

经修饰的 IL-2 分子及其用途

技术领域

本发明属于生物医药领域，具体涉及一种经修饰的 IL-2 分子及其用途。

背景技术

据公开资料显示，2017 年 2 月世卫组织公布的数据表明，全球每年有 1400 多万新发癌症病例，预计到 2030 年这一数字将增加到 2100 多万；每年有 880 万人死于癌症，全球癌症死亡人数占总死亡人数的近六分之一，癌症的预防和治疗是医学领域亟需解决的世界性难题。

目前，传统的用于治疗癌症的方法包括外科手术、化疗、激素治疗和放疗（参见例如：Stockdale，1998 年《癌症患者管理原则》（Principles of Cancer Patient Management），《科学美国人：医学》（Scientific American: Medicine），第 3 卷，Rubenstein 和 Federman 编，第 12 章第 IV 节）。然而，由于患者健康状况或疾病晚期情况，外科手术可能是不可行的，而且手术后癌细胞往往不能完全从患者体内移除；而只有当肿瘤组织对辐射的敏感性高于正常组织时，放疗才有效，同时高剂量的放疗通常会引起严重的副作用；激素治疗很少作为单一药剂使用，虽然其可能有效，但通常在其它治疗已移除了大多数癌细胞之后用于预防或延迟癌症复发；化疗最大的问题则在于患者可能很快对化疗药剂产生耐药性。

除此之外，免疫调节因子（例如白细胞介素）也可以适用于对动物模型和癌症患者发挥抗肿瘤作用，并避免了上述各种传统疗法中的缺陷，然而，与应用免疫调节因子相关的全身性毒副作用较大程度地限制了其使用。因此，开发能够降低免疫调节因子毒副作用的有效疗法十分必要。

发明内容

鉴于以上现有技术中存在的问题，一方面，本申请提供了经修饰的 IL-2 分子，其中，所述修饰包括使用 IL-15 分子中介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域取代 IL-2 分子中介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域，所述 IL-15 分子中介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包含 9 个以上的氨基酸残基。

在某些实施方式中，所述 IL-15 分子中介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域是连续的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 IL-15 分子中介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域

是不是连续的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 IL-15 分子中介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包含 1 个或以上不连续的氨基酸位点。

在某些实施方式中，所述 IL-2 分子中介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域是连续的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 IL-2 分子中介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域是不是连续的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 IL-2 分子中介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域包含 1 个或以上不连续的氨基酸位点。

在某些实施方式中，所述修饰能够降低所述经修饰的 IL-2 分子与 IL2R α 的亲合力。

在某些实施方式中，所述修饰能够消除所述经修饰的 IL-2 分子与 IL2R α 的亲合力。

在某些实施方式中，所述亲和力通过生物膜干涉技术 (biolayer interferometry, BLI) 测得。

在某些实施方式中，所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域包括环 M(loop M) 或其变体，所述环 M 包含如 SEQ ID NO. 1 所示的序列。

在某些实施方式中，所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域包括环 N(loop N) 或其变体，所述环 N 包含如 SEQ ID NO. 5 所示的序列。

在某些实施方式中，所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域包括螺旋 B 或其变体，所述螺旋 B 包含如 SEQ ID NO. 2 所示的序列。

在某些实施方式中，所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域包括环 M(loop M) 或其变体、螺旋 B 或其变体，所述环 M 包含如 SEQ ID NO. 1 所示的序列，所述螺旋 B 包含如 SEQ ID NO. 2 所示的序列。

在某些实施方式中，所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域包括螺旋 B 或其变体、环 N(loop N) 或其变体，所述螺旋 B 包含如 SEQ ID NO. 2 所示的序列，所述环 N 包含如 SEQ ID NO. 5 所示的序列。

在某些实施方式中，所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域包括环 M(loop M) 或其变体、环 N(loop N) 或其变体，所述环 M 包含如 SEQ ID NO. 1 所示的序列，所述环 N 包含如 SEQ ID NO. 5 所示的序列。

在某些实施方式中，所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域自 N 端至 C 端依次包含：环 M(loop M) 或其变体、螺旋 B 或其变体、环 N(loop N) 或其变体，所述环 M 包含如 SEQ ID NO. 1 所示的序列，所述螺旋 B 包含如 SEQ ID NO. 2 所示的序列，所述环 N 包含如 SEQ ID NO. 5 所示的序列。

