

增殖免疫细胞的IL-2突变体蛋白

技术领域

本发明涉及蛋白质工程领域。具体地说，本发明涉及新颖的白介素-2 (IL-2)突变体及其制备方法，所述白介素-2(IL-2)突变体相比于野生型 IL-2 原始蛋白与其结合伴侣 IL-2 受体 α 亚基的结合能力降低，但其保留了与 IL-2 受体 β 亚基和 IL-2 受体 γ 亚基的结合能力，以及相应生物学活性，可以更好地刺激肿瘤免疫细胞，包括但不限于 T 效应细胞和 NK 细胞的增殖。

背景技术

白介素-2 (IL-2, Interleukin-2) 是免疫系统的一类细胞生长因子，能调控免疫系统中白血球的细胞活性，促进 Th0 和 CTL 的增殖，也参与抗体反应、造血和肿瘤监视。IL-2 通过结合 IL-2 受体(IL-2R)来介导其作用，IL-2R 是由 α 、 β 和 γ 三条链组成，其不同的联合能产生其对 IL-2 亲和力不同的受体形式：单独 IL-2R γ 链不能结合 IL-2， $\beta\gamma$ 链是中亲和力 IL-2R， $\alpha\beta\gamma$ 链是高亲和力 IL-2R。

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

IL-2 在体内扩增淋巴细胞群和提高这些细胞的效应器功能的能力赋予 IL-2 以抗肿瘤效果，使得 IL-2 免疫疗法对于某些转移性癌症是一种有吸引力的治疗选择。因此，高剂量 IL-2 治疗已被批准用于患有转移性肾细胞癌和恶性黑素瘤的患者。然而，IL-2 在免疫应答中具有双重功能，这在于它不仅介导效应细胞的扩充和活性，而且还至关重要地涉及维持外周免疫耐受。

与 IL-2 免疫疗法相关的是重组人 IL-2 治疗产生的副作用。接受高剂量 IL-2 治疗的患者经常经历严重的心血管、肺、肾、肝、胃肠、神经学、皮肤、血液和系统性不利事件，这需要密切监测和住院患者管理。大多数的这些副作用可由所谓的血管(或毛细血管)渗漏综合征(VLS)的形成解释，该综合征是血管通透性的病理学增加，导致多个器官中流体溢出(导致例如肺部和皮肤水肿以及肝细胞损伤)和血管内流体消减(导致血压降低和心率的补偿性升高)。已在患者中测试低剂量 IL-2 方案以避免 VLS，然而，这是以降低治疗结果为代价的。

肿瘤免疫是近年来一种有效治疗肿瘤的方法，通过 PD-1 或者 PD-L1 抑制剂，已经其他类似的免疫抑制剂如 CTLA-4, CD-47 抗体等实现体内 T 细胞及 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤。IL-2 是一种已知有效的 T 细胞及 NK 细胞促生长因子，但由于上述副作用限制了其应用。

细胞免疫治疗也是近年来一种有效治疗肿瘤或自身免疫疾病的方法。采集人体自身免疫细胞，经过体外培养，使其数量成千倍增多，靶向性杀伤功能增强，然后再回输到人体来杀灭血液及组织中的病原体、癌细胞、突变的细胞，打破免疫耐受，激活和增强机体的免疫

能力, 兼顾治疗和保健的双重功效。细胞因子诱导的杀伤细胞 (CIK) 疗法、树突状细胞 (DC) 疗法、DC+CIK 细胞疗法、自然杀伤细胞 (NK) 疗法、DC-T、CART、CAR-NK 细胞疗法等。在其体外扩增过程中往往会使用到 IL-2, 野生型 IL-2 同时扩增了非肿瘤杀伤的免疫细胞, 所以需要更有效扩增 CD8 等免疫细胞的 IL-2。

- 5 本领域已经采用数种办法来克服与 IL-2 免疫治疗相关的这些问题。例如, 将 IL-2 与某些抗 IL-2 单克隆抗体的组合以增强体内的 IL-2 治疗效果 (Kamimura 等, J Immunol 177, 306-14 (2006); Boyman 等, Science 311, 1924-27 (2006))。还可以各种方式突变 IL-2 来降低其毒性和/或提高其功效。例如, Hu 等 (Blood 101, 4853-4861 (2003), 美国专利公开号 2003/0124678) 用色氨酸取代 IL-2 位置 38 的精氨酸残基以消除 IL-2 的血管通透性活性。
- 10 Shanafelt 等 (Nature Biotechnol 18, 1197-1202 (2000)) 将天冬酰胺 88 突变为精氨酸增强对 T 细胞的选择性扩增, 减少扩增存在毒副作用的 NK 细胞扩增。Heaton 等 (Cancer Res 53, 2597-602 (1993); 美国专利第 5,229,109 号) 通过引入两种突变 Arg38Ala 和 Phe42Lys 来减少 NK 细胞分泌促炎性细胞因子。Gillies 等 (美国专利公开号 2007/0036752) 通过取代 IL-2 中的 3 个残基 (Asp20Thr, Asn88Arg 和 Gln126Asp) 以降低 VLS。Gillies 等 (W02008/0034473) 还通过氨基酸取代 Arg38Trp 和 Phe42Lys 突变体 IL-2 与 CD25 的界面, 从而降低与 CD25 的相互作用和 Timf 细胞活化以增强功效。出于同样的目的, Wittrup 等 (W02009/061853) 获得了对 CD25 的亲和力增加但不激活受体, 从而起拮抗剂作用的 IL-2 突变体。引入突变的目的是破坏与受体 β 亚基和/或 γ 亚基的相互作用。然而, 这些已知的 IL-2 突变体无一克服上文提及的与 IL-2 免疫治疗相关问题, 即诱导 VLS 导致的毒性, 诱导 AICD 导致的肿瘤耐受性和激活 Timf 细胞导致的免疫抑制。罗切格利卡特公司 (CN103492411A) 突变了 IL-2 中 F42A、Y45A 和 L72G 三个位点的氨基酸, 降低了 IL-2 蛋白对高亲和力 IL-2 受体的亲和力并保留所述突变体 IL-2 蛋白对中等亲和力 IL-2 受体的亲和力, 但同时所得 IL-2 突变体的生物学活性也降低。例如, 迈阿密大学 (CN107074967A) 构建了一种融合蛋白, 该融合蛋白包含白介素-2 或其功能变体或片段的第一多肽和与第一多肽开放读框融合的第二多肽, 其中第二多肽包含白介素-2 受体 α (IL-2R α) 的胞外结构域或其功能变体或片段, 且其中所述融合蛋白具有 IL-2 活性。所构建融合蛋白通过自身结合的方式消除了 IL-2 对细胞表面高亲和力的 IL-2R α 结合作用, 但该融合蛋白可能存在自体或不同分子间的相互结合, 易产生多聚体, 不利于生产及质量控制; 该融合蛋白体内存在结合和解离平衡, 不能真正完全消除对细胞表面高亲和力的 IL-2R α 结合作用, 仍可能与细胞表面 IL-2R α 结合。

30

因此, 本领域存在改善 IL-2 疗效, 稳定简便生产增强型 IL-2 多肽的需求。

发明内容

- 35 本发明的目的在于提供一种新颖的 IL-2 突变体。相比于野生型 IL-2, 本发明的 IL-2 突变体能够克服与 IL-2 免疫治疗相关的问题, 但仍能保留所需的生物学活性。

在第一方面，本发明提供一种 IL-2 突变体，与野生型 IL-2 相比，所述 IL-2 突变体的氨基酸残基发生突变，从而使得 IL-2 与其受体的结合能力发生改变；所述 IL-2 突变体对高亲和力 IL-2 受体的亲和力消除或降低并基本上保留对中等亲和力 IL-2 受体的亲和力。

在优选的实施方式中，所述高亲和力 IL-2 受体是 IL-2 受体的异型三聚体形式，其由受体 α 亚基、受体 β 亚基和受体 γ 亚基组成；所述中等亲和力 IL-2 受体是仅包含 IL-2 受体 β 亚基和 IL-2 受体 γ 亚基而无 IL-2 受体 α 亚基。

在优选的实施方式中，与野生型 IL-2 相比，所述 IL-2 突变体与高亲和力 IL-2 受体的结合亲和力降低 55% 以上，更优选 60% 以上、65% 以上、70% 以上、75% 以上、80% 以上、85% 以上、90% 以上、95% 以上、96% 以上、97% 以上、98% 以上、99% 以上，最优选所述 IL-2 突变体与高亲和力 IL-2 受体不结合；

所述 IL-2 突变体与中等亲和力 IL-2 受体的结合亲和力是野生型 IL-2 与中等亲和力 IL-2 受体的结合亲和力的 50% 以上，更优选 60% 以上、70% 以上、80% 以上、90% 以上、95% 以上；最优选地，所述 IL-2 突变体与中等亲和力 IL-2 受体的结合亲和力与野生型 IL-2 与中等亲和力 IL-2 受体的结合亲和力相当。

在优选的实施方式中，所述 IL-2 突变体保留激活肿瘤免疫细胞，包括但不限于 T 效应细胞和 NK 细胞的增殖作用。

在具体的实施方式中，所述 IL-2 突变体在对应于野生型 IL-2 的以下一个或多个位点发生氨基酸残基突变：39、49、73 和 109。

在优选的实施方式中，所述 IL-2 突变体在对应于野生型 IL-2 的以下任一位点发生氨基酸残基突变：39、49、73 和 109。

在优选的实施方式中，所述 IL-2 突变体仅在对应于野生型 IL-2 的 39 位发生氨基酸残基突变。

在优选的实施方式中，所述 IL-2 突变体在对应于野生型 IL-2 的 39 位氨基酸残基和任意的以下一个或多个位点发生氨基酸残基突变：49、73 和 109；

所述 IL-2 突变体在对应于野生型 IL-2 的 49 位氨基酸残基和以下的一个或多个位点发生氨基酸残基突变：39、73 和 109；

所述 IL-2 突变体在对应于野生型 IL-2 的 73 位氨基酸残基和以下的一个或多个位点发生氨基酸残基突变：39、49 和 109；

所述 IL-2 突变体在对应于野生型 IL-2 的 109 位氨基酸残基和以下的一个或多个位点发生氨基酸残基突变：39、49 和 73。

在优选的实施方式中，所述 IL-2 突变体在对应于野生型 IL-2 的 39、49、73 和 109 位中的 1 个、2 个、3 个或 4 个发生突变。

在优选的实施方式中，所述 IL-2 突变体在野生型 IL-2 中发生一个或多个以下氨基酸残基突变：M39D、M39E、M39Q、M39N、M39A、K49N、A73T、A73S 和 D109N。

