 或 V）所示的 HCDR3 氨基酸序列，优选地，Z2=V 或 I；Z3=Y 或 L；Z4=S 或 T，
(4) QASQZ5IZ6NYLS（其中 Z5=D, Y, N, H, I, L 或 F；Z6=G, S, A, R, N, Q, I, L, T 或 D）所示的 LCDR1 氨基酸序列，优选地，Z5=D 或 Y；Z6=G 或 S，(5) Z7AZ8SLAX4（其中，Z7=S, Q, R, T, W 或 Y；Z8=T 或 G；X4=D, S 或 T）所示的 LCDR2 氨基酸序列，优选地，Z7=S 或 Q；Z8=T；X4=S，和 (6) LQHYSTPYT 所示的 LCDR3 氨基酸序列；

优选地，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：

(1) SEQ ID NO:14 所示的 HCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 氨基酸序列，SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列，SEQ ID NO:26 或 27 所示的 LCDR1 氨基酸酸序列，SEQ ID NO: 17 或 28 所示的 LCDR2 氨基酸序列，和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(2) SEQ ID NO:14 所示的 HCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 氨基酸序列，SEQ ID NO: 20、21、22、23、24 或 25 所示的 HCDR3 氨基酸序列，SEQ ID NO:26 或 27 所示的 LCDR1 氨基酸酸序列，SEQ ID NO: 17 或 28 所示的 LCDR2 氨基酸序列，和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(3) SEQ ID NO:14 所示的 HCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2 氨基酸序列，SEQ ID NO: 9、20、23、24 或 25 所示的 HCDR3 氨基酸序列，SEQ ID NO:26 或 27 所示的 LCDR1 氨基酸酸序列，SEQ ID NO: 17 或 28 所示的 LCDR2 氨基酸序列，和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；

或者，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：

(1) SEQ ID NO:14 所示的 HCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 氨基酸序列，SEQ ID NO: 24 或 25 所示的 HCDR3 氨基酸序列，SEQ ID NO: 26 或 27 所示的 LCDR1 氨基酸酸序列，SEQ ID NO: 17 或 28 所示的 LCDR2 氨基酸序列，和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(2) SEQ ID NO:14 所示的 HCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2 氨基酸序列，SEQ ID NO: 24 或 25 所示的 HCDR3 氨基酸序列，SEQ ID NO: 26 或 27 所示的 LCDR1 氨基酸酸序列，SEQ ID NO: 17 或 28 所示的 LCDR2 氨基酸序列，和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸，或分别与所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、

86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；

优选地，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：SEQ ID NO:14 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2 氨基酸序列，SEQ ID NO: 24 所示的 HCDR3 氨基酸序列，SEQ ID NO:26 所示的 LCDR1 氨基酸序列，SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 氨基酸序列，和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸，或分别与上述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

24、如权利要求 14-23 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含：与 SEQ ID NO: 5、45、47、49、51、52、53、54、55、56、57、58、63、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、86 或 112 所示的序列具有至少 85%同一性的重链可变区 VH；以及

与 SEQ ID NO: 6、46、48、50、59、60、61、62、64、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、87、88、89、90、91、92、93、104、105、106、107、108、109、110 或 111 所示的序列具有至少 85%同一性的轻链可变区 VL。

25、如权利要求 14-24 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区，和具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区：

(1) 分别与 SEQ ID NO: 45、47 或 49 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 46、48 或 50 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列，

优选地，分别与 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 48 或 50 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 54、55、56、57 或 58 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 48 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(3) 分别与 SEQ ID NO: 49 所示的 VH 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 59、60 或 62 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(4) 分别与 SEQ ID NO: 63 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 64 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；

或者，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区，和具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区：分别与 SEQ ID NOs: 63 和 65-75 任意一个所示的 VH 和 SEQ ID NOs: 76-79 任意一个所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；

或者，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区，和具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区：

(1) 分别与 SEQ ID NO:71 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 76 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(2) 分别与 SEQ ID NO:72 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 77 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(3) 分别与 SEQ ID NO:72 或 74 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 76 或 79 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(4) 分别与 SEQ ID NO:74 或 75 所示的 VH 和 SEQ ID NO: 77 或 78 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

26、如权利要求 14-25 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的 hIL-2 变体与抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面包含二硫键，所述抗原-抗体结合界面与所述 hIL-2 变体与 IL2R α 的结合界面存在重叠，进一步，所述 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面位于所述 hIL-2 变体的 AB 环、B 螺旋、C 螺旋和 CD 环，优选位于所述 hIL-2 变体的第 41-45 位或其邻近的氨基酸残基、第 57-68 位或其邻近的氨基酸残基以及第 90-107 位或其邻近的氨基酸残基；所述二硫键是通过在所述抗原-抗体结合界面的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的序列中引入的至少一个半胱氨酸残基与通过在所述抗原-抗体结合界面的 hIL-2 变体的序列中引入的至少一个半胱氨酸残基所形成；

优选地，所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面包含两个或两个以上半胱氨酸残基以形成所述二硫键。

27、如权利要求 26 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列在第 42 位、第 60 位、第 61 位、第 64 位、第 65 位、第 102 位和第 104 位氨基酸残基处具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，以引入第一个半胱氨酸残基。