在某些实施方式中，所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包括环 m (loop m) 或其变体，所述环 m 包含如 SEQ ID NO. 8 所示的序列。

在某些实施方式中，所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包括环 n (loop n) 或其变体，所述环 n 包含如 SEQ ID NO. 12 所示的序列。

在某些实施方式中，所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包括螺旋 b 或其变体，所述螺旋 b 包含如 SEQ ID NO. 9 所示的序列。

在某些实施方式中，所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包括环 m (loop m) 或其变体、螺旋 b 或其变体，所述环 m 包含如 SEQ ID NO. 8 所示的序列，所述螺旋 b 包含如 SEQ ID NO. 9 所示的序列。

在某些实施方式中，所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包括螺旋 b 或其变体、环 n (loop n) 或其变体，所述螺旋 b 包含如 SEQ ID NO. 9 所示的序列，所述环 n 包含如 SEQ ID NO. 12 所示的序列。

在某些实施方式中，所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包括环 m (loop m) 或其变体、环 n (loop n) 或其变体，所述环 m 包含如 SEQ ID NO. 8 所示的序列，所述环 n 包含如 SEQ ID NO. 12 所示的序列。

在某些实施方式中，所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域自 N 端至 C 端依次包含：环 m (loop m) 或其变体、螺旋 b 或其变体、环 n (loop n) 或其变体，所述环 m 包含如 SEQ ID NO. 8 所示的序列，所述螺旋 b 包含如 SEQ ID NO. 9 所示的序列，所述环 n 包含如 SEQ ID NO. 12 所示的序列。

在某些实施方式中，所述修饰包括使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 m (loop m) 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 M (loop M) 或其变体。

在某些实施方式中，所述修饰包括使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的螺旋 b 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的螺旋 B 或其变体。

在某些实施方式中，所述修饰包括使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 n (loop n) 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 N (loop N) 或其变体。

在某些实施方式中，所述修饰包括使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 m (loop m) 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 M (loop M) 或其变体，以及，使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的螺旋 b 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的螺旋 B 或其变体。

在某些实施方式中，所述修饰包括使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的

区域内的螺旋 b 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的螺旋 B 或其变体, 以及, 使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 n(loop n) 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 N(loop N) 或其变体。

在某些实施方式中, 所述修饰包括使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 m(loop m) 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 M(loop M) 或其变体, 以及, 使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 n(loop n) 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 N(loop N) 或其变体。

在某些实施方式中, 所述修饰包括使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 m(loop m) 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 M(loop M) 或其变体、使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的螺旋 b 或其变体取代所述螺旋 B 或其变体, 以及, 使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 n(loop n) 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 N(loop N) 或其变体。

在某些实施方式中, 所述修饰使得所述经修饰的 IL-2 分子能够与 IL15R α 或 IL15R α 的 sushi 结构域结合。

在某些实施方式中, 所述修饰还包括使用 IL-15 分子中的环 x(loop x) 或其变体取代 IL-2 分子中的环 X(loop X) 或其变体, 所述环 x 包含如 SEQ ID NO. 10 所示的序列, 所述环 X 包含如 SEQ ID NO. 3 所示的序列。

在某些实施方式中, 所述修饰还包括使用 IL-15 分子中的螺旋 c 或其变体取代 IL-2 分子中的螺旋 C 或其变体, 所述螺旋 c 包含如 SEQ ID NO. 11 所示的序列, 所述螺旋 C 包含如 SEQ ID NO. 4 所示的序列。

在某些实施方式中, 与不包含所述取代的经修饰的 IL-2 分子相比, 所述取代能够提高所述的经修饰的 IL-2 分子的稳定性。

在某些实施方式中, 所述修饰还包括在 IL-2 分子的螺旋 D 区域进行氨基酸置换, 置换后的氨基酸能够与所述螺旋 b 中的第 43 位苯丙氨酸(F) 形成芳香环相互作用从而稳定疏水内核, 其中氨基酸的位置以天然 IL-15 分子氨基酸序列为基础, 根据 KABAT 编号的 EU 索引确定; 所述螺旋 D 包含如 SEQ ID NO. 6 所示的序列。