在优选的实施方式中，所述 IL-2 突变体在野生型 IL-2 中发生以下氨基酸残基突变单点：M39D、M39E、M39Q、M39N 或 M39A；优选 M39D、M39E、M39Q 或 M39N；更优选 M39D、

M39E 或 M39Q; 更优选 M39D 或 M39E; 最优选 M39D。

在优选的实施方式中, 所述 IL-2 突变体消除了 O 糖位点。

在优选的实施方式中, 所述 IL-2 突变体在对应于野生型 IL-2 的 3 位发生突变, 从而消除 O 糖位点。

5 在优选的实施方式中, 所述 IL-2 突变体在对应于野生型 IL-2 蛋白的 3 位发生以下氨基酸残基突变: T3A、T3G、T3Q、T3E、T3N、T3D、T3R、T3K 和 T3P; 优选 T3A。

在优选的实施方式中, 所述 IL-2 突变体突变了 125 位 cys 位点: C125L、C125S、C125A; 优选 C125S。

10 在第二方面, 本发明提供一种融合蛋白或缀合物, 所述融合蛋白或缀合物包含第一方面所述的 IL-2 突变体和非 IL-2 功能部分。

在优选的实施方式中, 非 IL-2 功能部分选自下组:

Fc 片段, 包括但不限于: 人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 的 Fc 片段, 及其同源性在 90% 以上的 Fc 片段突变体;

15 人血清白蛋白(HSA);

抗 HSA 抗体或抗体片段;

转铁蛋白;

人绒毛膜促性腺激素 β 亚基羧基末端肽(CTP);

类弹性蛋白多肽(elastin-like peptide, ELP);

20 抗原结合部分。

在优选的实施方式中, 所述抗原结合部分是:

抗体或其活性抗体片段;

Fab 分子、scFv 分子和 VHH 分子; 或

细胞受体或配体。

25 在优选的实施方式中, 所述融合蛋白中的 IL-2 突变体与非 IL-2 功能部分可以直接连接, 也可以通过连接物连接; 所述连接物可以是 AAA 或 GS 的重复序列, 包括但不限于 G_3S 的重复序列或 G_4S 的重复序列; 例如 $(G_3S)_4$ 。

在优选的实施方式中, 所述 IL-2 突变体或融合蛋白可以进一步作以下修饰形成缀合物:

聚乙二醇修饰 (PEG 化);

30 聚唾液酸化修饰 (PSA 化);

饱和脂肪酸修饰;

透明质酸修饰(Hyaluronic acid, HA);

聚氨基酸修饰 (proline-alamine-serine polymer, PAS 化)。

35 在第三方面, 本发明提供一种多核苷酸, 所述多核苷酸编码第一方面所述的 IL-2 突变体或第二方面所述的融合蛋白或缀合物。

在第四方面，本发明提供一种表达载体，所述表达载体包含第三方面所述的多核苷酸。

5 在第五方面，本发明提供一种宿主细胞，所述宿主细胞包含第四方面所述的表达载体，或者所述宿主细胞的基因组整合有第三方面所述的多核苷酸。

在优选的实施方式中，所述宿主细胞为真核细胞；优选酵母、昆虫细胞、动物细胞；可以是哺乳动物细胞。

10 在第六方面，本发明提供一种无细胞表达方式，所述表达系统包含第四方面所述的表达载体。

在第七方面，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物包含第一方面所述的 IL-2 突变体蛋白或第二方面所述的融合蛋白或缀合物与药学上可接受的辅料。

15 在第八方面，本发明提供第一方面所述的 IL-2 突变体或第二方面所述的融合蛋白在制备用于体外扩增 T 淋巴细胞、自然杀伤 NK 细胞或用于治疗个体的疾病的药物的用途。

在优选的实施方式中，所述疾病是应用 IL-2 作免疫治疗的疾病。

在优选的实施方式中，所述疾病是癌症、免疫疾病、人类免疫缺陷病毒 HIV 感染、丙型肝炎病毒 HCV 感染、风湿性关节炎，特应性皮炎等。

20 在优选的实施方式中，所述癌症、免疫疾病、人类免疫缺陷病毒 HIV 感染、丙型肝炎病毒 HCV 感染、风湿性关节炎，特应性皮炎等通过刺激免疫系统或通过增殖免疫细胞来治疗。

25 在第九方面，本发明提供第一方面所述的 IL-2 突变体或第二方面所述的融合蛋白，用于体外扩增 T 淋巴细胞、自然杀伤 NK 细胞或治疗个体的疾病。

在优选的实施方式中，所述疾病是应用 IL-2 作免疫治疗的疾病。

在优选的实施方式中，所述疾病是癌症、免疫疾病、人类免疫缺陷病毒 HIV 感染、丙型肝炎病毒 HCV 感染、风湿性关节炎，特应性皮炎等。

30 在优选的实施方式中，所述癌症是通过刺激免疫系统或通过增殖免疫细胞来治疗的癌症。

在第十方面，本发明提供一种治疗方法，包括将第一方面所述的 IL-2 突变体蛋白或第二方面所述的融合蛋白或缀合物或第六方面所述的药物组合物给予需要 IL-2 免疫治疗的患者的步骤。

35 在优选的实施方式中，所述治疗方法是通过刺激免疫系统或增殖免疫细胞来治疗癌症或免疫疾病、人类免疫缺陷病毒 HIV 感染、丙型肝炎病毒 HCV 感染、风湿性关节炎，特应

性皮炎等。

应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述
5 一一累述。

附图说明

- 图 1 显示了利用酶联免疫法检测的 IL-2 突变体与 CD25 的结合力;
- 图 2 显示了响应于 rhIL-2 和突变体白介素-2 (His 标签)的 CTLL-2 细胞增殖情况;
- 10 图 3 显示了响应于 rhIL-2 和突变体白介素-2 (Fc 标签)的 CTLL-2 细胞增殖情况;
- 图 4 显示了响应于 rhIL-2 和突变体白介素-2 (His 标签)的 NK92 细胞增殖情况;
- 图 5 显示了响应于 rhIL-2 和突变体白介素-2 (Fc 标签)的 NK92 细胞增殖情况;
- 图 6a-y 分别显示了序列 SEQ ID NO: 1-25;
- 图 7 a-l 分别显示了序列 SEQ ID NO: 26-37;
- 15 图 8A 和 8B 分别显示了 IL-2gm1-HSA、IL-2gm4-HSA、IL-2gm6-HSA、IL-2gm1a-HSA、
IL-2gm1b-HSA、IL-2gm1c-HSA, IL-2gm1d-HSA, 野生型 IL-2-HSA 与人 IL-2R α 亚基和人重
组 IL-2R $\beta\gamma$ 异二聚体的亲和力;
- 图 9 显示了 IL-2 突变体和野生型 IL-2 刺激 NK92 细胞增殖的情况;
- 图 10 显示了 IL-2 突变体诱导的 IFN- γ 释放; 其中, 图 10A 显示了在与不同浓度的
20 IL-2gm1-HSA、IL-2gm4-HSA 及野生型 IL-2-HSA 诱导 NK92 细胞刺激干扰素 γ 的释放; 图
10B 显示了在与不同浓度的 IL-2gm6-HSA 及野生型 IL-2-HSA 诱导 NK92 细胞刺激干扰素 γ
的释放;
- 图 11 显示了 IL-2gm6-HSA 及野生型 IL-2-HSA 对 NK 细胞和 Treg 细胞的增殖作用; 其
中, 图 11A 显示了在与不同浓度的 IL-2gm6-HSA 及野生型 IL-2-HSA 温育 6 天后 NK 细胞的
25 增殖情况; 图 11B 显示了在与不同浓度的 IL-2gm6-HSA 及野生型 IL-2-HSA 温育 6 天后 Treg
细胞的增殖情况; 和
- 图 12 显示了 IL-2gm1-HSA 及野生型 IL-2-HSA 对 NK 细胞和 CD4+T 细胞的增殖作用;
其中, 图 12A 显示, 在 0-500 nM 样品浓度刺激下, IL-2gm1-HSA 相对于野生型 IL-2-HSA
对 NK 细胞的刺激增殖作用明显增多; 图 12B 显示在 0-500 nM 浓度刺激条件下, IL-2gm1-HSA
30 相对于野生型 IL-2-HSA 对 CD4+T 细胞的刺激增殖作用均有明显减弱。

具体实施方式

- 发明人经过广泛而深入的研究, 出乎意料地发现对 IL-2 多肽作定点突变后发生糖基化
修饰的新型 IL-2 突变体多肽能够消除或降低 IL-2 蛋白对高亲和力 IL-2 受体的亲和力并保留
35 所述突变体 IL-2 蛋白对中等亲和力 IL-2 受体的亲和力, 同时保留了 IL-2 的生物学活性, 可
以更好地刺激肿瘤免疫细胞, 包括但不限于 T 效应细胞和 NK 细胞增殖, 达到治疗的目的。