28、如权利要求 26 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包括：(1) 氨基酸序列为 X1YYX2H (X1=A; X2= M) 的 HCDR1，(2) 氨基酸序列为 RIDPZIDDSTKYAENFKX3 (Z1=E 或 D; X3=G) 的 HCDR2，(3) 氨基酸序列为 Z2TFZ3YZ4RELRFWFAY (Z2=V 或 I; Z3=Y 或 L; Z4=S 或 T) 的 HCDR3，(4) 氨基酸序列为 QASQZ5IZ6NYLS (Z5=D 或 Y; Z6=G 或 S) 的 LCDR1，(5) 氨基酸序列为 Z7AZ8SLAX4 (Z7=S 或 Q; Z8=T; X4=S) 的 LCDR2，和 (6) 氨基酸序列为 LQHYSTPYT (SEQ ID NO: 12 所示) 的 LCDR3，并且所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段在 HCDR3 的第 3 位氨基酸残基处、LCDR1 的第 7 位、第 8 位和/或第 9 位氨基酸残基处、LCDR2 的第 1 位、第 3 位氨基酸残基处、或 LCDR3 第 4 位氨基酸残基处具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，以引入第二个半胱氨酸残基。

29、如权利要求 26 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含如下的具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和/或具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区：

(1) 分别与 SEQ ID NO:63 所示的 VH 和/或 SEQ ID NO: 64 所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列，或

(2) 分别与 SEQ ID NOs: 63 和 65-75 任意一个所示的 VH 和/或 SEQ ID NOs: 76-79 任意一个所示的 VL 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列，

并且所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段在其轻链可变区的框架区具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，以引入第二个半胱氨酸残基，所述氨基酸突变位于所述轻链可变区的第 67 和/或 68 位氨基酸残基处。

30、如权利要求 26-29 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，在所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的抗原-抗体结合界面的 hIL-2 变体通过氨基酸突变的方式引入第一半胱氨酸残基，在所述抗原-抗体结合界面的抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过氨基酸突变的方式引入第二半胱氨酸残基，优选的氨基酸突变是氨基酸取代、插入或添加，且在所述 hIL-2 变体引入第一半胱氨酸残基所在的位点和在所述抗 IL-2 人源化抗体或抗原结合片段引入第二半胱氨酸残基所在的位点能够正确配对，所述正确配对的位点位于所述 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面，并且配对氨基酸残基之间的空间距离小于 10 埃，优选地，所述空间距离小于 5 埃。

31、如权利要求 26-30 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，在所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的 hIL-2 变体与抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面形成二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的配对选自以下一个、或两个、或两个以上配对氨基酸突变的组合：

(1) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 42 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 F42C，或第 64 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 K64C，或第 65 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 P65C，和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在氨基酸序列为 Z2TFZ3YZ4RELRFWFAY (Z2=V 或 I; Z3=Y 或 L; Z4=S 或 T) 的 HCDR3 第 3 位上引入氨基酸突变 F3C 所获得；和/或

(2) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2

的氨基酸序列的第 60 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 E60C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其 LCDR1 第 7 位上引入氨基酸突变 G7C 或 S7C 所获得; 和/或

(3) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 61 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 E61C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其氨基酸序列为 QASQZ5IZ6NYLS (Z5=D 或 Y; Z6=G 或 S) 的 LCDR1 第 7 位上引入氨基酸突变 G7C 或 S7C 所获得, 或

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其氨基酸序列为 QASQZ5IZ6NYLS (Z5=D 或 Y; Z6=G 或 S) 的 LCDR1 第 8 位上引入氨基酸突变 N8C 所获得, 或

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其氨基酸序列为 Z7AZ8SLAX4 (Z7=S 或 Q; Z8=T; X4=S) 的 LCDR2 第 1 位上引入氨基酸突变 S1C 或 Q1C 获得; 和/或

(4) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 104 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 M104C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其氨基酸序列为 Z7AZ8SLAX4 (Z7=S 或 Q; Z8=T; X4=S) 的 LCDR2 第 3 位上引入氨基酸突变 T3C 所获得; 和/或

(5) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 102 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T102C, 所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其轻链可变区第 67 位上引入氨基酸突变 S67C 所获得, 或

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其轻链可变区第 68 位上引入氨基酸突变 G68C 所获得; 和/或

(6) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 64 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 K64C, 和

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其氨基酸序列为 QASQZ5IZ6NYLS (Z5=D 或 Y; Z6=G 或 S) 的 LCDR1 第 9 位上引入氨基酸突变 Y9C 所获得, 或

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其氨基酸序列为 LQHYSTPYT (SEQ ID NO: 12) 的 LCDR3 第 4 位上引入氨基酸突变 Y4C 所获得;

或者, 在所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的 hIL-2 变体与抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面形成二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的配对选自以下一个、或两个、或两个以上配对氨基酸突变的组合:

(1) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 104 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 M104C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其 LCDR2 第 3 位上引入氨基酸突变 T3C 所获得, 所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 24 所示的 HCDR3 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 26 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列; 和/或

(2) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 102 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T102C, 所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其轻链可变区第 67 位上引入氨基酸突变 S67C 所获得, 所述抗 IL-2 人源化抗体或其结合片段包含与 SEQ ID NO: 77 所示的 VL 具有 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列, 或

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其轻链可变区第 68 位上引入氨基酸突变 G68C 所获得, 所述抗 IL-2 人源化抗体或其结合片段包含与 SEQ ID NO: 77 所示的 VL 具有 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列; 和/或

(3) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 42 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 F42C, 或第 64 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 K64C, 或第 65 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 P65C, 和所述第二半胱氨酸

残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在氨基酸序列为 Z2TFZ3YZ4RELRFAY (Z2=V 或 I; Z3=Y 或 L; Z4=S 或 T) 的 HCDR3 第 3 位上引入氨基酸突变 F3C 所获得, 所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列。

32、如权利要求 14-20 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 在所述野生型 hIL-2 与所述其它特异性识别 hIL-2 的 IL2R α 结合位点的抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段形成的抗原-抗体复合物的结合界面引入二硫键, 所述抗原-抗体复合物选自 hIL-2:NARA1 抗原-抗体复合物和 hIL-2:TCB2 抗原-抗体复合物,

