

白介素-2 衍生物

技术领域

本发明属于分子生物学领域，具体涉及一种白介素-2 衍生物及其复合物。

背景技术

白介素-2(IL-2)，于 1976 年被发现，当时被称为 T 细胞生长因子(TCGF)，是一种在维持 T 淋巴细胞和 NK 细胞的正常功能中起着重要作用的球状糖蛋白。天然 IL-2 是一个具有 133 个氨基酸残基组成的多肽，分子量大约 15kD，有三个半胱氨酸残基，分别位于第 58、105 和 125 位。翻译后修饰包括第 3 位的 Thr 糖基化，第 58 位和 105 位半胱氨酸残基形成二硫键，并形成其功能必不可少的主要由 4 个 α 螺旋以及一些连接序列(loop)组成的高级结构(Bazan 等, Science257,410-413 (1992))。

IL-2 主要由活化的 T 细胞生成，它能促进 T 细胞的增殖和分化，维持 T 细胞活性；刺激天然杀伤(NK)细胞的生成、增殖和活化，并诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的生成以及诱导和激活淋巴因子激活的杀细胞(LAK)及肿瘤浸润淋巴细胞；促进 T 细胞表达细胞因子和细胞溶解分子，促进 B 细胞的增殖(Waldmann 等,Nat Rev Immunol6,595-601(2009))；这些细胞都有或间接有杀伤外源微生物感染细胞以及癌变细胞的作用，因此 IL-2 有很好的抗病毒、抗癌作用和广泛的临床应用潜力。

IL-2 通过结合 IL-2 受体 (IL-2R)来介导其作用，IL-2 受体由 3 个亚基组成，分别为 α (CD25)、 β (CD122)和 γ (CD132)受体亚基，其中 α 受体主要表达在 T 抑制细胞 (T_{reg}) 和一些内皮细胞 (endothelial cells) 表面，而 β 和 γ 受体亚基则高表达于效应性 T 细胞(T_{eff})和 NK 细胞。IL-2 对不同受体亚基的复合物形式的亲和力是不同的，IL-2 对 α 、 β 和 γ 受体亚基组成的复合体的亲和力是最高的，对由 β 和 γ 受体亚基组成的复合体的亲和力则为中等（约降低 100 倍），而 IL-2 与两种形式的受体亚基组合结合后均能传递信号(Minami 等, Annu Rev Immunol 11, 245-268 (1993))。但是临床在 IL-2 低剂量的条件下，是会优先和 Treg 细胞表面上的高亲和力受体结合，则会产生免疫抑制，达不到治疗的效果。高剂量的 IL-2 会通过激活大量的效应 T 细胞从而中和 Treg 激活带来的免疫抑制，同时也会出现更多的毒副作用，以及细胞凋亡(activation induced cell apoptosis)。

基于 IL-2 的抗肿瘤作用，高剂量 IL-2(阿地白介素)于 1992 年通过 FDA 批准用于黑色素瘤和肾细胞癌的临床治疗。但是接受高剂量 IL-2 治疗的患者经常经历严重的副作用，包括心血管、肺水肿、肝、胃肠、神经学和血液学等事件，大多数的

这些副作用可由血管（或毛细管）渗漏综合征(VLS)的来解释，也是临床和动物实验评价 IL-2 治疗副作用的一项指标。而引起 VLS 是由于内皮细胞上表达有 IL-2 的高亲和力受体（ α 、 β 和 γ 亚基）(Krieg 等，Proc Nat Acad Sci USA107, 11906-11(2010))，所以减弱或消除与 α 受体的结合将有助于减弱 IL-2 促进抑制 T 细胞增殖活性的功能；同时还可减少对内皮细胞 α 受体的结合，从而降低或消除 IL-2 治疗引起的毒副作用。IL-2 与 α 受体亚基的结合位点主要在第 37，38，41，42，43，44，45，61，62，65，68 和 72 位氨基酸位点(Rickert.M 等 (2005) Science 308:1477-1480)，Merck 和 Roche 公司或其它科研机构围绕这些与 α 受体亚基结合的 IL-2 表面氨基酸做了一些突变，如 Merck 公司的突变体（R38W、F42K, WO2008003473A2），降低与 α 受体亚基的相互作用，以其达到效应 T 细胞活化以增强功效；而 Roche 的 IL-2 突变体（F42A、Y45A 和 L72G, US 2016/0208017A1），其与 α 受体不结合，但可以正常结合 β 和 γ 受体亚基复合物，并可以发挥效应，目前正在临床中。

因此降低或消除 IL-2 与 α 受体亚基的相互作用，可能是治疗有效性并减少肿瘤患者治疗副作用的一个重要方面。

发明内容

有鉴于现有技术中的缺陷，本发明提供了一种 IL-2 衍生物及起复合物。

本发明的一个方面提供了一种 IL-2 衍生物，在一个具体实施方式中，该 IL-2 衍生物通过在野生型 IL-2 的基础上引入至少一个半胱氨酸残基，部分封闭或完全封闭 IL-2 衍生物与 α 受体亚基的结合平面，同时基本保留对 β 和 γ 受体亚基复合物的亲和力。野生型 IL-2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