在此基础上完成了本发明。

定点突变技术

定位突变是在已知蛋白质结构与功能的基础上，在已知 DNA 序列中取代、插入或删除
5 特定的核苷酸，从而产生具有新性状的突变蛋白分子的一种蛋白质工程技术。

定位突变技术可以改变蛋白的理化性质，例如，提高蛋白药物的稳定性；增强蛋白药物的溶解性能；改善生物学性质，包括但不限于改变酶对底物的专一性、提高酶的活性和改善亲和性、特异性，等等。

10 定点突变技术可以通过突变结合域的氨基酸达到提高或消除配体与受体，酶与底物之间的结合活性，这种突变改变的蛋白质的特性造成导致二级结构或高级结构和所带电荷等特性的变化。如果突变的氨基酸正好处于关键的抗原-抗体作用位点，那么该氨基酸变化很有可能导致该位点的电荷和二级结构或高级结构发生改变，配体与受体，酶与底物之间不能结合从而达到突变的目的。同时也导致原来的抗体不能识别这个位点，即形成了新的抗原。这是这种传统突变方法必然可能出现的。

15

本发明的 IL-2 突变体

在本发明中，通过定点突变使得 IL-2 多肽发生氨基酸残基，从而在改变 IL-2 多肽与 IL-2R 受体的结合模式。本发明的改变的 IL-2 突变体与 IL-2 受体的亲和力发生改变。在具体的实施方式中，本发明的 IL-2 突变体对高亲和力 IL-2 受体的亲和力消除或降低但对中等亲和力和 IL-2 受体的亲和力得到保留，同时保留了 IL-2 的生物学活性。因此，本发明的 IL-2 突变体不仅可以更好地刺激肿瘤免疫细胞，包括但不限于 T 效应细胞和 NK 细胞增殖，相比于野生型 IL-2，其副作用还显著降低，从而能够实现更好的治疗目的。

20 本发明的 IL-2 突变体或融合蛋白存在糖基化修饰的情况下，优选真核细胞表达，通过细胞培养获得。可以选择酵母，昆虫细胞，动物细胞，也可以选择转基因动物。在具体的实施方式中，所述宿主细胞为真核细胞；优选酵母、昆虫细胞、动物细胞；本发明的 IL-2 突变体或融合蛋白不存在糖基化修饰时，可以采用无细胞表达、大肠杆菌、酵母等表达，优选无细胞表达和酵母细胞。

当采用酵母细胞或昆虫细胞作为宿主细胞时，得到的 IL-2 突变体的糖型可能是非人的。本领域技术人员知晓可以进一步将非人糖型改造成人糖型。

30 在其它实施方式中，也可以使用原核细菌表达发酵或体外无细胞合成获得 IL-2 突变体，然后通过体外酶催化等方法获得正确糖基化的 IL-2 突变体。体内体外修饰方案均可以达到相同的目的，即 IL-2 的定点糖基化。

蛋白质的糖基化修饰及突变

35 蛋白质糖基化是复杂的翻译后修饰过程，在蛋白特定位点上糖基化修饰，通常修饰位点是天冬酰胺残基(N-链接)或是丝氨酸/苏氨酸残基(O-链接)，N-链接糖基化修饰通常发

生在 Asn-X-Ser/Thr (X 为非脯氨酸氨基酸, 称为 N 糖位点); O-链接糖基化修饰通常发生在丝氨酸 (Ser)或苏氨酸 (Thr)残基上 (称为 O 糖位点), 通过 N-乙酰半乳糖胺 (Gal-NAc)和 Ser/Thr 的羟基形成 O-糖苷键。相应地, 通过定点突变在野生型 IL-2 中引入的糖基化位点即人工糖基化位点。

- 5 本发明人通过人工引入糖基化突变在受体蛋白与配体蛋白之间结合面增加立体的空间结构, 使受体与配体无法直接接触。同时发现在某些点位发生突变时亦可在无糖基化修饰时也可以明显改变受体与配体的结合。本发明与之前多个氨基酸定点突变截然不同, 本发明明显减少了氨基酸的突变数量。传统的定点突变是改变多个氨基酸后蛋白质结合面的亲水或疏水区, 或改变其高级结构, 使两个蛋白接触后无法形成稳定的结合状态。而在本发明中, 糖基化突变后, 由于结合面被糖链破坏, 两个蛋白无法靠近, 在位点选择恰当的情况下, 其消除结合的能力远高于传统突变的方法, 或者仅改变一个氨基酸, 如 39 位氨基酸甲硫氨酸即可达到降低或消除配体受体间结合的目的。

- 具体地说, 本发明人在白介素 2 与白介素 2 受体的可能结合区域及其附近氨基酸序列选择突变点, 并且尽可能利用原有氨基酸序列中含有 ASN、Thr 或 Ser 的位点; 优先选择 Thr 或 Ser 的位点前两位的氨基酸突变, 以便突变点氨基酸在糖基化结束后会被糖链掩盖, 最大程度降低免疫原性。在 Asn 位点后突变 Thr 或 Ser 也是一种可行的方案。

39 位单点突变, 无论糖基化与否都能改变其与受体的结合能力, 由于其仅存在单点突变, 产生的潜在免疫原性极小。

- 传统上认为大分子氨基酸和包含复杂芳香环类的氨基酸的免疫原性较大, 多点突变则产生更明显的免疫原性。由于糖链分子量较大, 特别是 N 糖存在复杂的 2 天线、3 天线至 4 天线结构 (参见 Jonathan J. Lyons 等, Glycans instructing immunity: the emerging role of altered glycosylation in clinical immunology.Front. Pediatr., 11 June 2015), 所以在任何结合位点附近的突变都会影响两个蛋白之间的结合。

- 根据本发明的教导, 本领域技术人员知晓如何通过定点突变在野生型 IL-2 中引入较少的突变位点。为降低所得 IL-2 突变体的免疫原性, 本发明的 IL-2 突变体宜尽可能减少突变点数量并利用天然 IL-2 中已有的氨基酸残基产生新的糖基化位点, 从而使得得到的 IL-2 突变体的结构与天然 IL-2 更接近, 避免了突变对蛋白其它结构位点的影响, 保留的生物学活性。具体实施方式中, 在野生型 IL-2 的以下一个或多个位点 (即, 1 个、2 个、3 个或 4 个位点) 发生氨基酸残基突变: 39、49、73 和 109。在具体的实施方式中, 在野生型 IL-2 中发生以下一种或多种氨基酸残基突变: M39D、M39E、M39Q、M39N、M39A、K49N、A73T、A73S 和 D109N; 优选 M39D、M39E、M39Q、M39N 或 M39A 单点突变; 更优选 M39D、M39E、M39Q 或 M39N 单点突变; 更优选 M39D、M39E 或 M39Q 单点突变; 更优选 M39D 或 M39E 单点突变; 最优选 M39D 单点突变。

- 基于本领域的常规作法, 也可以消除 IL-2 多肽中原有的 O-糖位点, 去除 O 糖不影响 IL-2 生物学活性, O 糖结构复杂, 分析困难, 为了减少生产质控的复杂性, 通常可以利用基因工程突变技术消除该糖基化位点。因此, 本发明的 IL-2 突变体可以在对应于野生型 IL-2 蛋白

的3位发生以下氨基酸残基突变：T3A、T3G、T3Q、T3E、T3N、T3D、T3R、T3K和T3P；优选T3A。在IL-2基因产物的提纯和复性过程中，如二硫键配错或分子间形成二硫键都会降低IL-2的活性。现已有应用点突变，将第125号位半胱氨酸突变为亮氨酸或丝氨酸，使只能形成一种二硫键，保证了在IL-2复性过程的活性。还有报道用蛋白工程技术生产新型rIL-2，
5 将IL-2分子第125位半胱氨酸改为丙氨酸，改构后IL-2比活性比天然IL-2明显增加。因此，本发明的IL-2突变体可以在对应于野生型IL-2蛋白的125位发生以下氨基酸残基突变：C125L、C125A、C125S；优选C125S。

10 本发明的IL-2突变体蛋白消除或降低对高亲和力IL-2受体的亲和力，但能够基本上保留IL-2突变体对中等亲和力IL-2受体的亲和力。在本文中，“消除或降低”是指与原有水平相比（例如与野生型IL-2与高亲和力IL-2受体的亲和力相比），改变超过50%的情况。因此，本文所述的“消除或降低IL-2突变体对高亲和力IL-2受体的亲和力”是指与野生型IL-2蛋白相比，本发明的IL-2突变体与高亲和力IL-2受体的结合亲和力降低50%以上，更优选60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上，最优选所述IL-2突变体蛋白与高亲和力
15 IL-2受体不结合。类似地，本文所述的“基本上保留IL-2突变体对中等亲和力IL-2受体的亲和力”是指所述IL-2突变体与中等亲和力IL-2受体的结合亲和力是野生型IL-2与中等亲和力IL-2受体的结合亲和力的50%以上，更优选60%以上70%以上、80%以上、90%以上、95%以上。在优选的实施方式中，所述IL-2突变体与中等亲和力IL-2受体的结合亲和力于野生型IL-2与中等亲和力IL-2受体的结合亲和力相当。

20 此外，由于测试对象之间的个体差异非常大，本发明人发现现有技术中的一些IL-2突变体蛋白在不同的分子结构下或在不同的实验批次之间表现出的效果存在较大差异。例如在低浓度和高浓度下表现出的效果存在较大差异。然而，本发明的IL-2突变体在低浓度和高浓度下均能够表现出优异的技术效果。

25 “对应于”

本文所用的术语“对应于”具有本领域普通技术人员通常理解的意义。具体地说，“对应于”表示两条序列经同源性或序列相同性比对后，一条序列与另一条序列中的指定位置相对应的位置。因此，例如，“对应于野生型IL-2”表示将某条氨基酸序列与野生型IL-2的氨基酸序列进行比对，找到该氨基酸序列上与野生型IL-2相对应的位点。