其中, 所述 NARA1 或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 142 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 143 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 144 所示的 HCDR3 氨基酸序列, 以及 SEQ ID NO: 145 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2 氨基酸序列、和 SEQ ID NO: 147 所示的 LCDR3 氨基酸序列;

TCB2 或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 170 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 171 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 172 所示的 HCDR3 氨基酸序列, 以及 SEQ ID NO: 173 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 174 所示的 LCDR2 氨基酸序列、和 SEQ ID NO: 175 所示的 LCDR3 氨基酸序列。

33、如权利要求 32 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2:NARA1 抗原-抗体复合物的结合界面包含了 hIL-2 与 IL2R α 的结合界面, 所述的 hIL-2:NARA1 抗原-抗体复合物的结合界面位于所述 hIL-2 的 AB 环、B 螺旋和 BC 环, 进一步, 所述 hIL-2:NARA1 抗原-抗体复合物的结合界面位于所述 hIL-2 的第 30-43 位或其邻近的氨基酸残基和第 71-77 位或其邻近的氨基酸残基。

34、如权利要求 32 或 33 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2:NARA1 抗原-抗体复合物的结合界面包含两个或两个以上半胱氨酸残基以形成所述二硫键, 其中, 所述 hIL-2 相对于 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列在第 34 位、第 37 位、第 41 位、第 42 位、第 68 位、第 73 位、第 75 位、第 77 位和第 111 位氨基酸残基处具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变, 以引入第一个半胱氨酸残基; 在 NARA1 抗体或其抗原结合片段的 CDR 区中特定氨基酸残基处具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变, 以引入第二个半胱氨酸残基, 所述氨基酸突变包括位于 NARA1 或其抗原结合片段的 HCDR1 第 1 位, 和/或位于 HCDR2 第 2 位、第 6 位和/或第 8 位, 和/或位于 HCDR3 第 3 位和/或第 8 位, 和/或位于 LCDR1 第 9 位, 和/或位于 LCDR3 第 3 位、第 4 位和/或第 6 位氨基酸残基的突变。

35、如权利要求 32-34 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 在所述 hIL-2:NARA1 抗原-抗体复合物的结合界面或相邻位置形成二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的配对选自以下一个、或两个、或两个以上配对氨基酸突变的组合:

(1) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 34 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 P34C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 8 位上引入氨基酸突变 A8C 所获得, 或

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在 LCDR3 第 3 位或第 4 位分别引入氨基酸突变 S3C 或 N4C 所获得; 和/或

(2) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 37 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T37C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 6 位上引入氨基酸突变 D6C 所获得; 和/或

(3) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 41 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T41C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 HCDR2 第 2 位上引入氨基酸突变 I2C 所获得; 和/或

(4) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 42 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 F42C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 HCDR2 第 8 位上引入氨基酸突变 G8C 所获得; 和/或

(5) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 68 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 E68C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 或其抗原结合片段通过在其 HCDR1 第 1 位上引入氨基酸突变 N1C 所获得; 和/或

(6) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 73 位氨基酸残基处具有的氨基酸

突变 A73C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 3 位上引入氨基酸突变 G3C 所获得; 和/或

(7) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 75 位或第 77 位氨基酸残基处分别具有的氨基酸突变 S75C 或 N77C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 或其抗原结合片段通过在其 LCDR1 第 9 位上引入氨基酸突变 D9C 所获得; 和/或

(8) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 111 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T111C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 HCDR2 第 6 位上引入氨基酸突变 S6C 所获得;

优选地, 在所述 hIL-2 : NARA1 抗原-抗体复合物的结合界面形成二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的配对选自以下一个、或两个、或两个以上配对氨基酸突变的组合:

(1) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 37 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T37C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 6 位上引入氨基酸突变 D6C 所获得; 或

(2) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 68 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 E68C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 HCDR1 第 1 位上引入氨基酸突变 N1C 所获得; 或

(3) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 75 位或第 77 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 S75C 或 N77C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 LCDR1 第 9 位上引入氨基酸突变 D9C 所获得; 和/或

(4) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 111 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T111C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 NARA1 抗体或其抗原结合片段通过在其 HCDR2 第 6 位上引入氨基酸突变 S6C 所获得。

36、如权利要求 32 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2 : TCB2 抗原-抗体复合物的结合界面包含了 hIL-2 与 IL2R α 的结合界面, 所述的 hIL-2 : TCB2 抗原-抗体复合物的结合界面位于所述 hIL-2 的 AB 环、B 螺旋和 CD 环, 进一步, 所述 hIL-2 : TCB2 抗原-抗体复合物的结合界面位于所述 hIL-2 的第 34-45 位或其邻近的氨基酸残基、第 62-76 位或其邻近的氨基酸残基和第 111 位或其邻近的氨基酸残基。

37、如权利要求 32 或 36 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2 : TCB2 抗原-抗体复合物的结合界面包含两个或两个以上半胱氨酸残基以形成所述二硫键, 其中, 所述 hIL-2 相对于 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列在第 34 位、第 36 位、第 37 位、第 38 位、第 42 位、第 68 位和第 109 位氨基酸残基处具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变, 以引入第一个半胱氨酸残基, 在 TCB2 抗体或其抗原结合片段的 CDR 区中特定氨基酸残基处具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变, 以引入第二个半胱氨酸残基, 所述氨基酸突变包括位于 TCB2 或其抗原结合片段的 HCDR2 第 6 位, 和/或位于 HCDR3 第 3 位、第 5 位、第 6 位、和/或第 7 位, 和/或位于 LCDR1 第 4 位, 位于 LCDR3 第 4 位、第 5 位、和/或第 6 位氨基酸残基的突变。

38、如权利要求 32、36 和 37 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 在所述 hIL-2 : TCB2 抗原-抗体复合物的结合界面形成二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的配对选自以下一个、或两个、或两个以上配对氨基酸突变的组合:

(1) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 34 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 P34C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 LCDR1 第 4 位上引入氨基酸突变 T4C 所获得, 或

所述第二半胱氨酸是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 4 位或第 5 位上分别引入氨基酸突变 D4C 或 N5C 所获得; 和/或

(2) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 36 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 L36C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 5 位上引入氨基酸突变 N5C 所获得; 和/或

(3) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 37 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T37C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 5 位或第 6 位上分别引入氨基酸突变 N5C 或 L6C 所获得; 和/或

(4) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 38 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 R38C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 7 位上引入氨基酸突变 F7C 所获得; 和/或

(5) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 42 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 F42C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 5 位上引入氨基酸突变 R5C 所获得; 和/或

(6) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 68 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 E68C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 3 位或第 6 位上分别引入氨基酸突变 A3C 或 G6C 所获得; 和/或

(7) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 109 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 D109C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 HCDR2 第 6 位上引入氨基酸突变 D6C 所获得;

优选地, 在所述 hIL-2:TCB2 抗原-抗体复合物的结合界面形成二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的配对选自以下一个、或两个、或两个以上配对氨基酸突变的组合:

(1) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 34 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 P34C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 4 位或第 5 位上分别引入氨基酸突变 D4C 或 N5C 所获得; 或

(2) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 36 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 L36C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 5 位上引入氨基酸突变 N5C 所获得; 或

(3) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 37 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T37C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 LCDR3 第 6 位上分别引入氨基酸突变 L6C 所获得; 或

(4) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 42 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 F42C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 5 位上引入氨基酸突变 R5C 所获得; 和/或

(5) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 的氨基酸序列的第 68 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 E68C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述 TCB2 或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 3 位上分别引入氨基酸突变 A3C 所获得。

39、如权利要求 14-31 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 所述的 HCDR3、LCDR1、LCDR2 和/或 LCDR3 包含一个、或两个、或两个以上半胱氨酸残基突变, 所述重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包括: (1) 氨基酸序列为 X1YYX2H (X1=A; X2= M, 如 SEQ ID NO: 14 所示) 的 HCDR1, (2) 氨基酸序列为 RIDPZ1DDSTKYAENFKX3 (Z1=E 或 D; X3= G) 的 HCDR2, (3) 氨基酸序列为 Z2TX_{II}Z3YZ4RELRFAY (Z2=V 或 I; X_{II}=F 或 C; Z3=Y 或 L; Z4=S 或 T) 的 HCDR3, (4) 氨基酸序列为 QASQZ5IZ6X_IX_{IV}LS (Z5=D 或 Y; Z6=G, S 或 C; X_I=N 或 C; X_{IV}=Y 或 C) 的 LCDR1, (5) 氨基酸序列为 Z7AZ8SLAX4 (Z7=S, Q 或 C; Z8=T 或 C; X4=S) 的 LCDR2, 和 (6) 氨基酸序列为 LQHX_{III}STPYT (X_{III}=Y 或 C) 的 LCDR3。

40、如权利要求 39 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 所述的 HCDR3、LCDR1、LCDR2 和/或 LCDR3 包含一个、或两个、或两个以上半胱氨酸残基突变, 所述重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包括:

(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 或 31 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3; 和/或

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17、32 或 33 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3; 和/或

(3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3; 和/或

(4) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 35 或 36 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3; 和/或

(5) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17、32 或 33 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3; 和/或

(6) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3; 和/或

(7) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 38 所示的 LCDR3; 和/或

(8) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3,

优选地, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含如下的重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3:

(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3; 和/或

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 或 33 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3。

41、如权利要求 14-31、39 或 40 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白在所述 IL-2 抗体的轻链可变区第一位或 LCDR1 第 4 位还可以具有氨基酸突变, 所述氨基酸突变包括 D1E、Q4D、Q4E、Q4S、Q4G、Q4K 或 Q4R, 优选地, 所述氨基酸突变包括 D1E、Q4D、Q4E、Q4S 或 Q4G。

42、如权利要求 14-20、32-35 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 所述的 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、和/或 LCDR3 包含一个、或两个、或两个以上半胱氨酸残基突变, 所述重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包括: (1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 142 或 148 所示的 HCDR1, (2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 143、149、150 或 151 所示的 HCDR2, (3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144、152 或 153 所示的 HCDR3,

(4) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 145 或 154 所示的 LCDR1, (5) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2, (6) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 147、155、156 或 157 所示的 LCDR3,

进一步, 所述重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包括:

(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 149 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 145 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 147 所示的 LCDR3; 和/或

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 143 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 152 或 153 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 145 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 147 所示的 LCDR3; 和/或

(3) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 143 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 154 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 147 所示的 LCDR3; 和/或

(4) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 142 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 143 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 145 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 146 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 155、156 或 157 所示的 LCDR3; 和/或

(5) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 148 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 143 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 144 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 145 所示的

LCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 146所示的LCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 147所示的LCDR3;和/或

(6) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 142所示的HCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 150或151所示的HCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 144所示的HCDR3,氨基酸序列如SEQ ID NO: 145所示的LCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 146所示的LCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 147所示的LCDR3;

优选地,所述的hIL-2/IL-2抗体融合蛋白包含如下的所述重链可变区的HCDR1、HCDR2、HCDR3和轻链可变区的LCDR1、LCDR2、LCDR3:

(1) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 142所示的HCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 149所示的HCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 144所示的HCDR3,氨基酸序列如SEQ ID NO: 145所示的LCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 146所示的LCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 147所示的LCDR3;和/或

(2) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 142所示的HCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 143所示的HCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 144所示的HCDR3,氨基酸序列如SEQ ID NO: 154所示的LCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 146所示的LCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 147所示的LCDR3;和/或