进一步地，在野生型 IL-2 的基础上引入的至少一个半胱氨酸残基，能够：

- a) 形成 IL-2 衍生物的分子内二硫键；或者
- b) 使得 IL-2 衍生物能通过分子间二硫键与封闭模块结合。

可选地，所述引入至少一个半胱氨酸残基为通过点突变的方式引入至少一个半胱氨酸残基。

可选地，在一种方式中，在野生型 IL-2 的基础上通过点突变方式引入第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基；所述第一半胱氨酸残基和所述第二半胱氨酸残基中的一个或两个为野生型 IL-2 与 α 受体亚基的结合平面相关的氨基酸或其附近的氨基酸。其中，野生型 IL-2 与 α 受体亚基的结合平面相关的氨基酸位点为第 37 位、第 38 位、第 41 位、第 42 位、第 43 位、第 44 位、第 45 位、第 61 位、第 62 位、第 65 位、第 68 位和第 72 位。

进一步地，第一半胱氨酸残基为野生型 IL-2 的第 37 位、第 38 位、第 41 位、第 42 位、第 43 位、第 44 位、第 45 位、第 61 位、第 62 位氨基酸或其附近的氨基

酸；第二半胱氨酸残基为野生型 IL-2 的第 61 位、第 62 位、第 65 位、第 68 位、第 72 位氨基酸或其附近的氨基酸。可选地，“附近”为：1) 一级结构上相邻的 1~4 个氨基酸；和/或三级结构上相邻的氨基酸。

进一步地，第一半胱氨酸残基为选自下组的氨基酸点突变：K35C、L36C、R38C、M39C、L40C、T41C、F42C、K43C、F44C 和 E61C。

进一步地，第二半胱氨酸残基为选自下组的氨基酸点突变：V69C、E62C、P65C、T111C、Y107C、A112C、T113C、I114C、L72C 和 A73C。

可选地，形成分子内二硫键的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的组合选自下组的氨基酸点突变组合：M39C 和 V69C、F44C 和 E62C、F44C 和 P65C、F42C 和 V69C、E61C 和 Y107C、F42C 和 P65C、F42C 和 T111C、F42C 和 A112C、F42C 和 T113C、T41C 和 A112C、L40C 和 A112C、L40C 和 T113C、L40C 和 I114C、M39C 和 L72C、M39C 和 A73C、R38C 和 V69C、R38C 和 L72C、L36C 和 V69C、L36C 和 L72C、L36C 和 A73C、K35C 和 V69C 以及 K43C 和 A112C。

可选地，第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的残基质心矢量距离为小于 6Å。

可选地，在第二种方式中，在野生型 IL-2 的基础上通过点突变方式引入第三半胱氨酸残基；所述第三半胱氨酸残基为野生型 IL-2 与 α 受体亚基的结合平面相关的氨基酸或其附近的氨基酸。

进一步地，第三半胱氨酸残基为野生型 IL-2 的第 37 位、第 38 位、第 41 位、第 42 位、第 43 位、第 44 位、第 45 位、第 61 位、第 62 位、第 65 位、第 68 位、第 72 位氨基酸或其附近的氨基酸。可选地，“附近”为：1) 一级结构上相邻的 1~4 个氨基酸；和/或三级结构上相邻的氨基酸。

进一步地，所述第三半胱氨酸残基为选自下组的氨基酸点突变：P34C、K35C、T37C、R38C、T41C、K43C、F44C、Y45C、E61C、E62C、K64C、P65C、E68C 和 L72C。

进一步地，封闭模块上具有或引入有第四半胱氨酸残基；IL-2 衍生物上的第三半胱氨酸残基与所述封闭模块上的第四半胱氨酸残基能形成分子间二硫键。

可选地，第三半胱氨酸残基和所述第四半胱氨酸残基的残基质心矢量距离为小于 6Å。

可选地，封闭模块为 α 受体亚基的胞外段。

进一步地， α 受体亚基的胞外段的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 24 所示。

进一步地， α 受体亚基的胞外段上的所述第四半胱氨酸残基位选自下组的氨基酸点突变：D4C、D5C、M25C、N27C、R35C、R36C、K38C、S39C、G40C、S41C、L42C、I118C、Y119C 和 H120C。

可选地，形成分子间二硫键的第三半胱氨酸残基和第四半胱氨酸残基的组合选

自下组的氨基酸点突变组合：T41C 和 N27C、P34C 和 D4C、E68C 和 L42C、Y45C 和 R35C、R38C 和 H120C、L72C 和 M25C、E61C 和 S39C、T41C 和 I118C、K35C 和 D4C、T37C 和 D4C、R38C 和 D4C、R38C 和 D5C、T41C 和 L42C、T41C 和 Y119C、K43C 和 R35C、K43C 和 R36C、F44C 和 L42C、K43C 和 L42C、E61C 和 K38C、E62C 和 K38C、K64C 和 S39C、K64C 和 G40C、K64C 和 S41C、P65C 和 K38C。

无论第一种方式还是第二种方式，可选地，通过点突变的方式将野生型 IL-2 第 125 位的半胱氨酸残基转变为其他的氨基酸残基。

进一步可选地，野生型 IL-2 第 125 位的点突变为 C125A。

。

可选地，IL-2 衍生物的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 ~ SEQ ID NO. 24 所示；或如 SEQ ID NO. 26~40 所示。