在某些实施方式中, 所述天然 IL-15 分子氨基酸序列如 SEQ ID NO. 13 所示。

在某些实施方式中, 所述氨基酸置换包括 W121F, 其中氨基酸的位置以天然 IL-2 分子氨基酸序列为基础, 根据 KABAT 编号的 EU 索引确定。

在某些实施方式中, 所述天然 IL-2 分子氨基酸序列如 SEQ ID NO. 7 所示。

在某些实施方式中, 所述的经修饰的 IL-2 分子包含如 SEQ ID NO. 14 所示的

序列。

另一方面，本申请还提供了蛋白异二聚体，其包括本申请所述的经修饰的 IL-2 分子，以及 IL15R α 或其变体；或者，所述蛋白异二聚体包括本申请所述的经修饰的 IL-2 分子，以及 IL15R α 受体的 sushi 结构域或其变体。

在某些实施方式中，所述 IL15R α 包含如 SEQ ID NO. 16 所示的序列。

在某些实施方式中，所述 sushi 结构域包含如 SEQ ID NO. 15 或 SEQ ID NO. 20 所示的序列。

在某些实施方式中，所述蛋白异二聚体不与 IL2R α 受体结合，并且和 IL-2 分子相比与 IL2R β 具有更高的亲和力，所述 IL-2 分子包括天然 IL-2 分子及其功能性变体。

在某些实施方式中，所述天然 IL-2 分子的功能性变体包括所述经修饰的 IL-2 分子。

在某些实施方式中，所述 IL15R α 变体或所述 sushi 结构域变体包含 Fc 片段。

在某些实施方式中，所述 Fc 片段位于所述 IL15R α 或所述 sushi 结构域的 C 端。

在某些实施方式中，所述 Fc 包括人 IgG1Fc、人 IgG4Fc 和鼠 IgG2a.1Fc 中的任意一种。

在某些实施方式中，所述 Fc 包含如 SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 24 或 SEQ ID NO. 25 所示的序列。

在某些实施方式中，所述蛋白异二聚体包含如 SEQ ID NO. 14 所示的序列，以及如 SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21 或 SEQ ID NO. 22 所示的序列。

在某些实施方式中，本申请所述的经修饰的 IL-2 分子和所述蛋白异二聚体与未经所述修饰的 IL-2 分子相比，能够降低 Treg 细胞的增殖活性。

另一方面，本申请还提供了核酸分子，其编码本申请所述的经修饰的 IL-2 分子。

另一方面，本申请还提供了核酸分子组合，其编码 a) 本申请所述的经修饰的 IL-2 分子，以及 b) 本申请中所述的 IL15R α 或其变体，或所述的 sushi 结构域或其变体。

另一方面，本申请还提供了载体，其包含本申请所述的核酸分子，或本申请所述的核酸分子组合。

在某些实施方式中，编码本申请所述的经修饰的 IL-2 分子的核酸分子与编码本申请中所述的 IL15R α 或其变体，或所述的 sushi 结构域或其变体的核酸分子位于同一载体中。

在某些实施方式中，所述载体包括第一载体和第二载体，所述第一载体包含编

码本申请所述的经修饰的 IL-2 分子的核酸分子，所述第二载体包含编码本申请中所述的 IL15R α 或其变体，或所述的 sushi 结构域或其变体的核酸分子。

另一方面，本申请还提供了细胞，其包含本申请所述的经修饰的 IL-2 分子、本申请所述的蛋白异二聚体、本申请所述的核酸分子、本申请所述的核酸分子组合或本申请所述的载体。

另一方面，本申请还提供了药物组合物，其包含本申请所述的经修饰的 IL-2 分子、本申请所述的蛋白异二聚体、本申请所述的核酸分子、本申请所述的核酸分子组合、本申请所述的载体或本申请所述的细胞。

另一方面，本申请还提供了本申请所述的经修饰的 IL-2 分子、本申请所述的蛋白异二聚体、本申请所述的核酸分子、本申请所述的核酸分子组合、本申请所述的载体、本申请所述的细胞用于制备药物的用途，其中所述药物用于预防和/或治疗肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括肛门癌、胆道癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胃癌、结肠癌、头颈部鳞状细胞癌、肝癌、实体瘤、黑色素瘤、默克尔细胞癌、间皮瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、肾细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、小细胞肺癌、胸腺癌、甲状腺癌、结肠癌和/或黑色素瘤。