30 本领域普通技术人员公知的测定序列同源性或相同性的方法包括但不限于：计算机分子生物学 (Computational Molecular Biology), Lesk, A.M.编, 牛津大学出版社, 纽约, 1988; 生物计算: 信息学和基因组项目 (Biocomputing: Informatics and Genome Projects), Smith, D.W.编, 学术出版社, 纽约, 1993; 序列数据的计算机分析 (Computer Analysis of Sequence Data), 第一部分, Griffin, A.M.和 Griffin, H.G.编, Humana Press, 新泽西, 1994; 分子生物学中的
35 的序列分析 (Sequence Analysis in Molecular Biology), von Heinje, G., 学术出版社, 1987 和序列分析引物 (Sequence Analysis Primer), Gribskov, M.与 Devereux, J.编 M Stockton Press,

纽约, 1991 和 Carillo, H.与 Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988)。测定相同性的优选方法要在测试的序列之间得到最大的匹配。测定相同性的方法编译在公众可获得的计算机程序中。优选的测定两条序列之间相同性的计算机程序方法包括但不限于: GCG 程序包 (Devereux, J.等, 1984)、BLASTP、BLASTN 和 FASTA (Altschul, S, F.等, 1990)。

- 5 公众可从 NCBI 和其它来源得到 BLASTX 程序 (BLAST 手册, Altschul, S.等, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S.等, 1990)。熟知的 Smith Waterman 算法也可用于测定相同性。

本发明的融合蛋白或缀合物

- 10 基于本发明的 IL-2 突变体, 本领域技术人员知晓可以将本发明的 IL-2 突变体与非 IL-2 的其它功能部分制成融合蛋白或缀合物。在本文中, 缀合物是指一种水溶性聚合物共价连接突变体 IL-2 多肽的残基。在具体的实施方式中, 所述非 IL-2 功能部分包括但不限于: Fc 片段、人血清白蛋白(HSA)、抗 HSA 抗体或抗体片段、转铁蛋白、人绒毛膜促性腺激素 β 亚基羧基末端肽(CTP)、类弹性蛋白多肽(elastin-like peptide, ELP)和抗原结合部分。
- 15 实施方式中, 所述抗原结合部分可以是抗体或其活性抗体片段, Fab 分子、scFv 分子和 VHH 分子、免疫球蛋白分子、受体蛋白分子或配体蛋白分子; 所述免疫球蛋白分子可以是 IgG 分子。

- 基于本领域的常规操作, 本领域技术人员知晓如何获得包含本发明的 IL-2 突变体的融合蛋白或缀合物。例如, 可以将本发明的 IL-2 突变体与其它非 IL-2 功能部分直接连接, 也可以通过连接物连接。所述连接物可以是 AAA 或 GS 的重复序列, 包括但不限于 G_3S 的重复序列或 G_4S 的重复序列; 例如(G_3S)₄。
- 20

- 进一步地, 还可以对所述 IL-2 突变体或融合蛋白缀合物聚乙二醇修饰 (PEG 化)、聚唾液酸化修饰 (PSA 化)、饱和脂肪酸修饰、透明质酸修饰(Hyaluronic acid, HA)或聚氨基酸修饰 (proline-alanine-serine polymer, PAS 化)形成缀合物。
- 25

本发明的药物组合物及其给药方式

- 在本发明的 IL-2 突变体的基础上, 本发明还提供了药物组合物。在具体的实施方式中, 本发明的药物组合物包含本发明的 IL-2 突变体或权利要求 5 所述的融合蛋白或缀合物以及任选的药学上可接受的辅料。
- 30

任选地, 本发明的组合物进一步包含一种药学上可接受的赋形剂。如果希望的话, 可以添加药学上可接受的赋形剂到本发明的 IL-2 突变体多肽、融合蛋白或缀合物中以形成一种组合物。

- 35 示例性赋形剂包括(但不限于)选自下组的那些赋形剂, 该组由以下各项组成: 糖、无机盐、抗微生物剂、抗氧化剂、表面活性剂、缓冲剂、酸、碱、氨基酸以及其组合。糖, 如糖、衍生化糖(如糖醇、醛糖酸、酯化糖和/或糖聚合物), 可以作为赋形剂存在。特定糖赋形剂

包括例如：单糖，如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等；二糖，如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等；多糖，如棉子糖、麦芽糊精、葡聚糖、淀粉等；以及糖醇，如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇(葡萄糖醇)、肌醇、环糊精等。

赋形剂还可以包括无机盐或缓冲剂，如柠檬酸、氯化钠、氯化钾、硫酸钠、硝酸钾、
5 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠以及其组合。

组合物还可以包括用于防止或遏制微生物生长的抗微生物剂。适合于本发明的一个或多个实施例的抗微生物剂的非限制性实例包括苯扎氯铵、苄索氯铵、苯甲醇、苯酚、苯乙醇、以及其组合。

抗氧化剂同样可以存在于组合物中。抗氧化剂用来防止氧化，由此防止蛋白、缀合物
10 或制剂的其他组分的变质。适用于本发明的一个或多个实施例的抗氧化剂包括例如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基苯甲醚、丁基化羟基甲苯、次磷酸、单硫代甘油、以及其组合。

表面活性剂可以作为赋形剂存在。示例性表面活性剂包括：聚山梨醇酯，如“吐温 20”和“吐温 80”，以及普朗尼克(pluronic)，如 F68 和 F88；脱水山梨糖醇酯；脂质，如磷脂(如卵磷脂和其他磷脂酰胆碱)、脂肪酸以及脂肪酯；类固醇，如胆固醇。

15 酸或碱可以作为赋形剂存在于组合物中。可以使用的酸的非限制性实例包括选自下组的那些酸，该组由以下各项组成：盐酸、乙酸、磷酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸、三氯乙酸、硝酸、高氯酸、磷酸、硫酸、富马酸以及其组合。适合碱的实例包括(但不限于)选自下组的碱，该组由以下各项组成：氢氧化钠、乙酸钠、氢氧化铵、氢氧化钾、乙酸铵、乙酸钾、磷酸钠、磷酸钾、柠檬酸钠、甲酸钠、硫酸钠、硫酸钾、富马酸钾以及其组合。

20 在此描述了一种或多种可以在组合物中作为赋形剂存在的氨基酸。在此方面，示例性氨基酸包括精氨酸、赖氨酸以及甘氨酸。

组合物中的缀合物(即活性剂与聚合物试剂之间形成的缀合物)的量将视多个因素而变化，但将组合物储存于一个单位剂量容器(例如一个小瓶)中时最佳将是治疗有效剂量。另外，可以将药物制剂收纳在一个注射器中。治疗有效剂量可以通过反复施用渐增量的药物以便确
25 定哪一个量产生临床上所希望的终点来实验地确定。

组合物中任何单独赋形剂的量将根据赋形剂的活性和组合物的特定需要而变化。典型地，任何单独赋形剂的最佳量通过常规实验确定，即通过制备包含不同量的赋形剂(范围从低到高)的组合物，检查稳定性和其他参数，并且接着确定在没有显著不利作用的情况下获得最佳性能的范围。

30 然而，总体上，赋形剂将在组合物中以赋形剂的约 1 重量% 到约 99 重量%、优选地从约 5 重量% 到约 98 重量%、更优选地从约 15 到约 95 重量% 的量存在，并且最优选的是浓度小于 30 重量%。

这些组合物涵盖所有类型的制剂以及尤其适合于注射的那些制剂，例如可以被重构的散剂或冻干剂以及液体剂。适合用于在注射之前重构固体组合物的稀释剂的实例包括注射用
35 抑菌水、水中的 5% 右旋糖、磷酸盐缓冲生理盐水、无菌水、去离子水以及其组合。就液体药物组合物来说，设想溶液剂和混悬剂。

本发明的一个或多个实施例的组合物典型地(不过未必)通过注射施用,并且因此在即将施用之前总体上是液态溶液剂或混悬剂。药物制剂还可以采取其他形式,如糖浆剂、乳膏剂、软膏剂、片剂、散剂等。还包括其他施用模式,如经肺、经直肠、经皮、经粘膜、经口、鞘内、瘤内、瘤周、腹膜内、皮下、动脉内等等。

5 本发明还提供一种用于治疗有响应的病状的一位患者施用治疗有效量剂量的方法。可以注射物(例如肌肉内、皮下以及非经肠)。适合用于非经肠施用的制剂类型尤其包括注射即用型溶液剂、在使用之前与一种溶剂组合的干散剂、注射即用型混悬剂、在使用之前与一种溶媒组合的干燥不溶性组合物以及在施用之前稀释的乳剂和液体浓缩剂。

施用方法可以用来治疗可以通过施用该突变体蛋白、融合蛋白或缀合物来治疗或预防
10 的任何病状。本领域普通技术人员了解一种特定组合物可以有效治疗哪些病状。例如,治疗罹患选自下组的一种疾病的患者,该组由以下各项组成:肾细

胞癌、转移性黑素瘤、丙型肝炎病毒(HCV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、急性髓样白血病、非霍奇金淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤、幼年型类风湿性关节炎、特应性皮炎、乳腺癌以及膀胱癌。

15 待施用的实际剂量将根据受试者的年龄、体重和整体状况以及所治疗病状的严重性、卫生保健专业判断而变化。治疗有效量是本领域的普通技术人员已知的和/或在相关参考文本和文献中描述。总体上,治疗有效量将范围从约 0.001 mg 到 1000 mg,优选地处于从每天 0.01 mg 到每天 100 mg 的剂量内并且更优选地处于从每天 0.10 mg 到每天 50 mg 的剂量内。可以定期施用一种给定剂量直到例如有机磷酸酯中毒的症状减轻和/或完全消除。

20 视临床医师的判断、患者的需要等等而定,可以以多种投用时程施用单位剂量。特定给药时程将是本领域普通技术人员已知的或可以使用常规方法以实验方式测定。示例性给药时程包括(但不限于)每天两次、每天一次、每周三次、每周两次、每周一次、每月两次、每月一次施用以及其任何组合。一旦已实现临床终点,就暂停组合物的给药。