本发明的第二个方面提供了一种复合物，在一个具体实施方式中，该复合物包括：

1) IL-2 衍生物，所述 IL-2 衍生物在野生型 IL-2 的基础上引入第三半胱氨酸残基；

2) 封闭模块，所述封闭模块上具有或引入有第四半胱氨酸残基；

所述 IL-2 衍生物上的第三半胱氨酸残基和所述封闭模块上的第四半胱氨酸残基形成分子间二硫键，从而形成 IL-2 与封闭模块的复合物，部分封闭或完全封闭 IL-2 衍生物与 α 受体亚基的结合平面，同时基本保留对 β 和 γ 受体亚基复合物的亲和力。

可选地，引入至少一个半胱氨酸残基为通过点突变的方式引入至少一个半胱氨酸残基。

进一步地，所述第三半胱氨酸残基为野生型 IL-2 与 α 受体亚基的结合平面相关的氨基酸或其附近的氨基酸。

进一步地，所述第三半胱氨酸残基为野生型 IL-2 的第 37 位、第 38 位、第 41 位、第 42 位、第 43 位、第 44 位、第 45 位、第 61 位、第 62 位、第 65 位、第 68 位、第 72 位氨基酸或其附近的氨基酸。可选地，“附近”为：1) 一级结构上相邻的 1~4 个氨基酸；和/或三级结构上相邻的氨基酸。

可选地，所述第三半胱氨酸残基和所述第四半胱氨酸残基的残基质心矢量距离为小于 6Å。

进一步地，第三半胱氨酸残基为选自下组的氨基酸点突变：P34C、K35C、T37C、R38C、T41C、K43C、F44C、Y45C、E61C、E62C、K64C、P65C、E68C 和 L72C。

可选地，所述封闭模块为 α 受体亚基的胞外段，其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 25 所示。

进一步地， α 受体亚基的胞外段上的所述第四半胱氨酸残基位选自下组的氨基酸点突变：D4C、D5C、M25C、N27C、R35C、R36C、K38C、S39C、G40C、S41C、L42C、I118C、Y119C 和 H120C。

可选地，形成分子间二硫键的第三半胱氨酸残基和第四半胱氨酸残基的组合选自下组的氨基酸点突变组合：T41C 和 N27C、P34C 和 D4C、E68C 和 L42C、Y45C 和 R35C、R38C 和 H120C、L72C 和 M25C、E61C 和 S39C、T41C 和 I118C、K35C 和 D4C、T37C 和 D4C、R38C 和 D4C、R38C 和 D5C、T41C 和 L42C、T41C 和 Y119C、K43C 和 R35C、K43C 和 R36C、F44C 和 L42C、K43C 和 L42C、E61C 和 K38C、E62C 和 K38C、K64C 和 S39C、K64C 和 G40C、K64C 和 S41C、P65C 和 K38C。

可选地，野生型 IL-2 第 125 位的点突变为 C125A。

。

可选地，IL-2 衍生物的氨基酸序列和所述 α 受体亚基的胞外段的序列组合选自下组的组合：SEQ ID NO. 26 和 SEQ ID NO. 50，SEQ ID NO. 27 和 SEQ ID NO. 51，SEQ ID NO. 28 和 SEQ ID NO. 52，SEQ ID NO. 29 和 SEQ ID NO. 53，SEQ ID NO. 30 和 SEQ ID NO. 54，SEQ ID NO. 31 和 SEQ ID NO. 55，SEQ ID NO. 32 和 SEQ ID NO. 56，SEQ ID NO. 33 和 SEQ ID NO. 57，SEQ ID NO. 34 和 SEQ ID NO. 58，SEQ ID NO. 35 和 SEQ ID NO. 59，SEQ ID NO. 36 和 SEQ ID NO. 60，SEQ ID NO. 37 和 SEQ ID NO. 61，SEQ ID NO. 38 和 SEQ ID NO. 62，SEQ ID NO. 39 和 SEQ ID NO. 63，SEQ ID NO. 40 和 SEQ ID NO. 64，SEQ ID NO. 41 和 SEQ ID NO. 65，SEQ ID NO. 42 和 SEQ ID NO. 66，SEQ ID NO. 43 和 SEQ ID NO. 67，SEQ ID NO. 44 和 SEQ ID NO. 68，SEQ ID NO. 45 和 SEQ ID NO. 69，SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 70，SEQ ID NO. 47 和 SEQ ID NO. 71，SEQ ID NO. 48 和 SEQ ID NO. 72，SEQ ID NO. 49 和 SEQ ID NO. 73。

本发明的第三个方面提供了一种分离的多核苷酸，在一个具体实施方式中，其编码如上所述的 IL-2 衍生物，或者编码如上所述的复合物。

本发明的第四个方面提供了一种表达载体，在一个具体实施方式中，其包含如上所述的一种分离的多核苷酸。

本发明的第五个方面提供了一种宿主细胞，在一个具体实施方式中，包含如上所述的一种分离的多核苷酸。

本发明的第六个方面提供了一种组合物，在一个具体实施方式中，该组合物包含如上所述的 IL-2 衍生物或者如上所述的复合物，以及药学可接受载体。

本发明的第七个方面提供如上所述的 IL-2 衍生物或者如上所述的复合物用于制备用于治疗疾病的药物或制剂中的用途。

本发明的第八个方面提供如上所述的 IL-2 衍生物或者如上所述的复合物在制

备用于刺激个体的免疫系统的组合物中的用途。

本发明的第九个方面提供了一种生成 IL-2 衍生物的方法，在一个具体实施方式中，该方法包括在适合于表达所述 IL-2 衍生物的条件下培养如上所述的宿主细胞。

本发明的第十个方面提供了一种生成复合物的方法，在一个具体实施方式中，该方法包括在适合于表达所述复合物的条件下培养如权利要求 37 所述的宿主细胞。

本发明的具体实施方式中的 IL-2 衍生物或复合物，通过形成分子内或分子间二硫键的方式，使得 IL-2 衍生物与 α 受体结合的位点被封闭，从而避免与 α 受体结合结构。本发明中的 IL-2 衍生物或复合物为减少 VLS 或降低或消除 IL-2 治疗引起的毒副作用带来的新的方向。