临床上在 IL-2 低剂量的条件下，其会优先和 Treg 细胞表面上带有 α 链的高亲和力受体结合，从而产生免疫抑制，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）。本申请中通过将 IL-2 中与其受体 α 链结合的多肽序列替换为 IL-15 中与其受体 α 链结合的多肽序列，从而减弱或消除了与 α 受体结合，从而有减少 IL-2 促进的抑制 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，鉴于该优势，本申请提供的经修饰的 IL-2 分子具有广阔的临床应用前景。

附图说明

图 1 是本申请实施例 1 中 SEC-HPLC 对 IL-2/15 嵌合体 1 与 sushi-Fc 蛋白的异二聚体纯化产物进行鉴定的结果图，图 1a 为复合物 1，图 1b 为复合物 2，图 1c 为复合物 3；

图 2 是本申请实施例 1 中 SEC-HPLC 对 IL-2/15 嵌合体 2 与 sushi-hIgG4Fc 蛋白的异二聚体纯化产物进行鉴定的结果图；

图 3 是本申请实施例 4 中复合物 1 蛋白对 CTLL-2（T 细胞）增殖作用的结果图；

图 4 是本申请实施例 6 中预毒理实验结果；

图 5 是本申请实施例 7 中复合物在代表癌种中的抗肿瘤效果图；

图 6 是 IL-2 和 IL-15 的四螺旋结构示意图，其中将 IL-2 的 4 个 α 螺旋分别命名 A\B\C\D 螺旋，IL-15 的 4 个 α 螺旋分别命名 a\b\c\d 螺旋；

图 7 是 IL-15 和 IL-2 与各受体形成复合物的结构叠加比较示意图，其中 IL-2 或 IL-15 区域：灰色代表 IL-2，黑色代表 IL-15。

具体实施方式

在本申请中，术语“IL-2”通常是指天然白介素-2 或其功能性变体。天然白介素-2 是一类主要由 T 细胞（B 细胞、NK 细胞及单核-巨噬细胞也能产生）的细胞因子，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。它于 1976 年被发现，当时被称为 T 细胞生长因子（TCGF）。在人类中 IL-2 由第 4 号染色体上的基因编码，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）），例如在本申请中（如图 6 所示），IL-2 中自 N 端到 C 端的 4 个 α 螺旋依次命名为螺旋 A、螺旋 B、螺旋 C、螺旋 D，螺旋 AB 之间的连接序列（loop，环）命名为环 M，螺旋 BC 之间的连接序列（loop，环）命名为环 X，CD 螺旋间的连接序列（loop，环）命名为环 N；例如，螺旋 B 可以包含如 SEQ ID NO. 2 所示的氨基酸序列，螺旋 C 可以包含如 SEQ ID NO. 4 所示的氨基酸序列、螺旋 D 可以包含如 SEQ ID NO. 6 所示的氨基酸序列，环 M 可以包含如 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列，环 X 可以包含如 SEQ ID NO. 3 所示的氨基酸序列，环 N 可以包含如 SEQ ID NO. 5 所示的氨基酸序列。

IL-2 通过结合 IL-2 受体（IL2R）来介导其作用，天然 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（如图 7 所示），其中 α 受体主要表达在 T 抑制细胞（Treg）和一些内皮细胞（endothelial cells）表面，而 β 和 γ 受体亚基则多表达于效应性 T 细胞（Teff）和 NK 细胞。IL-2 对不同受体亚基的复合物形式的亲和力不同，IL-2 对 α 、 β 和 γ 受体亚基组成的复合体的亲和力最高，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），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））。