应了解,虽然已结合本发明的优选特定实施例描述本发明,但前述说明以及随后的实
25 例意在说明而不是限制本发明的范围。对于本发明所属领域的普通技术人员来说,本发明范围内的其他方面、优点以及修改将是显而易见的。

本发明的 IL-2 突变体的用途以及使用方法

如上所述,本发明的 IL-2 突变体能够消除或降低 IL-2 蛋白对高亲和力 IL-2 受体的亲和力并保留所述突变体 IL-2 蛋白对中等亲和力 IL-2 受体的亲和力,同时保留了 IL-2 的生物学
30 活性,从而更好地刺激肿瘤免疫细胞,包括但不限于 T 效应细胞和 NK 细胞增殖。因此,本发明的 IL-2 突变体、融合蛋白、缀合物或药物组合物可以制备成相应的药物。所述药物可以用于体外扩增 T 淋巴细胞、自然杀伤 NK 细胞或治疗利用 IL-2 作免疫治疗的疾病。在具体的实施方式中,所述疾病是癌症;例如,需要通过刺激免疫系统或通过增殖免疫细胞来治疗的
35 的癌症。在具体的实施方式中,所述疾病是也可以是免疫疾病、人类免疫缺陷病毒 HIV 感染、丙型肝炎病毒 HCV 感染、风湿性关节炎,特应性皮炎等。

本发明亦可以作为 CAT-T、CAR-NK 等细胞治疗过程中体外扩增细胞中替代野生型 IL-2 使用。

本发明的优点：

- 5 1. 本发明的 IL-2 突变体蛋白降低或消除了与高亲和力 IL-2 受体的亲和力并基本上保留与中等亲和力 IL-2 受体的亲和力；
2. 本发明的 IL-2 突变体的结构与天然 IL-2 更接近，避免了突变对蛋白其它结构位点的影响，保留了生物学活性；
3. 相比于现有技术中的其它 IL-2 突变体，本发明的 IL-2 突变体的免疫原性更低；
- 10 4. 本发明的 IL-2 突变体的分子设计简单，便于在不同分子上应用；
5. 本发明的 IL-2 突变体便于生产和质量控制，一般不需要体外再修饰的过程，减少步骤提高生产效率；
6. 本发明的 IL-2 突变体便于与其它分子组成双功能或多功能的融合蛋白或免疫组合物；和
- 15 7. 本发明的 IL-2 突变体可以用于免疫治疗，但不会导致天然 IL-2 导致的血管(或毛细血管)渗漏综合征(VLS)。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如
20 Sambrook 等人，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。

实施例

实施例 1. 突变体白介素-2 (IL-2)蛋白的合成

25 1. 基因合成

将编码白介素-2(IL-2)蛋白的突变体氨基酸序列的核苷酸序列通过自动化基因合成的方法获得。部分实施例中，基因片段末端添加 HIS 标签有利于纯化；部分实施例中，基因片段末端添加 IgG1-Fc 有利于纯化，同时 Fc 标签也是一种常见的延长蛋白药物半衰期的手段。基因片段侧翼带有单一限制性内切酶切割位点。所有基因合成序列均设计为具有编码前导肽
30 的 5'端 DNA 序列，该前导肽在真核细胞中使蛋白质靶向分泌。

突变个数	突变位点	实施例突变体名称	蛋白标签	序列
2	3、39	IL-2gm1 (T3A, M39N)	HIS	SEQ ID NO: 1
2	3、39	IL-2gm1 (T3A, M39N)	HSA	SEQ ID NO: 2
2	3、49	IL-2gm2 (T3A, K49N)	HIS	SEQ ID NO: 3
2	3、73	IL-2gm3 (T3A, A73T)	HIS	SEQ ID NO: 4
2	3、73	IL-2gm3 (T3A, A73S)	HIS	SEQ ID NO: 5
2	3、109	IL-2gm7 (T3A, D109N)	HIS	SEQ ID NO: 6

3	3、39 和 49	IL-2gm8 (T3A, M39N, K49N)	HIS	SEQ ID NO: 7
3	3、49 和 73	IL-2gm4 (T3A, K49N, A73T)	HIS	SEQ ID NO: 8
3	3、49 和 73	IL-2gm4 (T3A, K49N, A73T)	IgG1-Fc	SEQ ID NO: 9
3	3、39 和 73	IL-2gm9 (T3A, M39N, A73T)	HIS	SEQ ID NO: 10
3	3、39 和 109	IL-2gm10 (T3A, M39N, D109N)	HIS	SEQ ID NO: 11
3	3、49 和 109	IL-2gm11 (T3A, K49N, D109N)	HIS	SEQ ID NO: 12
3	3、73 和 109	IL-2gm12 (T3A, A73T, D109N)	HIS	SEQ ID NO: 13
4	3、39、49、73	IL-2gm5 (T3A, M39N, K49N, A73T)	HIS	SEQ ID NO: 14
4	3、39、49、73	IL-2gm5 (T3A, M39N, K49N, A73T)	IgG1-Fc	SEQ ID NO: 15
4	3、49、73、109	IL-2gm13 (T3A, K49N, A73T, D109N)	HIS	SEQ ID NO: 16
4	3、39、73、109	IL-2gm14 (T3A, M39N, A73T, D109N)	HIS	SEQ ID NO: 17
4	3、39、49、109	IL-2gm15 (T3A, M39N, K49N, D109N)	HIS	SEQ ID NO: 18
5	3、39、49、73、109	IL-2gm6 (T3A, M39N, K49N, A73T, D109N)	HIS	SEQ ID NO: 19
5	3、39、49、73、109	IL-2gm6 (T3A, M39N, K49N, A73T, D109N)	IgG1-Fc	SEQ ID NO: 20
5	3、39、49、73、109	IL-2gm6 (T3A, M39N, K49N, A73T, D109N)	HSA	SEQ ID NO: 21
4	3、42、45、72	IL-2qm(T3A,F42A,Y45A,L72G)	IgG1-Fc	SEQ ID NO: 22 罗切格利卡特公司 (CN103492411B)

2. 质粒构建

将合成后的基因亚克隆到 pcDNA3.4 质粒中, 方法依照制造商用法说明书使用分子生物学试剂。

5

3. 突变体白介素-2 (IL-2)蛋白的表达

采用 Expi293F 细胞 (Thermo Fisher Scientific)进行质粒的转染, 细胞在 37°C, 8% CO₂ 的摇床(VWR Scientific)中进行培养, 转染前一天接种于摇瓶(Corning Erlenmeyer Flasks)中, 转染方法依照制造商用法说明书进行。

10

分别收集第二天, 第四天和第五天的细胞上清悬液进行蛋白质印迹实验, 确认蛋白表达。

实施例 2. CD25 蛋白的表达

基因合成

将编码 CD25 蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO: 23)的核苷酸序列通过自动化基因合成的方法获得。SEQ ID NO: 24(GGGSGGGSGGGSGGGS)为连接物的氨基酸序列。部分实施例中, 基因片段通过连接物与 IgG1-Fc 共同表达, 有利于纯化。基因片段侧翼带有单一限制性内切酶切割位点。所有基因合成序列均设计为具有编码前导肽的 5'端 DNA 序列, 该前导肽在真核细胞中使蛋白质靶向分泌。SEQ ID NO: 25 给出了例示性前导肽序列。将合成后的基因亚克隆到 pcDNA3.4 质粒中, 方法依照制造商用法说明书使用分子生物学试剂。

采用 Expi293F 细胞 (Thermo Fisher Scientific)进行质粒的转染, 细胞在 37°C, 8% CO₂ 的摇床 (VWR Scientific)中进行培养, 转染前一天接种于摇瓶(Corning Erlenmeyer Flasks)中, 转染方法依照制造商用法说明书进行。

10 分别收集第二天, 第四天和第五天的细胞上清悬液进行蛋白印迹实验, 确认蛋白表达。

实施例 3. 利用 ELISA, Fortebio 或 biacore 检测结合 CD25 的亲合力实验

本发明人利用酶联免疫法检测 IL-2 突变体与 CD25 的结合力。

将 CD25 (来源于实施例 2)包被到 96 孔高吸附微孔板 (3590, Costar)中, 洗涤后封闭。
15 将待测样品稀释到适当浓度, 加入到孔中。TMB 显色, 酶标仪 (M5, Molerlder Devies), 波长为 450/650nm, 读取各孔信号值。rhIL-2 为注射用重组人白介素-2 (泉奇)。

表 1. rhIL-2 与 IL-2 突变体和 CD25 结合活性概述

浓度 (ug/ml)	结合活性 (%)		
	1	0.2	0.04
IL-2gm1	0.88%	1.08%	1.66%
IL-2gm2	30.99%	31.26%	16.64%
IL-2gm3	10.33%	5.62%	2.27%
IL-2gm4	14.79%	7.50%	3.18%
IL-2gm5	0.88%	1.08%	1.51%
IL-2gm6	0.88%	1.08%	1.36%
IL-2gm7	8.10%	2.96%	1.82%
IL-2gm8	0.74%	0.99%	1.51%
IL-2gm9	0.88%	1.18%	1.51%
IL-2gm10	0.88%	1.08%	1.51%
IL-2gm11	12.49%	5.03%	2.42%
IL-2gm12	2.77%	1.48%	1.97%
IL-2gm13	2.23%	1.18%	1.51%
IL-2gm14	0.74%	0.99%	1.51%
IL-2gm15	0.68%	0.99%	1.36%