附图说明

图 1 是本发明一个实施例中纯化后的 IL-2 衍生物 SDS-PAGE 电泳；其中，还原为上样缓冲液中加入还原剂 β -ME，非还原为不加还原剂。

图 2 是本发明一个实施例中 Fortebio 测试 IL-2 衍生物与 IL2R α 结合能力测定信号图，浓度为 100 nM；使用的不相关的蛋白对照为 HER2。其中，图 2A 针对 IL-2 wt C125A；图 2B 针对 IL-2 突变体 1；图 2C 针对 IL-2 突变体 2；图 2D 针对 IL-2 突变体 3；图 2E 针对 IL-2 突变体 4；图 2F 针对 IL-2 复合物 1；图 2G 针对 IL-2 复合物 2；图 2H 针对 IL-2 复合物 3；图 2I 针对 IL-2 复合物 4。

图 3 是本发明一个实施例中 Fortebio 测试 IL-2 衍生物与 IL2R $\beta\gamma$ 结合亲和力测定信号图以及 K_a , k_d , KD 和 R^2 ，浓度范围是 1.25 nM- 40 nM。其中，图 3A 针对 IL-2 wt C125A；图 3B 针对 IL-2 突变体 1；图 3C 针对 IL-2 突变体 2；图 3D 针对 IL-2 突变体 3；图 3E 针对 IL-2 突变体 4；图 3F 针对 IL-2 复合物 1；图 3G 针对 IL-2 复合物 2；图 3H 针对 IL-2 复合物 3；图 3I 针对 IL-2 复合物 4。

图 4 是本发明一个实施例中 CTLL-2(T 细胞)的增殖实验。

具体实施方式

以下将结合实施例对本发明作进一步地说明，应理解这些实施例仅作为例证的目的，不用于限制本发明的保护范围。

下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。所采用的试剂，若无特殊说明，均为市售或公开渠道可以获得的试剂。

本文中，IL-2 衍生物和野生型 IL-2 的相关氨基酸位置，以野生型 IL-2 的

氨基酸序列（如 SEQ ID NO. 1）为基准进行计算。

野生型 IL-2（IL-2 wt, SEQ ID NO. 1）：

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK
ATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF
MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT。

野生型 IL-2 的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 146 所示。

本文中，CD25-ECD 的相关氨基酸位置，以 SEQ ID NO. 25 所示的氨基酸序列为基准进行计算。

本文中，“第一”、“第二”、“第三”等，仅是为了进行区分，不是顺序的限定。例如，一个衍生物中可以仅具有“第三”半胱氨酸残基，而不必具有“第一”和“第二”半胱氨酸残基。

本文中，“IL-2 衍生物”包括 IL-2 突变体、IL-2 突变体与其他分子形成的复合物。IL-2 突变体是指在野生型 IL-2 的基础上进行突变（比如点突变或插入突变）所形成的分子。

本文中，“IL2R α ”是指白介素-2 受体 α ，也称为“ α 受体亚基”；“IL2R β ”是指白介素-2 受体 β ，也称为“ β 受体亚基”；“IL2R γ ”是指白介素-2 受体 γ ，也称为“ γ 受体亚基”；“IL2R $\beta\gamma$ ”是指白介素-2 受体 β 和受体 γ 形成的复合物，也称为“ β 和 γ 受体亚基复合物”。

现有技术中，为了能够降低或消除 IL-2 与 α 受体的结合，都是对 IL-2 与 α 受体的结合表面内的氨基酸进行简单突变。

本发明的具体实施方式中，采用的策略是通过引入额外的半胱氨酸残基，使得 IL-2 分子内部形成新的二硫键，或者使得 IL-2 通过分子间二硫键与另外的封闭模块形成复合物，从而部分封闭或完全封闭 IL-2 与 α 受体的结合位点，但是也不影响与 β 和 γ 受体亚基复合物的结合。

在第一个具体实施方式中，是通过引入第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基，形成 IL-2 分子内二硫键，使得 IL-2 衍生物从结构上更加稳定，而且还可以形成屏障，破坏与 α 受体的结合平面。

引入第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的方式是在野生型 IL-2 的基础上进行合适的点突变。关于需要引入的第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基的位置，主要通过以下方式确定：

1) 第一和第二半胱氨酸残基的位置为 IL-2 和 α 受体的结合面上的氨基酸残基或其附近的氨基酸残基；IL-2 和 α 受体的结合面上的氨基酸残基为第 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 65, 68 和 72 位氨基酸位点；

2) 充分考虑到 IL-2 的结构和原子间的距离；

3) 通过生物信息学和蛋白质工程学设计, 在上述氨基酸残基周围根据残基质心的矢量距离判据, 寻找两个合适的位点, 其能形成分子内二硫键, 但是不容易或不会形成 IL-2 分子间二硫键。