在本申请中，术语“IL-15”通常是指天然白介素-15 或其功能性变体。白

细胞介素 15 (IL-15) 是一种细胞因子, 可由活化的单核-巨噬细胞、表皮细胞或成纤维细胞等多种细胞产生。天然人白介素 15 成熟肽含有 114 个氨基酸, 约为 12-14kD, 由 4 个 α 螺旋以及一些连接序列 (loop) 组成, 并包括 4 个半胱氨酸残基, 其中 Cys35 与 Cys85、Cys42 与 Cys88 连接, 形成的两对分子内二硫键可以对于保持 IL-15 的空间构象和生物学活性起重要作用 (Lowe D.C., et al J. Mol. Biol. 406:160-175, 2011), 例如在本申请中 (如图 6 所示), IL-15 中自 N 端到 C 端的 4 个 α 螺旋依次命名为螺旋 a、螺旋 b、螺旋 c、螺旋 d, 螺旋 ab 之间的连接序列 (loop, 环) 命名为环 m, 螺旋 bc 之间的连接序列 (loop, 环) 命名为环 x, 螺旋 cd 间的连接序列 (loop, 环) 命名为环 n; 例如, 螺旋 b 可以包含如 SEQ ID NO. 9 所示的氨基酸序列, 螺旋 c 可以包含如 SEQ ID NO. 11 所示的氨基酸序列、环 m 可以包含如 SEQ ID NO.8 所示的氨基酸序列, 环 x 可以包含如 SEQ ID NO. 10 所示的氨基酸序列, 环 n 可以包含如 SEQ ID NO. 12 所示的氨基酸序列。

IL-15 可在机体正常的免疫应答中发挥作用, 如促进 T 细胞、B 细胞、自然杀伤 (NK) 细胞的发育和增殖等。IL-15 与 IL-2 拥有共有的 IL2/15R β 链和 γ 链受体, 拥有不同 α 链受体 (图 7), 从而使得 IL-2 可以活化 Treg 细胞和细胞凋亡 (AICD), 而同家族的 IL-15 则不具有 Treg 活化和 AICD 的功能 (Waldmann TA et al, Nature Reviews Immunol 6:595-601, 2006), 此外, 由于由不同的受体亚基组成, IL-15 对 NK 细胞增殖和维持记忆性 T 细胞有更明显的作用。因此本申请中利用 IL-2 和 IL-15 的特点, 使用 IL-15 的部分序列取代 IL-2 中的部分序列, 从而封闭与 IL2R α 受体的结合, 而保留与 IL2/15R β 和 γ 受体的结合。

在本申请中, 术语“介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域”通常是指 IL-15 分子 (包括天然 IL-15 分子或其功能性变体) 中能够使得 IL-15 分子与其受体 α 亚基结合的序列全长或其中的一部分; 所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域可以是 IL-15 分子多肽序列中连续的氨基酸序列, 也可以是其中不连续的氨基酸序列, 例如若干不相邻的氨基酸位点的组合。

在本申请中, 术语“介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域”通常是指 IL-2 分子 (包括天然 IL-2 分子或其功能性变体) 中能够使得 IL-2 分子与其受体 α 亚基结合的序列全长或其中的一部分; 所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域可以是 IL-2 分子多肽序列中连续的氨基酸序列, 也可以是其中不连续的氨基酸序列, 例如若干不相邻的氨基酸位点的组合。

在本申请中, 术语“生物膜干涉技术 (biolayer interferometry, BLI)”也称作生物膜层干涉技术, 通常是指一种广泛应用于生物分子间的动力学实验以

及定量检测实验的实验技术。例如，利用其可以实时检测生物分子之间的相互作用，从而被广泛的用于蛋白质、核酸和其他生物分子的动力学常数的测定。例如，它可提供包括结合速率常数（ K_a ）、解离速率常数（ K_d ）和亲和力常数（ K_D ）在内的动力学信息。举例说明，其原理可以包括：生物分子 A 结合到生物传感器末端（例如光纤材质）可以形成一层生物膜，当传感器末端的分子 A 与待检测分子 B 结合时会引起传感器末端分子量的改变，从而导致生物膜厚度的改变。光通过传感器的生物膜层后发生透射和反射形成干涉光波，生物膜厚度的变化导致干涉光波发生相对位移。生物分子结合前后的干涉光波被光谱仪检测到，形成干涉光谱，以干涉图谱的实时位移（nm）显示出来，最后根据分子结合前后图谱的变化对待检测分子进行分析。

在本申请中，术语“天然”或“天然的”通常是指存在于自然界中的物质（例如蛋白质、核酸等化合物分子），经过了分离、鉴定，而没有经人工改变其结构的情形。例如，“天然 IL-15 分子”、“天然 IL-2 分子”。