(3) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 142所示的HCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 143所示的HCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 144所示的HCDR3,氨基酸序列如SEQ ID NO: 145所示的LCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 146所示的LCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 157所示的LCDR3;和/或

(4) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 148所示的HCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 143所示的HCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 144所示的HCDR3,氨基酸序列如SEQ ID NO: 145所示的LCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 146所示的LCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 147所示的LCDR3。

43、如权利要求14-20、32、36-38中任一一项所述的hIL-2/IL-2抗体融合蛋白,其中,所述hIL-2/IL-2抗体融合蛋白包含重链可变区的HCDR1、HCDR2、HCDR3和轻链可变区的LCDR1、LCDR2、LCDR3,所述的HCDR2、HCDR3、LCDR1、和/或LCDR3包含一个、或两个、或两个以上半胱氨酸残基突变,所述重链可变区的HCDR1、HCDR2、HCDR3和轻链可变区的LCDR1、LCDR2、LCDR3包括:

(1) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 170所示的HCDR1,(2) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 171或176所示的HCDR2,(3) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 172、177、178、179或180所示的HCDR3,(4) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 173或181所示的LCDR1,(5) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 174所示的LCDR2,(6) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 175、182、183或184所示的LCDR3,

进一步,所述重链可变区的HCDR1、HCDR2、HCDR3和轻链可变区的LCDR1、LCDR2、LCDR3包括:

(1) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 170所示的HCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 171所示的HCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 177、178、179或180所示的HCDR3,氨基酸序列如SEQ ID NO: 173所示的LCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 174所示的LCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 175所示的LCDR3;和/或

(2) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 170所示的HCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 176所示的HCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 172所示的HCDR3,氨基酸序列如SEQ ID NO: 173所示的LCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 174所示的LCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 175所示的LCDR3;和/或

(3) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 170所示的HCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 171所示的HCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 172所示的HCDR3,氨基酸序列如SEQ ID NO: 181所示的LCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 174所示的LCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 175所示的LCDR3;和/或

(4) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 170所示的HCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 171所示的HCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 172所示的HCDR3,氨基酸序列如SEQ ID NO: 173所示的LCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 174所示的LCDR2,氨基酸序列如SEQ ID NO: 182、183或184所示的LCDR3;

优选地,所述的hIL-2/IL-2抗体融合蛋白包含如下的所述重链可变区的HCDR1、HCDR2、HCDR3和轻链可变区的LCDR1、LCDR2、LCDR3:

(1) 氨基酸序列如SEQ ID NO: 170所示的HCDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO: 171所示

的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 177 或 178 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 173 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 174 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 175 所示的 LCDR3; 和/或

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 170 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 171 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 172 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 173 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 174 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 182、183 或 184 所示的 LCDR3。

44、如权利要求 14-31、39、40 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和/或具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区, 所述重链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 63、86、74 或 112 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列, 和/或轻链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 64、77、80、81、82、83、84、85、87、88、89、90、91、92、93、104、105、106、107、108、109、110 或 111 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列,

优选地, 所述重链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 86 或 74 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列, 和/或轻链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 64、87、88、89、90、91、107、108 或 109 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列;

或者, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区和轻链可变区包括:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 86 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 64、87、88、89、90 或 91 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列; 或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 74 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 107、108 或 109 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

45、如权利要求 14-20、32-35 和 42 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和/或具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区, 所述重链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 140、158、159、160、161、162 或 163 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列, 和/或轻链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 141、164、165、166 或 167 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列,

进一步, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区和轻链可变区包括:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 158、159、160、161、162 或 163 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 141 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列; 或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 140 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 164、165、166 或 167 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列;

优选地, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含如下的重链可变区和轻链可变区:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 158 或 161 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 141 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列; 或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 140 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 164 或 167 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

46、如权利要求 14-20、32、36-38 和 43 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区和/或具有所述

LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区, 所述重链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 168、185、186、187、188 或 189 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列, 和/或轻链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 169、190、191、192 或 193 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列,

进一步, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含如下的重链可变区和轻链可变区:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 185、186、187、188 或 189 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 169 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列; 或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 168 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 190、191、192 或 193 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列;

优选地, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含如下的重链可变区和轻链可变区:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 185 或 186 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 169 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列;

(2) 分别与 SEQ ID NO: 168 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 191、192 或 193 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

47、如权利要求 14-46 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述抗 IL-2 抗体或其抗原片段与 hIL-2 或其变体可以通过连接子连接, 所述连接子选自包括(G4S)4、(G4S)3、(GAF)2, 优选地, 所述的连接子为(G4S)4。

48、如权利要求 14-47 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2 或其变体进一步包含一种、或两种或其以上氨基酸突变:

相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的 N 端前三个或前五个氨基酸存在缺失; 或

相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的 N 端第三个氨基酸残基具有氨基酸突变; 和/或

相对于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的第氨基酸序列的 125 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 C125A、C125L、C125S、C125Q 或 C125V,

优选地, 所述的 hIL-2 或其变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的 N 端前三个氨基酸存在缺失, 以及相对于如 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列在第 125 位氨基酸残基处具有氨基酸突变 C125A、C125L、C125S、C125Q 或 C125V。

49、如权利要求 14-48 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含第一多肽, 所述第一多肽与 SEQ ID NO: 95、96、97、98、99、100、101、102、103、113、114、115、116、117、118、119、120、133、134、135、136、137、138、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225 或 226 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

50、如权利要求 14-49 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含第一多肽和第二多肽, 所述第一多肽包含具有半胱氨酸残基突变的 hIL-2 或其变体可操作地连接至来源于所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的一个可变区, 第二多肽包含所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的另一个可变区;