IL-2qm	0.74%	0.99%	1.51%
rhIL-2	100.00%	100.00%	100.00%

注：IL-2gm 各浓度点结合活性是以 rhIL-2 (结合活性 100%)作为对照。

结果示于图 1。从图中可以看出，实验浓度下，能明显看到 rhIL-2 是有结合的，且结合活性有剂量相关性的结合大小比较： rhIL-2 > IL-2gm2 > IL-2gm4 > IL-2gm11 > IL-2gm3 > IL-2gm7 > IL-2gm12 > IL-2gm13。在这些浓度下，没有剂量相关性的，可以判定为没结合，包括 IL-2gm1、IL-2gm5、IL-2gm6、IL-2gm8、IL-2gm9、IL-2gm10、IL-2gm14、IL-2gm15、IL-2qm (CN103492411A)。证明 IL-2gm1、IL-2gm5、IL-2gm6、IL-2gm8、IL-2gm9、IL-2gm10、IL-2gm14、IL-2gm15 完全失去了与 CD25 的结合能力；IL-2gm2、IL-2gm4、IL-2gm11、IL-2gm3、IL-2gm7、IL-2gm12、IL-2gm13 失去了部分与 CD25 的结合能力。

10 **实施例 4. 利用 CTLL2 细胞进行细胞增殖分析**

在本实施例中，发明人利用 CTLL2 细胞在细胞增殖分析中评估了 rhIL-2 以及实施例 1 中的突变体白介素-2 的活性。

实验板中接种相同数量的 CTLL-2 细胞 (小鼠细胞毒性 T 淋巴细胞细胞系，属于 IL-2 依赖型，细胞表面高度表达 CD25)，然后按照浓度梯度分别加入 rhIL-2 和 IL-2 突变体，孵育 48 小时后加入 cell Titer Glo Luminescent buffer。通过化学发光检测细胞内 ATP 的含量 (SpectraMaxM5)，检测每个孔内的细胞数量，从而检测不同浓度的 rhIL-2 和 IL-2 突变体对细胞增殖的影响。数据用 GraphPad Prism7 软件分析，曲线用 Nonlinear regression 拟合。从剂量-反应曲线的非线性回归分析获得细胞增殖的 EC₅₀ 值(表现出最大反应的 50%所需的测试化合物浓度)。

20 使用细胞增殖分析测量 rhIL-2 和突变体白介素-2(His 标签)的活性，并且在表 2 和图 2 中示出了结果的概述。所有测试物品均以剂量依赖性方式诱导 CTLL-2 细胞生长。在细胞增殖倍数相当的情况下，我们认为 EC₅₀ 越大，证明其刺激 CTLL2 生长的活性越弱。而这种改变是由于其突变体蛋白影响的与 CD25 结合所致，而突变体蛋白保留了通过 IL-2Rβγ 异二聚体激活 IL-2R 信号传导，所以在浓度增加后，细胞还是得到了有效扩增。所有的 IL-2 突变体 (His 标签)相对于 rhIL-2 的效能最高不超过 8.314%。证明 IL-2gm(1~15)可以消除与 CD25 的结合，由于没有形成 IL-2Rαβγ 异三聚体造成刺激作用减弱。较优地，IL-2gm1、IL-2gm3、IL-2gm5、IL-2gm6、IL-2gm7、IL-2gm8、IL-2gm9、IL-2gm10、IL-2gm12、IL-2gm14 和 IL-2gm15 与对照样品 rhIL-2 增殖效应小超过 50 倍。其中，IL-2gm1、IL-2gm6、IL-2gm14 则超过了 100 倍。

30 表 2. 响应于 rhIL-2 和突变体白介素-2 (His 标签)的 CTLL-2 细胞增殖的概述

测试样品	EC ₅₀ (nM)	相对于 rhIL-2 的效能 (%)
rhIL-2	2.90E-03	100%
IL-2gm1-His	8.34E+01	0.003%
IL-2gm2-His	6.38E-02	4.547%

IL-2gm3-His	1.65E-01	1.763%
IL-2gm4-His	9.06E-02	3.199%
IL-2gm5-His	8.221	0.035%
IL-2gm6-His	5.15E+01	0.006%
IL-2gm7-His	3.65E-01	0.794%
IL-2gm8-His	8.838	0.033%
IL-2gm9-His	2.385	0.122%
IL-2gm10-His	1.56E+01	0.019%
IL-2gm11-His	3.49E-02	8.314%
IL-2gm12-His	1.56E-01	1.865%
IL-2gm13-His	1.44E-01	2.012%
IL-2gm14-His	4.79E+01	0.006%
IL-2gm15-His	1.65E+01	0.018%

使用细胞增殖分析测量 rhIL-2 和突变体白介素-2(Fc 标签)的活性，并且在表 3 和图 3 中示出了结果的概述。所有测试物品均以剂量依赖性方式诱导 CTLL-2 细胞生长。在细胞增殖倍数相当的情况下，EC₅₀ 越大，证明其刺激 CTLL2 生长的活性越弱。而这种改变是由于其突变体蛋白影响的与 CD25 结合所致，而突变体蛋白保留了通过 IL-2Rβγ 异二聚体激活 IL-2R 信号传导，所以在浓度增加后，细胞还是得到了有效扩增。所有的 IL-2 突变体 (Fc 标签)相对于 rhIL-2 的效能最高不超过 31.546%。证明 IL-2gm(4~6)的双体型式同样可以消除与 CD25 的结合，由于没有形成 IL-2Rαβγ 异三聚体造成刺激作用减弱。较优地，IL-2qm-Fc 、 IL-2gm5 和 IL-2gm6 相对对样品 rhIL-2 对 CTLL2 的增殖效应小超过 50 倍。其中，

10 IL-2qm-Fc 、 IL-2gm6-Fc 在测试浓度范围未能观测到明显的细胞增殖。

表 3. 响应于 rhIL-2 和突变体白介素-2(Fc 标签)的 CTLL-2 细胞增殖的概述

测试样品	EC ₅₀ (nM)	相对于 rhIL-2 的效能 (%)
rhIL-2	2.90E-03	100%
IL-2gm4-Fc	9.19E-03	31.546%
IL-2gm5-Fc	1.73E-01	1.681%
IL-2gm6-Fc	5.95E+00	0.049%
IL-2qm-Fc	2.07E+13	0.000%

实施例 5. 利用 NK92 细胞进行细胞增殖分析

本发明人利用 NK92 细胞在细胞增殖分析中评估 rhIL-2、实施例 1 的突变体白介素-2 的活性。

实验板中接种相同数量的 NK92 细胞 (NK-92 细胞是一株从一位患有急进性非霍奇金淋巴瘤的 50 岁白人男性外周血单核细胞衍生来的一株 IL-2 依赖型 NK 细胞株。其部分细胞表面表达 CD25)，然后按照浓度梯度分别加入 rhIL-2 和 IL-2 突变体，孵育 72 小时后加入 cell Titer Glo Luminescent buffer。通过化学发光检测细胞内 ATP 的含量 (SpectraMaxM5)，检测

20 每个孔内的细胞数量，从而检测不同浓度的 rhIL-2 和 IL-2 突变体对细胞增殖的影响。数据用 GraphPad Prism7 软件分析，曲线用 Nonlinear regression 拟合。从剂量-反应曲线的非线性回归分析获得细胞增殖的 EC₅₀ 值 (表现出最大反应的 50%所需的测试化合物浓度)。

使用细胞增殖分析测量 rhIL-2 和突变体白介素-2 (His 标签)的活性，并且在表 4 和图 4 中示出了结果的概述。所有测试物品均以剂量依赖性方式诱导 NK92 细胞生长。在细胞增殖倍数相当的情况下，EC₅₀ 越大，证明其刺激 NK92 生长的活性越弱。而这种改变是由于其突变体蛋白影响的与 CD25 结合所致，而突变体蛋白保留了通过 IL-2Rβγ 异二聚体激活 IL-2R 信号传导，所以在浓度增加后，细胞还是得到了有效扩增。所有的 IL-2 突变体(His 标签)相对于 rhIL-2 的效能最高不超过 1.721%。证明 IL-2gm (1~15)对部分表面表达 CD25 的 NK92 细胞消除与 CD25 的结合，由于没有形成 IL-2Rαβγ 异三聚体造成刺激作用减弱刺激作用降低。其中，IL-2gm1、IL-2gm5 和 IL-2gm14 最为明显，增殖效应下降了超过 100 倍。

表 4. 响应于 rhIL-2 和突变体白介素-2 (His 标签)的 NK92 细胞增殖的概述

测试样品	EC ₅₀ (nM)	相对于 rhIL-2 的效能(%)
rhIL-2	1.93E-03	100
IL-2gm1-His	3.85E+01	0.005%
IL-2gm2-His	1.12E-01	1.721%
IL-2gm3-His	2.21E+00	0.088%
IL-2gm4-His	2.34E-01	0.828%
IL-2gm5-His	20.68	0.009%
IL-2gm6-His	7.08E+00	0.027%
IL-2gm7-His	5.57E-01	0.347%
IL-2gm8-His	8.91	0.022%
IL-2gm9-His	1.067	0.181%
IL-2gm10-His	1.27E+01	0.015%
IL-2gm11-His	2.80E-01	0.690%
IL-2gm12-His	2.96E-01	0.653%
IL-2gm13-His	2.93E-01	0.661%
IL-2gm14-His	2.32E+01	0.008%
IL-2gm15-His	7.76E+00	0.025%

10

使用细胞增殖分析测量 rhIL-2 和突变体白介素-2(Fc 标签)的活性，并且在表 5 和图 5 中示出了结果的概述。所有测试物品均以剂量依赖性方式诱导 NK92 细胞生长。在细胞增殖倍数相当的情况下，EC₅₀ 越大，证明其刺激 NK92 生长的活性越弱。而这种改变是由于其突变体蛋白影响的与 CD25 结合所致，而突变体蛋白保留了通过 IL-2Rβγ 异二聚体激活 IL-2R 信号传导，所以在浓度增加后，细胞还是得到了有效扩增。所有的 IL-2 突变体(Fc 标签)相对于 rhIL-2 的效能最高不超过 34.783%。证明 IL-2qm-Fc 、IL-2gm (4~6)的双体型式同样可以降低对部分表达 CD25 的 NK92 细胞与 CD25 的结合，由于没有形成 IL-2Rαβγ 异三聚体造成刺激作用减弱。较优地，IL-2qm-Fc 、IL-2gm6-Fc 相对于 rhIL-2 下降了超过 100 倍。但 IL-2qm 对 NK92 细胞扩增倍数明显小于其他的突变体蛋白。