在本申请中，术语“变体”通常是指在天然多肽序列上进行氨基酸修饰（例如基团取代等）或者进行一个或多个氨基酸的插入、取代、和/或缺失（例如缺失一段氨基酸序列的截短体）从而得到的多肽序列。其可以全部或部分保留原天然多肽序列的功能，也可以不保留原天然多肽序列的功能，还可以具有比原天然多肽序列改进的功能（例如与相应配体或受体的亲和力提高）。其中，全部或部分保留原天然多肽序列的功能或者具有比原天然多肽序列改进的功能的变体可称为“功能性变体”例如，所述功能性变体可以比原序列具有更好的生物活性（或功能）。例如，所述保留不必是完全保留。例如，所述功能性变体可以基本保留原序列功能，例如，保留原序列至少 50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%，或 99% 的功能。例如，具有原序列 105%、110%、115%、125%、140%、160%、180%、200%、230%、260% 的功能。例如，所述功能性变体的氨基酸序列可以与原氨基酸序列至少 70%，75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99% 相同。

在本申请中，术语“C 端”通常是指多肽链的两个末端之一，此末端的氨基酸残基携带游离的 α 羧基（ $-\text{COOH}$ ）。

在本申请中，术语“N 端”通常是指多肽链的两个末端之一，此末端的氨基酸残基携带游离的 α 氨基（ $-\text{NH}_2$ ）。

在本申请中，术语“自 N 端至 C 端依次包含”通常是指包含的各序列片段或元件位置顺序关系。其中各序列片段或元件不必是直接连接的。

在本申请中，术语“药物组合物”通常指涉及适合施用于患者、例如人患者的组合物。例如，本申请所述的药物组合物，其可以包含本申请所述的核酸

分子、本申请所述的载体和/或本申请所述的细胞，以及任选地药学上可接受的佐剂。此外，所述药物组合物还可以包含一种或多种(药学上有效的)载剂、稳定剂、赋形剂、稀释剂、增溶剂、表面活性剂、乳化剂和/或防腐剂的合适的制剂。组合物的可接受成分在所用剂量和浓度下对接受者无毒。本发明的药物组合物包括但不限于液体、冷冻和冻干组合物。

在本申请中，术语“载体”通常指可将编码某蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可通过转化、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表达得以表达。举例来说，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 来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及病毒载体等。一种载体可能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。载体还有可能包括有协助其进入细胞的成分，如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳，但不限于只有这些物质。

在本申请中，术语“预防”通常是指对健康患者预防性地施用组合，以预防本申请所述疾病和病症的爆发。此外，术语“预防”指对处于待治疗变应性疾病前期的患者预防性地施用这种组合。术语“预防”不需要 100% 消除事件的可能性。更准确地说，它表示在所述药物组合物或方法存在下事件发生的可能性降低了。

在本申请中，术语“治疗”通常是指将治疗剂施加或给予患者，或将治疗剂施加或给予由患者分离的组织或细胞系，该患者患有疾病、具有疾病症状或疾病倾向，其目的是治疗、治愈、减轻、缓解、改变、补救、改善、提高或影响该疾病、疾病症状或疾病倾向。可以包括改善病状态、消除病灶或改善的预后。

在本申请中，术语“肿瘤”和“癌症”通常是指在正常生长和/或发育中呈现出至少部分失去增殖控制的细胞。例如，常见的肿瘤或癌细胞通常已经失去了接触抑制并可能是入侵性的和/或具有转移的能力。

本申请的某些实施方式中，利用生物信息学和蛋白质工程学技术，将 IL-2 分子中主要负责与 IL2R α 结合的氨基酸用 IL-15 的相应序列替换掉，即将 IL-2 分子中螺旋 A 和螺旋 B 之间的环 M (SEQ ID NO.1)、螺旋 B (SEQ ID NO.2) 以及螺旋 C 和螺旋 D 之间的环 N (SEQ ID NO. 5) 用 IL-15 的相应序列(即环 m (SEQ ID NO. 8)、螺旋 b (SEQ ID NO. 9)、环 n (SEQ ID NO. 12)) 替换掉，从而封闭 IL-2 与 IL2R α 的结合；进一步为了提高 IL-2/15 嵌合体(经修饰的 IL-2 分子)结构的稳定性，将 IL-2 的螺旋 B 和螺旋 C 之间的环 X (SEQ ID