进一步, 所述第一多肽包含具有半胱氨酸残基突变的 hIL-2 或其变体、连接子和所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的一个可变区, 可以选择在所述第一多肽中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的一个可变区和/或第二多肽中的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的另一个可变区进行半胱氨酸残基突变, 由此可与具有半胱氨酸残基突变的 hIL-2 或其变体形成正确配对且稳定的二硫键, 且所述二硫键位于所述 hIL-2 或其变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面。

51、如权利要求 49 或 50 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述的第一多肽包含具有半胱氨酸残基突变的 hIL-2 变体、连接子和抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的轻链可变区, 第二多

肽包含所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的轻链可变区, 其中, 所述第一多肽包含与 SEQ ID NO: 95-103、113-120、或 133-138 任意一个所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列, 和/或所述第二多肽包含与 SEQ ID NO: 64、77、80-85、87-93、或 104-111 任意一个所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

52、如权利要求 51 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含如下的第一多肽和第二多肽:

(1) 分别与 SEQ ID NO: 95 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 80 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 96 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 81 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(3) 分别与 SEQ ID NO: 97 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 82 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(4) 分别与 SEQ ID NO: 98 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 83 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(5) 分别与 SEQ ID NO: 99 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 84 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(6) 分别与 SEQ ID NO: 100 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 85 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(7) 分别与 SEQ ID NO: 101、102、103、133-138 任意一个所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 64 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(8) 分别与 SEQ ID NO: 102 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 87-93 任意一个所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(9) 分别与 SEQ ID NO: 113 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 104、105 或 106 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(10) 分别与 SEQ ID NO: 114 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 107 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(11) 分别与 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 108 或 109 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(12) 分别与 SEQ ID NO: 116、117 或 119 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 77 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(13) 分别与 SEQ ID NO: 118 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 110 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(14) 分别与 SEQ ID NO: 120 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 104 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列; 或

(15) 分别与 SEQ ID NO: 118 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 111 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列;

优选地，所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含如下的第一多肽和第二多肽：

(1) 分别与 SEQ ID NO: 101、102、103、133-138 任意一个所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 64 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 102 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 87-91 任意一个所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(3) 分别与 SEQ ID NO: 114 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 107 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(4) 分别与 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 108 或 109 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

53、如权利要求 49 或 50 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述的第一多肽包含具有半胱氨酸残基突变的 hIL-2 变体、连接子和抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的轻链可变区，第二多肽包含所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的轻链可变区，其中，所述第一多肽包含与 SEQ ID NOs: 206-226 任意一个所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列，和/或所述第二多肽包含与 SEQ ID NO: 140、158-163、168、或 185-189 任意一个所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列。

54、如权利要求 53 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含如下的第一多肽和第二多肽：

(1) 分别与 SEQ ID NO: 206 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 158 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 207 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 159 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(3) 分别与 SEQ ID NO: 208 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 160 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(4) 分别与 SEQ ID NO: 209-213 任意一个所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 140 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(5) 分别与 SEQ ID NO: 214 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 161 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(6) 分别与 SEQ ID NO: 215 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 162 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(7) 分别与 SEQ ID NO: 216 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 163 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(8) 分别与 SEQ ID NO: 217 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 185 或 187 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(9) 分别与 SEQ ID NO: 218 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 186 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(10) 分别与 SEQ ID NO: 219 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 188 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列；或

(11) 分别与 SEQ ID NO: 220 任意一个所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 189 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(12) 分别与 SEQ ID NO: 221-226 任意一个所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 168 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；

优选地，所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含如下的第一多肽和第二多肽：

(1) 分别与 SEQ ID NO: 206 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 158 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 209、210 或 213 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 140 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(3) 分别与 SEQ ID NO: 214 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 161 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(4) 分别与 SEQ ID NO: 217 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 185 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(5) 分别与 SEQ ID NO: 218 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 186 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列；或

(6) 分别与 SEQ ID NO: 222、223、224 或 226 所示的第一多肽和 SEQ ID NO: 168 所示的第二多肽具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%相同的氨基酸序列。

55、一种 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其包含：

(1) 如权利要求 1-5 中任一项所述的 hIL-2 变体，

(2) 如权利要求 6-13 中任一项所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段，以及

(3) 所述 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面包含二硫键，

其中，所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段能够与 IL2R α 竞争性结合所述 hIL-2 变体并且能够阻断所述 hIL-2 变体与 IL2R α 或包含有 α 亚基的 IL-2 受体聚合体（即 IL2R α/β 或 IL2R $\alpha/\beta/\gamma$ ）的结合，以及

所述的抗原-抗体结合界面与 hIL-2 变体与 IL2R α 的结合界面存在部分重叠，所述二硫键是通过在所述抗原-抗体结合界面的 hIL-2 变体的序列中引入的至少一个半胱氨酸残基与通过在所述抗原-抗体结合界面的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的序列中引入的至少一个半胱氨酸残基所形成的，

所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白不与 IL2R 的 α 亚基，或 α/β 二聚体，或 $\alpha/\beta/\gamma$ 三聚体结合，但是保留了对 IL2R β 和 γ 受体亚基二聚体（IL2R β/γ ）的结合以及功能活性。

56、如权利要求 55 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面位于所述 hIL-2 变体的 AB 环、B 螺旋、C 螺旋和 CD 环，优选位于所述 hIL-2 变体的 AB 环、B 螺旋、C 螺旋和 CD 环；所述的 hIL-2 变体的 IL2R α 结合界面位于 hIL-2 变体的 AB 环和 B 螺旋。

57、如权利要求 55 或 56 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面位于所述 hIL-2 变体的第 30-45 位或其邻近的氨基酸残基，第 57-77 位或其邻近的氨基酸残基，和/或第 90-111 位或其邻近的氨基酸残基，优选地，所述 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面位于所述 hIL-2 变体的第 41-45 位或其邻近的氨基酸残基、第 57-68 位或其邻近的氨基酸残基以及第 90-107 位或其邻近的氨基酸残基。