15

20

表 5. 响应于 rhIL-2 和突变体白介素-2(Fc 标签)的 NK92 细胞增殖的概述

测试样品	EC ₅₀ (nM)	相对于 rhIL-2 的效能 (%)
rhIL-2	5.28E-03	100
IL-2gm4-Fc	1.52E-02	34.783%
IL-2gm5-Fc	7.11E-02	7.425%
IL-2gm6-Fc	8.24E-01	0.641%

IL-2qm-Fc	3.06E-01	1.727%
-----------	----------	--------

实施例 6. 本发明的突变体蛋白的半衰期研究

本发明人进一步研究了本发明方法获得的突变体蛋白的体内半衰期，发现通过本发明方法得到的突变体蛋白的体内半衰期均有不同程度的增加。

5

实施例 7. IL-2 突变体蛋白的合成 (HSA 标签)

本发明人进一步合成了以下 IL-2 突变体

突变个数	突变位点	实施例突变体名称	蛋白标签	序列编号
2	3、39	IL-2gm1 (T3A, M39N)	HSA	SEQ ID NO: 26
3	3、49 和 73	IL-2gm4 (T3A, K49N, A73T)	HSA	SEQ ID NO: 27
5	3、39、49、73、109	IL-2gm6 (T3A, M39N, K49N, A73T, D109N)	HSA	SEQ ID NO: 28
2	3、109	IL-2gm7 (T3A, D109N)	HSA	SEQ ID NO: 29
2	3、39	IL-2gm1a (T3A, M39D)	HSA	SEQ ID NO: 34
2	3、39	IL-2gm1b (T3A, M39E)	HSA	SEQ ID NO: 35
2	3、39	IL-2gm1c (T3A, M39Q)	HSA	SEQ ID NO: 36
2	3、39	IL-2gm1d (T3A, M39A)	HSA	SEQ ID NO: 37
1	3	IL-2-HSA (T3A)野生型	HSA	SEQ ID NO:30

将 IL-2 突变体分子 IL-2gm1、IL-2gm4、IL-2gm6、IL-2gm7 编码序列与 HSA 编码序列串联，通过分子克隆手段分别构建至真核表达载体中以制备 IL-2 突变体分子的表达载体。使用 Freestyle 培养基培养的 293E 细胞进行 IL-2 突变体分子的瞬时转染表达。转染前 24 小时，在 1 L 细胞培养瓶中接种 0.5×10^6 个细胞/ml 的 293E 细胞 150 ml，37℃ 5% CO₂ 温箱中 120 rpm 摇床培养。转染时先取 150 μ l 的 293fectin 加入到 2.85ml 的 OptiMEM 中，充分混匀后，室温孵育 2 分钟；同时分别将用于表达 IL-2 分子的质粒 150 μ g 使用 OptiMEM 稀释至 3 ml。将上述稀释后的转染试剂及质粒充分混合，室温孵育 15 分钟，然后将混合物全部加入细胞中，混匀，37℃ 5% CO₂ 温箱中 120 rpm 摇床培养 7 天。收集细胞培养上清，将上清用 0.22 微米的滤膜过滤，然后利用 Q-HP 离子交换层析柱(GE)进行纯化，利用 20 mM Tris 0-500 mM NaCl，pH 8.0 线性洗脱，按体积连续收集样品。利用 4~20%梯度胶 (金斯瑞公司)进行 SDS-PAGE 检测各收集组分，并根据电泳纯度进行合样。

实施例 8. 受体蛋白的制备

为研究 IL-2 突变体分子与 IL-2R α 受体及 IL-2R $\beta\gamma$ 异源二聚化受体的结合能力，制备了人源的 IL-2R α 受体及 IL-2R $\beta\gamma$ 异源二聚化受体蛋白用于 Biacore 亲和力检测。

人源 IL-2R α 受体的设计为将 IL-2R α 胞外结构域编码序列与 6 $\times$ His Tag 编码序列相连 (SEQ ID NO: 31)，克隆至真核表达载体中。使用 Freestyle 培养基培养的 293E 细胞进行 IL-2R α 受体的瞬时转染表达。转染前 24 小时，在 1L 细胞培养瓶中接种 0.5×10^6 细胞/ml 的 293E 细胞 150 ml，37℃ 5% CO₂ 温箱中 120 rpm 摇床培养。转染时先取 150 μ l 的 293fectin 加入到

2.85ml 的 OptiMEM 中,充分混匀后,室温孵育 2 分钟;同时将用于表达 IL-2R α 受体的质粒 150 μ g 使用 OptiMEM 稀释至 3 ml。将上述稀释后的转染试剂及质粒充分混合,室温孵育 15 分钟,然后将混合物全部加入细胞中,混匀,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 温箱中 120 rpm 摇床培养 7 天。收集细胞培养上清,将上清用 0.22 微米的滤膜过滤,然后利用 Ni-NTA 亲和层析柱(GE)进行
5 纯化,在 20mM PB-0.5M NaCl-100mM 咪唑条件下洗脱。利用 4~20%梯度胶 (金斯瑞公司) 进行 SDS-PAGE 检测纯化蛋白质。

人源 IL-2R $\beta\gamma$ 异源二聚化受体的设计利用了“Knobs into Holes”技术,将 IL-2R β 胞外结构域编码序列与编码“Knobs”Fc 片段连接(SEQ ID NO: 32),克隆至真核表达载体中;将 IL-2R γ 胞外结构域编码序列与编码“Holes”Fc 片段连接(SEQ ID NO: 33),克隆至真核表达载体中。
10 使用 Freestyle 培养基培养的 293E 细胞进行 IL-2R $\beta\gamma$ 异源二聚化受体的瞬时转染表达。转染前 24 小时,在 1L 细胞培养瓶中接种 0.5 $\times 10^6$ 细胞/ml 的 293E 细胞 150 ml,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 温箱中 120 rpm 摇床培养。转染时先取 150 μ l 的 293fectin 加入到 2.85ml 的 OptiMEM 中,充分混匀后,室温孵育 2 分钟;同时将用于表达 IL-2R $\beta\gamma$ 异源二聚化受体的质粒各 75 μ g 使用 OptiMEM 稀释至 3 ml。将上述稀释后的转染试剂及质粒充分混合,室温孵育 15 分钟,然
15 后将混合物全部加入细胞中,混匀,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 温箱中 120 rpm 摇床培养 7 天。收集细胞培养上清,将上清用 0.22 微米的滤膜过滤,然后利用 MabSelect SuRe 亲和层析柱(GE)进行纯化,在 20 mM 枸橼酸-枸橼酸钠, pH3.0 条件下洗脱,用 1 M Tris base 调节 pH 至中性。利用 4~20%梯度胶(金斯瑞公司)进行 SDS-PAGE 检测纯化蛋白质。

20 **实施例 9. 利用 biacore 检测结合受体的亲和力实验**

为研究 IL-2 突变体相对于野生型与受体的亲和力,在以下条件下使用重组单体 IL-2R α 亚基通过 Biacore 8K (GE)测定 IL-2 突变体及野生型 IL-2-HSA 对人 IL-2R α 亚基的亲和力: 将人 IL-2R α 亚基固定化于 CM5 芯片上 (190RU)。在 25 $^{\circ}$ C 在 HBS-EP 缓冲液中将 IL-2 突变体及 IL-2-HSA 用作分析物。对于 IL-2R α , 分析物浓度为 200nM 降至 1.526 nM (1:2 稀释),
25 流动为 30 μ l/分 (结合时间 180 秒,解离时间 300 秒)。对于 IL-2R α ,再生用 20mM NaOH, 30 μ l/min 进行 10 秒。对于 IL-2R α ,使用 1:1 结合, RI $\neq$ 0, R 最大值=全局拟合数据。

在以下条件下使用重组 IL-2R $\beta\gamma$ 异二聚体通过 Biacore 8K (GE)测定 IL-2 突变体及野生型 IL-2-HSA 对人 IL-2R $\beta\gamma$ 异二聚体的亲和力: 将人 hIL-2R β, γ ECD-N-hIgG1Fc 固定化于 Protein A 芯片上(400RU)。25 $^{\circ}$ C 在 HBS-EP 缓冲液中将 IL-2 突变体及 IL-2-HSA 用作分析物。
30 对于 IL-2R $\beta\gamma$, 分析物浓度为 200nM 降至 1.5625nM(1:2 稀释),流动为 30 μ l/分(结合时间 180 秒,解离时间 300 秒)。对于 IL-2R $\beta\gamma$,再生用 10mM Glycine (pH1.5), 30 μ l/min, 30 秒。对于 IL-2R $\beta\gamma$,使用 1:1 结合, RI $\neq$ 0, R 最大值=局部拟合数据。

结果如下:

表 6: IL-2 突变体相对于野生型与受体的亲和力(KD)

测试样品	人源 IL-2R α (稳态)	人源 IL-2R α (动态)	人源 IL-2R $\beta\gamma$ 异源二聚体 (动态)
IL-2-HSA 野生型	5.56E-08M	1.06E-07M	1.53E-08M

IL-2gm1-HSA	无结合	无结合	1.38E-08M
IL-2gm4-HSA	7.26E-08M	3.54E-08M	3.30E-08M
IL-2gm6-HSA	无结合	无结合	2.89E-08M
IL-2gm1a-HSA	无结合	无结合	3.65E-08M
IL-2gm1b-HSA	无结合	无结合	2.83E-08M
IL-2gm1c-HSA	无结合	无结合	3.84E-08M
IL-2gm1d-HSA	6.62E-08M	1.13E-08M	2.30E-08M