NO.3)、螺旋 C (SEQ ID NO. 4) 同样用 IL-15 的环 x (SEQ ID NO. 10)、螺旋 c (SEQ ID NO. 11) 替换, 再进一步地将螺旋 D 中的第 115 位色氨酸 (W) 突变成苯丙氨酸 (F), 目的是与引入的 IL-15 螺旋 b 中的第 55 位苯丙氨酸 (F) 形成芳香环相互作用同时稳定疏水内核, 继而稳定四螺旋束结构, 最终实现新形成的蛋白分子 IL-2/15 嵌合体不与 IL2R α 受体结合, 而保留了与 β 链和 γ 链受体的结合。

临床上在 IL-2 低剂量的条件下, 是会优先和 Treg 细胞表面上带有 α 链的高亲和力受体结合, 从而产生免疫抑制, 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)。所以本申请采用的技术方案能够减弱或消除与 α 受体结合, 从而有减少 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; 而 IL-15 没有 Treg 活化和 AICD 的功能 (Waldmann TA et al, Nature Reviews Immunol 6:595-601, 2006), 并且, 由于不同的受体亚基组成, IL-15 对 NK 细胞增殖和维持记忆性 T 细胞有更明显的作用。因此本发明利用 IL-2 和 IL-15 的特点, 封闭与 IL2R α 受体的结合, 而保留与 IL2/15R β 和 γ 受体的结合。

在某些实施方式中, 引入 IL-2 的 IL-15 蛋白序列可以与 IL15R α 结合, 所以可以将 IL15R α 受体 (sushi 结构域) 与 IL-2/15 嵌合体共表达形成异源二聚体复合物, 可以稳定 IL-2/15 嵌合体的同时可以提高与 IL2/15R β 受体的亲和力, 以达到更好的生物效能; 进一步可在 sushi 结构域 (如 SEQ ID NO.15 或 SEQ ID NO.20) 的 C 端融合表达 Fc, 可以是人 IgG1Fc、人 IgG4Fc 或鼠 IgG2a.1Fc, 以达到长效的目的。

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。

实施例 1 从哺乳细胞中进行 IL-2/15 嵌合体的制备

1.1 表达质粒的合成与构建

委托苏州金唯智生物科技有限公司分别合成 IL-2/15 嵌合体 1 (SEQ ID NO.14)、sushi-hIgG1Fc (SEQ ID NO.19)、sushi-hIgG4Fc (SEQ ID NO. 21)、

sushi-mIgG2aa.1Fc (SEQ ID NO. 22) 4 个蛋白的目的基因片段并克隆到 pZD 载体的 EcoRI 和 HindIII 位点之间, 从而得到 4 个表达质粒, 编号分别为 PM619、PM432、PM657、PM599, 在质粒 PM619 的基础上, 按《分子克隆》描述的方法进行点突变, 将第 115 位 (对应天然 IL-2 分子氨基酸序列的第 121 位) 苯丙氨酸 (F) 突变成色氨酸 (W), 进而得到 IL-2/15 嵌合体 2 (SEQ ID NO. 23) 的质粒, 质粒编号为 PM824。然后将合成或构建的质粒分别转化 DH10B、测序和保菌。

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, 进行以上两种 IL-2/15 嵌合体和三种 sushi-Fc 的质粒制备。

1.2.2 HEK293 细胞准备

使用新鲜传代的密度为 $1-1.2 \times 10^6$ /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 250 mg Geneticin™ 加入 4.5 mL 超纯水溶解, 超纯水定容至 5 mL, 0.22 μ m 滤膜过滤, -20℃ 保存;

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

C) 培养基: 在 1L FreeStyle™ 293 Expression Medium 中加入 10 mL、10% 的 Pluronic™ F-68 和 500 μ L 的 G418;

D) 质粒提前准备在 2 mL 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 1 μ g/mL + Opti-MEM™ 33.3 μ L/mL

B 液: PEI 2 μ g/mL + Opti-MEM™ 33.3 μ L/mL

将 1 mL 的 B 液倒入 1 mL 的 A 液混匀孵育 10 min 后, 加入细胞悬液。

将 IL-2/15 嵌合体 1 和三种 sushi-Fc 分别按质量比 1: 1 混合后 (总量为 1 μ g/mL), 进行转染。将 IL-2/15 嵌合体 2 和 sushi-hIgG4Fc 按质量比 1:1 混合后 (总量为 1 μ g/mL), 进行转染。