确定合适的位点后, 通过突变将原氨基酸残基突变成第一半胱氨酸残基和第二半胱氨酸残基。突变后的 IL-2 衍生物 (及 IL-2 突变体) 通过正常的转录和翻译后形成分子内的二硫键。

在一些实施例中, 将 IL-2 第 125 位原有的自由半胱氨酸突变掉, 防止其干扰分子间二硫键的形成。

在一些实施例中, 设计获得的 IL-2 突变体的氨基酸序列如表 1 所示:

表 1 设计获得的 IL-2 突变体的氨基酸序列

突变名称	突变位点	蛋白序列	SEQ ID NO.	核苷酸序列 (SEQ ID NO.)
IL-2 wt (C125A)	IL-2 wt(C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFAQSIISTLT	2	74
IL-2 突变体 1	IL2(M39C, V69C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRCLTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEECLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFAQSIISTLT	3	75
IL-2 突变体 2	IL2(F44C, E62C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKCYMPKKATELKHLQ CLEECLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFAQSIISTLT	4	76
IL-2 突变体 3	IL2(F44C, P65C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKCYMPKKATELKHLQ CLEEELKCLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFAQSIISTLT	5	77
IL-2 突变体 4	IL2(F42C, V69C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTCKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEECLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFAQSIISTLT	6	78
IL-2 突变体 5	IL2(E61C, Y107C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ CLECELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCECADETATIVEF	7	79

		LNRWITFAQSIISTLT		
IL-2 突 变体 6	IL2(F42C, P65C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTCKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKCLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFAQSIISTLT	8	80
IL-2 突 变体 7	IL2(F42C, T111C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTCKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADECATIVEF LNRWITFAQSIISTLT	9	81
IL-2 突 变体 8	IL2(F42C, A112C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTCKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETCTIVEF LNRWITFAQSIISTLT	10	82
IL-2 突 变体 9	IL2(F42C, T113C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTCKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETACIVEF LNRWITFAQSIISTLT	11	83
IL-2 突 变体 10	IL2(T41C, A112C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLCFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETCTIVEF LNRWITFAQSIISTLT	12	84
IL-2 突 变体 11	IL2(L40C, A112C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMCTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETCTIVEF LNRWITFAQSIISTLT	13	85
IL-2 突 变体 12	IL2(L40C, T113C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMCTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETACIVEF LNRWITFAQSIISTLT	14	86
IL-2 突 变体 13	IL2(L40C, I114C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMCTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATCVE FLNRWITFAQSIISTLT	15	87
IL-2 突 变体 14	IL2(M39C, L72C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRCLTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNCAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF	16	88

		LNRWITFAQSIISTLT		
IL-2 突变体 15	IL2(M39C, A73C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRCLTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLCQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFAQSIISTLT	17	89
IL-2 突变体 16	IL2(R38C, V69C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTCMLTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEECLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFAQSIISTLT	18	90
IL-2 突变体 17	IL2(R38C, L72C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTCMLTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNCAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFAQSIISTLT	19	91
IL-2 突变体 18	IL2(L36C, V69C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKCTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEECLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFAQSIISTLT	20	92
IL-2 突变体 19	IL2(L36C, L72C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKCTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNCAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFAQSIISTLT	21	93
IL-2 突变体 20	IL2(L36C, A73C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKCTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLCQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFAQSIISTLT	22	94
IL-2 突变体 21	IL2(K35C, V69C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPCLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEECLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFAQSIISTLT	23	95
IL-2 突变体 22	IL2(K43C, A112C, C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETCTIVEF LNRWITFAQSIISTLT	24	96

表达宿主可以是 *E.Coli* 或哺乳动物细胞。

在第二个具体实施方式中, IL-2 通过分子间二硫键与封闭模块形成复合物,

从而全部或部分封闭 IL-2 与 α 受体的结合平面，进而阻断 IL-2 与内源性 α 受体的结合。IL-2 与封闭模块之间的二硫键，是通过在野生型 IL-2 上引入第三半胱氨酸残基，在封闭模块上具有或引入第四半胱氨酸残基，由第三半胱氨酸残基和第四半胱氨酸残基之间形成的。

在一个实施例中，封闭模块是 α 受体的胞外段。野生型 α 受体的胞外段的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 25 所示。在天然状态下， α 受体与 IL-2 的结合并不稳定（高解离系数 K_d ），不能形成稳定的异源二聚体，必须与 β 和 γ 受体亚基共同构成 IL-2 的高亲和力的受体。因此，无法通过共表达两种野生型的分子而形成稳定的复合物。但是，在野生型 IL-2 上引入第三半胱氨酸残基，在 α 受体的胞外段（CD25-ECD）上引入第四半胱氨酸残基，通过第三半胱氨酸残基和第四半胱氨酸残基之间形成的二硫键，使 IL-2 衍生物和 α 受体的胞外段（CD25-ECD）形成复合物，阻断 IL-2 与内源性 α 受体的结合。

野生型 α 受体的胞外段的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 25 所示：

ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSH
SSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGH
CREPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK
TRWTQPQLICTG;