58、如权利要求 55-57 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面包含两个或两个以上由以下所述的半胱氨酸残基形成所述的二硫键：

(1) 所述 hIL-2 变体相对于 SEQ ID NO: 1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列在第 42 位、第 64 位、第 65 位、第 102 位和第 104 位氨基酸残基处具有一个、或两个、或两个以上氨基酸突变，以引入第一个半胱氨酸残基；和

(2) 如权利要求 6-13 中任一项所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段在 HCDR3 的第 3 位氨基酸残基处和 LCDR2 的第 3 位氨基酸残基处具有一个或两个氨基酸突变, 以引入第二个半胱氨酸残基; 或如权利要求 13 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段在其轻链可变区的框架区具有一个或两个氨基酸突变, 以引入第二个半胱氨酸残基, 所述氨基酸突变位于所述轻链可变区的第 67 和/或 68 位氨基酸残基处;

在所述 hIL-2 变体引入第一个半胱氨酸残基所在的位点和在所述抗 IL-2 人源化抗体或抗原结合片段引入第二个半胱氨酸残基所在的位点能够正确配对, 所述正确配对的位点位于所述 hIL-2 变体与所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面, 并且配对氨基酸残基之间的空间距离小于 10 埃, 优选地, 所述空间距离小于 5 埃。

59、如权利要求 55-58 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 在所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白中的 hIL-2 变体与抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段的抗原-抗体结合界面形成二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的配对选自以下一个、或两个、或两个以上配对氨基酸突变的组合:

(1) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 104 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 M104C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段通过在其 LCDR2 第 3 位上引入氨基酸突变 T3C 所获得, 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 24 所示的 HCDR3 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 26 所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列; 和/或

(2) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 102 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 T102C, 所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 人源化抗体或其抗原结合片段通过在其轻链可变区第 67 位上引入氨基酸突变 S67C 所获得, 所述抗 IL-2 抗体或其结合片段包含与 SEQ ID NO: 77 所示的 VL 具有 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列, 或

所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段通过在其轻链可变区第 68 位上引入氨基酸突变 G68C 所获得, 所述抗 IL-2 抗体或其结合片段包含与 SEQ ID NO: 77 所示的 VL 具有 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列; 和/或

(3) 所述第一半胱氨酸残基是所述 hIL-2 变体相对于如 SEQ ID NO:1 所示的野生型 hIL-2 的氨基酸序列的第 42 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 F42C, 或第 64 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 K64C, 或第 65 位氨基酸残基处具有的氨基酸突变 P65C, 和所述第二半胱氨酸残基是所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段通过在其 HCDR3 第 3 位上引入氨基酸突变 F3C 所获得, 所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2 氨基酸序列、SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 10 或 39-42 任一项所示的 LCDR1 氨基酸序列、SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3 氨基酸序列。

60、如权利要求 55-59 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3, 所述的 HCDR3 和/或 LCDR2 包含一个半胱氨酸残基突变, 所述重链可变区的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 和轻链可变区的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 包括:

(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 或 39-42 任一项所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3; 或

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示的 HCDR3, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示的 LCDR1, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 或 33 所示的 LCDR2, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3。

61、如权利要求 55-60 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白, 其中, 所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白包含具有所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区, 和/或具有所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的轻链可变区,

所述重链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 86 或 74 所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、

89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，和/或轻链可变区包含分别与 SEQ ID NO: 64、87-91、107、108 或 109 任一项所示的序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

进一步，所述重链可变区和轻链可变区包括：

(1) 分别与 SEQ ID NO: 86 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 64 或 87-91 任一项所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列；或

(2) 分别与 SEQ ID NO: 74 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 107、108 或 109 所示的轻链可变区具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

62、如权利要求 14-61 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，其中，所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白还包括恒定区，所述恒定区包括抗体重链恒定区和轻链恒定区，其中，所述重链恒定区包括人 IgG 重链恒定区 Fc 区的天然和突变蛋白形式，还包括含有促进二聚体形成的铰链区的多肽截短形式，优选的 Fc 区来源于人 IgG，包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4，

进一步，所述的 Fc 区包含工程化的人 IgG1 Fc 区，其包含以下一种、或两种或其以上氨基酸取代：

(1) L234F/L235E/P331S (EU 编号系统)，以降低 Fc 区与 FcγRs 和 C1q 的结合；和/或

(2) N203D/K274Q/Q419E (EU 编号系统)，以延长所述 hIL-2/IL-2 融合蛋白在体内的半衰期。

63、一种核酸，其编码如权利要求 1-5 中任一项所述的 hIL-2 变体、权利要求 6-13 中任一项所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 14-62 任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的核酸。

64、一种表达载体，其能够表达权利要求 63 所述的核酸。

65、一种宿主细胞，包含权利要求 63 所述的核酸或权利要求 64 所述的表达载体。

66、一种使用权利要求 65 所述的宿主细胞制备权利要求 1-5 中任一项所述的 hIL-2 变体、权利要求 6-13 中任一项所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 14-62 任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白的方法，包括：(i) 在所述的宿主细胞中表达所述 hIL-2 变体、所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，和 (ii) 从所述的宿主细胞或细胞培养物中分离所述 hIL-2 变体、所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白。

67、一种双特异性分子，包含如权利要求 6-13 中任一项所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或如权利要求 14-62 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，所述双特异性抗体的两个臂之一包含所述抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白，而另一个臂包含对 hIL-2 以外的抗原（优选与癌症相关的抗原或免疫检查点蛋白抗原）具有特异性的抗体，或与免疫效应器细胞相关的抗原特异性结合的抗体或其抗原结合片段，所述与癌症相关的抗原可以选自 HER2、EGFR、VEGF、VEGFR、CD19、CD20、CD30、CD33、CD52、BCMA、SLAMF7、MUC1、MUC16、EphB2、E-选择素、EpCam、CEA、PSMA、PSA、ERBB3、c-MET、ILT3、ILT7、5T4、GPC-3、DLL3 等，所述免疫检查点蛋白抗原可以选自 PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、CTLA-4、LAG-3、CEACAM-1、CEACAM-5、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD40、CD40L、OX40、CD160、2B4 或 TGFR。