相对于野生型 IL-2-HSA 与人 IL-2R α 亚基的亲合力: IL-2gm1-HSA、IL-2gm6-HSA、IL-2gm1a-HSA、IL-2gm1b-HSA 和 IL-2gm1c-HSA 无结合, IL-2gm4-HSA 和 IL-2gm1d-HSA 有结合;

相对于野生型 IL-2-HSA 与人重组 IL-2R $\beta\gamma$ 异二聚体的亲合力: IL-2gm1-HSA、IL-2gm4-HSA、IL-2gm6-HSA、IL-2gm1a-HSA、IL-2gm1b-HSA、IL-2gm1c-HSA 和 IL-2gm1d-HSA 与野生型相当。

因此, IL-2gm1-HSA、IL-2gm1a-HSA、IL-2gm1b-HSA 和 IL-2gm1c-HSA 是较优的目的分子。

如图 8A 显示了, IL-2gm1-HSA、IL-2gm4-HSA、IL-2gm6-HSA、IL-2gm1a-HSA、IL-2gm1b-HSA、IL-2gm1c-HSA, IL-2gm1d-HSA, 野生型 IL-2-HSA 与人 IL-2R α 亚基的亲合力。

如图 8B 显示了, IL-2gm1-HSA、IL-2gm4-HSA、IL-2gm6-HSA、IL-2gm1a-HSA、IL-2gm1b-HSA、IL-2gm1c-HSA, IL-2gm1d-HSA, 野生型 IL-2-HSA 与人重组 IL-2R $\beta\gamma$ 异二聚体的亲合力。

15

实施例 10. 利用 NK92 细胞进行细胞增殖分析

NK92 细胞是一株从一位患有急性非霍奇金淋巴瘤的 50 岁白人男性外周血单核细胞衍生来的 IL-2 依赖型 NK 细胞株。其部分细胞表面表达 CD25。本发明人利用 NK92 细胞在细胞增殖分析中评估 IL-2gm1-HSA、IL-2gm4-HSA、IL-2gm6-HSA 及野生型 IL-2-HSA 的活性。

收获处于对数生长期的 NK92 细胞, 用基础培养基 MEM- α 清洗一遍, 将其(5000 个/孔)与不同浓度的 IL-2gm1-HSA、IL-2gm4-HSA、IL-2gm6-HSA 及野生型 IL-2-HSA 在实验培养基 (来自 Gibco(货号 32561-037)的 MEM- α 培养基, 添加 12.5%胎牛血清和 12.5%的马血清)中, 于 37°C、5%二氧化碳培养箱中共培养 48h。每孔加入 100 μ l ATP 检测底物 CellTiter-Glo (来自 promega(货号 G7571)), 于酶标仪 (购自 Molecular Devices (型号 I3x))下终点法检测全波长荧光值。

使用细胞增殖分析测量 IL-2gm1-HSA、IL-2gm4-HSA、IL-2gm6-HSA 及野生型 IL-2 分子 IL-2-HSA 的活性, 结果示于图 9 中。所有测试物品均以剂量依赖性方式诱导 NK92 细胞生长。在细胞增殖倍数相当的情况下, EC₅₀ 越大, 证明其刺激 NK92 生长的活性越弱。而这种改变是由于其突变体蛋白影响的与 CD25 结合所致, 而 IL-2gm1-HSA 突变体蛋白保留了通过 IL-2R $\beta\gamma$ 异二聚体激活 IL-2R 信号传导, 所以在浓度增加后, 细胞还是得到了有效增殖。

30

IL-2gm1-HSA 相对于 IL-2-HSA 刺激 NK92 细胞增殖的比活为 1.07%，证明 IL-2gm1-HSA 对部分表面表达 CD25 的 NK92 细胞消除与 CD25 的结合，由于没有形成 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 异三聚体造成刺激作用减弱。IL-2gm1-HSA 相对于 IL-2-HSA 刺激 NK92 细胞增殖效应下降了约 100 倍。IL-2gm4-HSA 相对于 IL-2-HSA 刺激 NK92 细胞增殖的比活为 1.78%，IL-2gm6-HSA 相对于 IL-2-HSA 刺激 NK92 细胞增殖的比活为 0.087%。在浓度加大后，细胞还是得到了有效增殖，保留了生物学活性。

实施例 11. 测量 IL-2 突变体诱导的 IFN- γ 释放

收获处于对数生长期的 NK92 细胞，用基础培养基 MEM- α 清洗一遍，将其(5000 个/孔)与不同浓度的 IL-2gm1-HSA、IL-2gm4-HSA、IL-2gm6-HSA 及野生型 IL-2-HSA 在实验培养基(来自 Gibco(货号 32561-037)的 MEM- α 培养基，添加 12.5%胎牛血清和 12.5%的马血清)中，于 37℃、5%二氧化碳培养箱中共培养 24h。收获上清并使用来自 R&D 的抗人 IFN- γ ELISA 试剂盒(# SIF50)分析 IFN- γ 的释放。

结果如图 10A 所示，IL-2gm1-HSA、IL-2gm4-HSA 及野生型 IL-2-HSA 均产生对干扰素 γ 的刺激作用。

结果如图 10B 所示，IL-2gm6-HSA 及野生型 IL-2-HSA 均产生对干扰素 γ 的刺激作用。

实施例 12. 测量 IL-2 突变体刺激 PBMC 增殖

本发明人采集中国健康人(n=2)的新鲜血液样品于肝素钠管中并分离 PBMC，用 RPMI-1640 培养基(含 10% FBS)将 PBMC 重悬后接种于 48 孔板(1×10^6 个/孔)，用不同浓度的 IL-2gm6-HSA 以及野生型 IL-2-HSA 刺激 PBMC，于 37℃、5%二氧化碳培养箱中共培养 6 天。用细胞表面和胞内标志物抗体实施 FACS 染色以检测不同细胞群体，样品均通过 LSRFortessaTM 细胞分析仪获得。

NK 细胞限定为 CD3-/CD56+，而 Treg 细胞限定为 CD3+CD4+CD25+Foxp3+。

结果如图 11A-B 所示。其中图 11A 显示，在 4 nM 浓度下，IL-2gm6-HSA 相对于野生型 IL-2-HSA 对 NK 细胞的刺激增殖作用稍差；在 100 nM 浓度下，IL-2gm6-HSA 相对于野生型 IL-2-HSA 对 NK 细胞的刺激增殖作用明显增多；图 11B 显示在 4 nM 和 100 nM 浓度下，IL-2gm6-HSA 相对于野生型 IL-2-HSA 对 Treg 细胞的刺激增殖作用均明显减弱。

因此，在该实验中，IL-2gm6-HSA 对 NK 细胞起到明显的刺激增殖作用，对 Treg 细胞起到明显的抑制增殖作用。

随后，本发明人还测试了 IL-2gm1-HSA 以及野生型 IL-2-HSA 刺激 PBMC 增殖的作用。

NK 细胞限定为 CD3-/CD56+，而 CD4+细胞限定为 CD3+/CD4+。

结果如图 12A-B 所示。其中图 12A 显示，在 0-500 nM 样品浓度刺激下，IL-2gm1-HSA 相对于野生型 IL-2-HSA 对 NK 细胞的刺激增殖作用明显增多；图 12B 显示在 0-500 nM 浓度刺激条件下，IL-2gm1-HSA 相对于野生型 IL-2-HSA 对 CD4+T 细胞的刺激增殖作用均有明

显减弱。

因此，在该实验中，IL-2gm1-HSA 对 NK 细胞起到明显的刺激增殖作用，对 CD4+T 细胞起到明显的抑制增殖作用。

- 5 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种 IL-2 突变体，其特征在于，所述 IL-2 突变体在对应于野生型 IL-2 的以下一个或多个位点发生氨基酸残基突变：39、49、73 和 109；优选仅在 39 位发生突变。
- 5 2. 一种 IL-2 突变体，其特征在于，所述 IL-2 突变体在对应于野生型 IL-2 的 39 位和任选的以下一个或多个位点发生氨基酸残基突变：49、73 和 109。
3. 如权利要求 1 或 2 中任一项所述的 IL-2 突变体，其特征在于，所述 IL-2 突变体在野生型 IL-2 中发生以下一种或多种氨基酸残基突变：M39D、M39E、M39Q、M39N、M39A、K49N、A73T、A73S 和 D109N；
- 10 4. 如权利要求 3 所述的 IL-2 突变体，其特征在于，所述 IL-2 突变体在野生型 IL-2 中发生以下氨基酸残基突变单点：M39D、M39E、M39Q、M39N 或 M39A；优选 M39D、M39E、M39Q 或 M39N；更优选 M39D、M39E 或 M39Q；更优选 M39D 或 M39E；最优选 M39D。
5. 一种融合蛋白或缀合物，所述融合蛋白或缀合物包含权利要求 1-4 中任一项所述的 IL-2 突变体和非 IL-2 功能部分。
- 15 6. 一种多核苷酸，所述多核苷酸编码权利要求 1-4 中任一项所述的 IL-2 突变体或权利要求 5 所述的融合蛋白或缀合物。
7. 一种表达载体，所述表达载体包含权利要求 6 所述的多核苷酸。
8. 一种宿主细胞，所述宿主细胞包含权利要求 7 所述的表达载体，或者所述宿主细胞的基因组整合有权利要求 6 所述的多核苷酸。
- 20 9. 一种药物组合物，所述药物组合物包含权利要求 1-4 中任一项所述的 IL-2 突变体蛋白或权利要求 5 所述的融合蛋白或缀合物与药学上可接受的辅料。
10. 权利要求 1-4 中任一项所述的 IL-2 突变体或权利要求 5 所述的融合蛋白在制备用于治疗个体的疾病中的药物的用途。