野生型 α 受体的胞外段的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 145 所示。

关于需要引入的第三半胱氨酸残基和第四半胱氨酸残基的位置，主要通过以下方式确定：

1) 第三半胱氨酸残基的位置为 IL-2 和 α 受体的结合面上的氨基酸残基或其附近的氨基酸残基；IL-2 和 α 受体的结合面上的氨基酸残基为第 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 65, 68 和 72 位氨基酸位点；

2) 通过生物信息学和蛋白质工程学设计，分别在 IL-2 和 α 受体胞外区（CD25-ECD）根据残基质心的矢量距离判据，寻找合适的结合面位点，该突变不影响蛋白质的结构。

确定合适的位点后，通过突变将 IL-2 上的原氨基酸残基突变成第三半胱氨酸残基，将 α 受体胞外区（CD25-ECD）上的原氨基酸残基突变成第四半胱氨酸残基。IL-2 和 α 受体胞外区的突变体进行共表达之后，通过转录和翻译后，可以在 IL-2 与 α 受体胞外区之间形成二硫键，形成一个全新的分子 IL-2/CD25-ECD 异源二聚体（heterodimer）。该复合物无法与体内的内源性 α 受体结合，但是可以与 β 和 γ 受体亚基复合物结合，从而达到不激活 Treg 的目的。

在一个实施例中，将 IL-2 第 125 位原有的自由半胱氨酸突变掉，防止其与带有半胱氨酸突变的 α 受体的胞外段及 IL-2 形成额外的二硫键，影响 α 受体

与 IL-2 二聚体的形成。

在一些实施例中,设计获得的 IL-2 突变体和 CD25-ECD 突变体的氨基酸序列如表 2 所示:

表 2 设计获得的 IL-2 突变体和 CD25-ECD 突变体的氨基酸序列

复合物名称	突变体名称及突变位点	蛋白序列	SEQ ID NO.	核苷酸序列 (SEQ ID NO.)
IL-2 复合物 1	IL2 (C125A, T41C) Pair1	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLCFKFYMPKKATELKHL QCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	26	97
	CD25-ECD (N27C) Pair1	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLC CECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	50	121
IL-2 复合物 2	IL2 (C125A, P34C) Pair2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNCKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	27	98
	CD25-ECD (D4C) Pair2	ELCCDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	51	122
IL-2 复合物 3	IL2 (C125A, E68C) Pair3	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEEELKPLECVLNLAQSKNFHLRPRD	28	99

		LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT		
	CD25-ECD (L42C) Pair3	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKSGSCYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	52	123
IL-2 复 合物 4	IL2 (C125A, Y45C) Pair4	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFCMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	29	100
	CD25-ECD (R35C) Pair4	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFCRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	53	124
IL-2 复 合物 5	IL2 (C125A, R38C) Pair5	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGIN NYKNPKLTCMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	30	101
	CD25-ECD (H120C) Pair5	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYCFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	54	125
IL-2 复 合物 6	IL2 (C125A, L72C) Pair6	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGIN NYKNPKLTCMLTFKFYMPKKATELKHL	31	102

		QCLEEEELKPLEEVLNCAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT		
	CD25-ECD (M25C) Pair6	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTCLNC ECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWD NQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERK TTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWE NEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRAL HRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTG	55	126
IL-2 复 合物 7	IL2 (C125A, E61C) Pair7	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLECELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	32	103
	CD25-ECD (S39C) Pair7	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKCGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	56	127
IL-2 复 合物 8	IL2 (C125A, T41C) Pair8	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLCFKFYMPKKATELKHL QCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	33	104
	CD25-ECD (I118C) Pair8	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERCYHFVVGQMVYYQCVQGYR ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLIC TG	57	128
IL-2 复 合物 9	IL2 (C125A, K35C) Pair9	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGIN NYKNPCLTRMLTFKFYMPKKATELKHL	34	105

		QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT		
	CD25-ECD (D4C) Pair9	ELCCDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	58	129
IL-2 复 合物 10	IL2 (C125A, T37C) Pair10	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLCRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	35	106
	CD25-ECD (D4C) Pair10	ELCCDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	59	130
IL-2 复 合物 11	IL2 (C125A, R38C) Pair11	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTCMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	36	107
	CD25-ECD (D4C) Pair11	ELCCDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	60	131

IL-2 复合物 12	IL2 (C125A, R38C) Pair12	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTCMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	37	108
	CD25-ECD (D5C) Pair12	ELCDCDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	61	132
IL-2 复合物 13	IL2 (C125A, T41C) Pair13	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLCFKFYMPKKATELKHL QCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	38	109
	CD25-ECD (L42C) Pair13	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKSGSCYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	62	133
IL-2 复合物 14	IL2 (C125A, T41C) Pair14	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLCFKFYMPKKATELKHL QCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	39	110
	CD25-ECD (Y119C) Pair14	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERICHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT	63	134

		G		
IL-2 复合物 15	IL2 (C125A, K43C) Pair15	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFCFYMPKKATELKHL QCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	40	111
	CD25-ECD (R35C) Pair15	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFCRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	64	135
IL-2 复合物 16	IL2 (C125A, K43C) Pair16	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFCFYMPKKATELKHL QCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	41	112
	CD25-ECD (R36C) Pair16	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFCRIKSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	65	136
IL-2 复合物 17	IL2 (C125A, F44C) Pair17	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKCYMPKKATELKHL QCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	42	113
	CD25-ECD (L42C) Pair17	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKSGSCYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW	66	137

		ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G		
IL-2 复 合物 18	IL2 (C125A, K43C) Pair18	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFCFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	43	114
	CD25-ECD (L42C) Pair18	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKSGSCYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	67	138
IL-2 复 合物 19	IL2 (C125A, E61C) Pair19	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLECELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	44	115
	CD25-ECD (K38C) Pair19	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRICSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	68	139
IL-2 复 合物 20	IL2 (C125A, E62C) Pair20	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEECLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	45	116
	CD25-ECD (K38C) Pair20	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRICSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER	69	140

		KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G		
IL-2 复 合物 21	IL2 (C125A, K64C) Pair21	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEEELCPLEEVNLNAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	46	117
	CD25-ECD (S39C) Pair21	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKCSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	70	141
IL-2 复 合物 22	IL2 (C125A, K64C) Pair22	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEEELCPLEEVNLNAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	47	118
	CD25-ECD (G40C) Pair22	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKCSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	71	142
IL-2 复 合物 23	IL2 (C125A, K64C) Pair23	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEEELCPLEEVNLNAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	48	119
	CD25-ECD (S41C) Pair23	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLN CECKRGFRRIKSGCLYMLCTGNSSHSSW	72	143

		DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPREEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G		
IL-2 复 合物 24	IL2 (C125A, P65C) Pair24	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEELKCLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFAQSIISTLT	49	120
	CD25-ECD (K38C) Pair24	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNLN CECKRGFRRICSGSLYMLCTGNSSHSSW DNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPREEQKER KTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPW ENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRA LHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT G	73	144

表达宿主为哺乳动物细胞（HEK293 或 CHO）。

实施例 1 IL-2(C125A)、IL-2 突变体和 IL-2 复合物的制备

本实施例中挑选 IL-2 wt(C125A)，IL-2 突变体 1~4 和 IL-2 复合物 1~4 进行分别表达，并依靠分子 C 端带有的 HPC4 标签进行纯化和制备。

1.1 表达质粒构建

委托苏州金唯智生物科技有限公司合成带有 IL-2 wt C125A (SEQ ID NO. 74)、IL-2 突变体 1~4、IL-2 复合物 1~4 (IL-2 复合物中 IL-2 Pair 1~4 和 CD25-ECD Pair 1~4) 的基因，然后或按照《分子克隆》提到的操作方法，进行重叠 PCR 得到目的片段。然后进行片段和 pTT5 通用载体的重组连接、转化 DH10B、测序和保菌，从而得到需要的 IL-2 wt(C125A)，IL-2 突变体 1~4 和 IL-2 复合物 1~4 的质粒（IL-2 复合物中 IL-2 Pair 1~4 的质粒和 CD25-ECD Pair 1~4 的质粒）；或按照《Agilent QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit》提到的操作方法，进行 PCR、DpnI 消化、转化 DH10B、测序和保菌，从而得到需要的 IL-2 wt(C125A)，IL-2 突变体 1~4 和 IL-2 复合物 1~4 的质粒。

1.2 质粒提取及 HEK293 细胞准备

1.2.1 质粒提取

按照《Qiagen Mini-prep Kit》和《Qiagen Endofree Maxi-prep Kit》提到的操作方法，进行 IL-2 wt(C125A)，IL-2 突变体 1~4 和 IL-2 复合物 1~4 的质粒的制备。

1.2.2 HEK293 细胞准备

新鲜传代的密度为 $1-1.2 \times 10^6/\text{ml}$ 的 HEK293 细胞（National Research Council, Canada）用于瞬时表达。

1.3 HEK293 瞬时表达

1.3.1 试剂制备

A) G418 溶液：称取 250mg Geneticin™ 加入 4.5ml 超纯水溶解，超纯水定容至 5ml，0.22um 滤膜过滤，-20℃ 保存；

B) PEI 溶液：称取 50mg PEI 加入 45ml 超纯水溶解，1M NaOH 调节 pH 至 7.0，超纯水定容至 50ml，0.22um 滤膜过滤，-20℃ 保存；

C) 培养基：在 1L FreeStyle™ 293 Expression Medium 中加入 10ml Pluronic™ F-68 和 500ul G418；

D) 质粒提前准备在 2ml 去内毒素离心管中；

E) 根据转染需要体积准备好新鲜传代至 $1-1.2 \times 10^6$ 个/ml 的细胞悬液。

1.3.2 配制转染试剂-质粒复合物

A 液：质粒 1ug/ml + Opti-MEM™ 33.3ul/ml

B 液：PEI 2ug/ml + Opti-MEM™ 33.3ul/ml

将 B 液倒入 A 液混匀孵育 10 min 后，加入细胞悬液。

转染中，IL-2 wt(C125A)，IL-2 突变体 1~4 的质粒分别单独转染；IL-2 复合物 1~4 的质粒，是将两种质粒混合后，进行转染。

1.3.3 换液

在 115rpm，36.8℃，5% CO₂ 培养 4h 后，800g 5min 离心，换成未添加 F68 和 G418 的 FreeStyle™ 293 Expression Medium

1.3.4 表达培养和收获

在 115rpm，36.8℃，5% CO₂ 培养 5 天后，离心 8500rpm 15min，收集细胞上清。

1.4 纯化制备

所有 IL-2 相关的衍生物 C 端都带有 HPC4 标签，因此可以用偶联有 HPC4 抗体的填料进行亲和纯化，然后再经过凝胶过滤层析（superdex200）进行进一步纯化得到纯度较高的蛋白。按照《分子克隆》描述的方法进行 SDS-PAGE 分