68、一种免疫缀合物、嵌合抗原受体、工程化 T 细胞受体、或溶瘤病毒，包含权利要求 6-13 中任一项所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 14-62 中任一项所述 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白。

69、一种药物组合物，包含如权利要求 6-13 中任一项所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、权利要求 14-62 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白、权利要求 67 所述的双特异性分子、或权利要求 68 所述的免疫缀合物、嵌合抗原受体、工程化 T 细胞受体、或溶瘤病毒，以及药学上可接受的载体。

70、一种药盒，包含权利要求 69 所述的药物组合物、任选的另一种抗癌剂和/或免疫调节剂，所述抗癌剂包括微管破坏物、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、DNA 嵌入剂、烷化剂、激素治疗物、激酶抑制剂（例如，酪氨酸激酶抑制剂包括 EGFR 抑制剂、HER2 抑制剂、HER3 抑制剂、IGFR 抑制剂和 Met 抑制剂）、受体拮抗剂、肿瘤细胞凋亡的激活剂（包括 IAP 抑制剂、Bcl2 抑制剂、MC11 抑制剂、TRAIL 抑制剂、CHK 抑制剂）、或任何抗血管生成的药物；所述免疫调节剂包括 PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、CTLA-4、LAG-3、CEACAM-1、CEACAM-5、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、

2B4 或 TGFR 抑制剂。

71、一种试剂盒,包括有效量的如权利要求 6-13 中任一项所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 14-62 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白、或权利要求 69 所述的药物组合物。

72、如权利要求 6-13 中任一项所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 14-62 中任一项所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白在用于制备治疗疾病的药物组合物或制剂中的用途,所述疾病包括增殖性疾病或感染、免疫缺陷疾病,所述增殖性疾病包括癌症和其它细胞增殖病症。

73、如权利要求 72 所述的用途,其中,所述癌症包括黑色素瘤、肺癌、结直肠癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肾癌、肝癌、脑癌、食道癌、胆囊癌、胰腺癌、胃癌、甲状腺癌、膀胱癌和淋巴瘤;所述免疫缺陷疾病包括 HIV 阳性、免疫抑制疾病、慢性感染。

74、一种通过提高宿主免疫响应来治疗疾病、病状或病症的方法,包括:向受试者施用有效量的如权利要求 6-13 所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 14-62 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白、或权利要求 69 所述的药物组合物、或权利要求 70 所述的药盒、或权利要求 71 所述的试剂盒来特异性激活表达 IL2R β/γ 效应细胞(例如, CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞)的生物学活性,从而改善疾病状况。

75、一种刺激免疫系统的方法,包括:向受试者施用有效量的如权利要求 6-13 所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 14-62 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白、或权利要求 69 所述的药物组合物、或权利要求 70 所述的药盒、或权利要求 71 所述的试剂盒来刺激免疫系统,包括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、IL2R β/γ 表达升高、T 细胞应答性升高、天然杀伤细胞活性或淋巴因子激活的杀伤细胞活性升高、受试者体内 CD8⁺ T 细胞与 CD4⁺ T 细胞比率升高。

76、一种治疗、缓解或预防对宿主免疫系统的刺激是有益的疾病状况的方法,包括:向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求 6-13 所述的抗 IL-2 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 14-62 所述的 hIL-2/IL-2 抗体融合蛋白、或权利要求 69 所述的药物组合物、或权利要求 70 所述的药盒、或权利要求 71 所述的试剂盒,以通过增强所述受试者细胞免疫应答来改善疾病状况,所述疾病状况包括宿主免疫应答不足或免疫缺陷,进一步所述疾病状况是增殖性疾病或感染、免疫缺陷疾病,所述增殖性疾病包括癌症和其它细胞增殖病症。

77、如权利要求 76 所述的方法,其中,所述癌症选自鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、和肺的鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌和胃肠基质癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、尿道癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、黑色素瘤、浅表扩散性黑色素瘤、恶性雀斑样痣黑色素瘤、肢端黑色素瘤、结节性黑色素瘤、多发性骨髓瘤和 B 细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(Non-Hodgkin Lymphoma)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞性白血病、慢性成髓细胞性白血病、和移植后淋巴增殖性病症(PTLD)、以及与癰疽病、水肿(例如与脑瘤有关的)和梅格斯氏综合征(Meigs syndrome)有关的异常血管增殖、脑瘤和脑癌、以及头颈癌。

78、如权利要求 76 所述的方法,进一步包含施用免疫检查点抑制剂、抗原特异性免疫治疗剂、化疗试剂、表观遗传修饰剂、细胞因子、生长因子、抑制剂、靶向肿瘤抗原的抗体、肿瘤疫苗、和/或其他癌症疗法,

其中,所述的免疫检查点包括 PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、CTLA-4、LAG-3、CEACAM-1、CEACAM-5、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4 或 TGFR;

所述的抗原特异性免疫治疗剂包含嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)、嵌合抗原受体 NK 细胞(CAR-NK 细胞)、和/或肿瘤浸润淋巴细胞(TIL);

所述的其他癌症疗法包括外科手术、化学疗法、细胞毒性剂、光动力疗法、免疫调节或放射疗法。

79、如权利要求 76 所述的方法,其中,所述免疫缺陷疾病包括 HIV 阳性、免疫抑制疾病、慢性感染。