析。

结果如图 1 所示，表明质粒转染细胞后，都生成了 IL-2 wt(C125A)，IL-2 突变体 1~4 和 IL-2 复合物 1~4 相应的蛋白和复合物，质粒构建及蛋白表达及纯化成功。

实施例 2 通过生物膜干涉技术 (biolayer interferometry, BLI) 测定 IL-2 wt(C125A)，IL-2 突变体 1~4 和 IL-2 复合物 1~4 分别与 IL2R $\beta\gamma$ 和 IL2R α 的亲合力

1、实验材料

实验所用蛋白均为北京志道生物科技有限公司生产，IL2R α -his（购自北京志道生物科技有限公司），IL2R $\beta\gamma$ -Fc（购自北京志道生物科技有限公司）以及 IL2 突变体通过 HEK293 瞬时表达以及亲和纯化后获得。缓冲液配方：10mM HEPES，150mM 氯化钠，3 mM EDTA，0.1% BSA 和 0.05% 吐温 20；ProA 传感器（Pall Fortebio 公司，货号#18-5010）；HISIK 传感器（Pall Fortebio 公司，货号#18-5120）；BLI 设备为 Pall Fortebio 公司生产的 Octet RED96；数据获取和分析工作分别采用 Data acquisition 11.0 和 Data analysis 11.0 软件进行。

2、实验方法

1) IL2R $\beta\gamma$ -Fc 准备

用缓冲液稀释 IL2R $\beta\gamma$ -Fc 至浓度 10ug/ml，加入 96 孔测定板第 2 列，控制程序中设为 Loading，600s。

2) IL2R α -his 准备

用缓冲液稀释 IL2R α -his 至浓度 10ug/ml，加入 96 孔测定板第 3 列，控制程序中设为 Loading，600s。

3) 样品准备

用缓冲液将 IL-2 衍生物稀释到 100nM，然后 1:1 向下系列稀释 6 个梯度（共 7 个梯度）至浓度为 1.625 nM 以及 0 浓度，分别加入 96 孔测定板 5-9 列，控制程序中设定为 Association，200s。在 96 孔测定板第 1，4，10，11 列加入缓冲液，12 列加入 PH1.7 的甘氨酸，上述样品和溶液的加样量均为 200ul。

4) 检测与 IL2R $\beta\gamma$ -Fc 的亲合力

取 8 个 ProA 传感器分别置于传感器支架第 1 列的 A-H，在 Data acquisition 11.0 软件中将检测条件设置如下：1 预湿：Baseline, 60s, 位置：第 1 列。2 循环检测：第 2 列：loading, 600s；第 4 列：Baseline1, 60s；样品 5-9 列：Association, 200s，第 10 列：Dissociation, 600s；第 11 列：中和；第 12 列：再生。

5) 检测与 IL2R α 的结合

取 8 个 HISIK 传感器分别置于传感器支架第 2 列的 A-H，在 Data acquisition

11.0 软件中将检测条件设置如下：1 预湿：Baseline, 60s, 位置：第 1 列。2 循环检测：第 3 列：loading, 600s；第 4 列：Baseline1, 60s；样品 5-9 列：Association, 200s，第 10 列：Dissociation, 600s；第 11 列：中和；第 12 列：再生。

6) 数据分析

使用 Data analysis 11.0 软件对数据进行分析。以 0 浓度为对照扣减背景，通过 Fitting curve 计算 KD 值。

3、结果

如图 2 所示，从 IL-2 衍生物与 IL2R α 受体结合曲线上看，除了 IL-2 突变体 1 大大减弱了与 IL2R α 受体的结合外，其余 IL-2 衍生物几乎都不与其结合；如图 3 所示，从 IL-2 衍生物与 IL2R $\beta\gamma$ 受体结合曲线上看，和 IL-2wt C125A 相比，都没有显著变化（图 3）。

实施例 3 促进 T 细胞的增殖实验

CTLL-2(T 细胞)的增殖实验是普遍应用的细胞水平测定白介素刺激免疫细胞活性的实验。因此，此处通过 CTLL-2 细胞的增殖实验来查看 IL-2 衍生物的生物活性。

1) CTLL-2 细胞准备：将细胞用含有 FBS 和 Rat-T-Stim 的培养液重悬起来。

2) 加样：将细胞接种于 96 孔培养板，每孔 0.1 ml。同时将待测样品 IL-2 衍生物 11、18、21 和 28 的蛋白（即实施例 1 中制备的蛋白）分别做倍比稀释，每孔加入 0.1 ml，每个稀释浓度均设 3 复孔。另设培养液对照孔（100 μ l 细胞 + 100 μ l 培养液）。37 度，5%CO₂ 孵育 72 小时。

3) MTS 加入：每孔加入 20 μ l CellTiter96® Aqueous One Solution Reagent，37 度，5%CO₂ 孵育 2~4 小时。

4) 测定：用酶标测定仪于波长 490 nm 测吸光值 (A) 并计算 EC50 值。

5) 结果：挑选的具有代表性的 IL-2 复合物 2 和 IL-2 突变体 4，他们都具有 CTLL-2(T 细胞)的增殖活性，说明没有严重影响 β 和 γ 受体亚基复合物的信号传导功能（图 4）。