1.3.3 换液

在 115 rpm, 36.8℃, 5% CO₂ 培养 4 h 后, 800 g 5 min 离心, 换成未添加 Pluronic™ F-68 和 G418 的 FreeStyle™ 293 Expression Medium。

1.3.4 表达培养和收获

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

1.4 纯化制备

IL-2/15 嵌合体 1 分别和 sushi-hIgG1Fc、sushi-hIgG4Fc 以及 sushi-mIgG2aa.1Fc 共表达, 在表达过程中能够形成异源二聚体的复合物, 分别命名为复合物 1、复合物 2、复合物 3, 三种复合物都带有 Fc 标签。利用 Mabselect sure (Protein A, GE healthcare) 进行亲和纯化, 纯化方法参照纯化填料说明书; 然后再经过凝胶过滤层析 (Superdex200 pg, GE Healthcare) 进行进一步纯化得到纯度较高的蛋白, 并去除聚合体。利用高效液相色谱分子筛柱子 (SEC-HPLC) 进行纯度分析, 结果如图 1 (a~c) 所示, 纯化后蛋白 SEC 主峰为单一峰, 说明 IL-2/15 嵌合体 1 和三种 sushi-Fc 分别都形成了复合物, 且纯度较好, 聚合物和片段整体小于 5%, 利用液相质谱法分析可见, 纯化后的蛋白含有两种组分, 分别为 sushi-Fc 和 IL-2/15, 说明蛋白表达及纯化成功。IL-2/15 嵌合体 2 也和 sushi-hIgG4Fc 共表达形成了复合物, 并被纯化出来 (如图 2 所示)。

实施例 2 从大肠杆菌中制备 IL-2/15 嵌合体

2.1 表达质粒的合成和构建

委托苏州金唯智生物科技有限公司合成 IL-2/15 嵌合体 1 基因片段 (SEQ ID NO.26), 并克隆到 pET41a 载体的 NdeI 和 XhoI 位点之间, 从而得到表达所用质粒, 编号为 1187。

2.2 IL-2/15 嵌合体在大肠杆菌中的表达以及纯化

按照《分子克隆》提到的操作方法, 进行质粒提取, 转化表达菌株 BL21 (DE3)。按照蛋白原核表达常规方法进行 IL-2/15 嵌合体 1 的表达。之后通过经典的变复性技术和层析色谱法等技术 (如参见: Yunier Rodríguez-Álvarez et al, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 47:9, 889-900) 纯化得到较纯的嵌合体蛋白。

实施例 3 IL-2/15 嵌合体与 IL2R α 和 IL2/15R β 的结合力测定

采用生物膜干涉技术 (biolayer interferometry, BLI) 测定目的蛋白与受体间的亲和力, 方法参见 (Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAb, 2013.5(2):p.270-8) 进行。实验所用受体蛋白 IL-15R α -his、IL2R α -his 和 IL2/15R β -Fc/Fc 均为本公司生产, 无 IL2R α 结合 IL-2 衍生物和无 IL2R

α 结合 IL-2 复合物均根据专利公开文本 CN111018961A 的记载制备。IL-15(N72D)/sushi-hIgG1Fc 复合物按照文献(K.-p. Han et al. / Cytokine 56 (2011) 804 - 810)制备完成。缓冲液配方为 10mM HEPES、150mM NaCl、3 mM EDTA、0.1% BSA 和 0.05% tween20; 受体蛋白都预先分别固定化在相应的传感器上, 然后按照建立的方法(参见 Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. Mabs, 2013. 5(2): p.270-8), 以基线(baseline), 载入(loading), 基线(baseline), 联合(Association)和解离(Dissociation)的步骤进行。数据获取和分析工作分别采用 Fortebio Octet RED96 软件 Data acquisition 11.0 和 Data analysis 11.0 进行。结果如表 1 所示(数值越小亲和力越强), 相比于 IL-2, IL-2/15 嵌合体 1、IL-2/15 嵌合体 1-sushi-Fc(复合物 1、复合物 2 或复合物 3)不与 IL2R α 受体结合; 相比于 IL-15, IL-2/15 嵌合体 1 与 IL-15R α 受体的亲和力下降不到 10 倍, 而复合物 1、复合物 2 或复合物 3 与 IL-15R α 不结合; 对于与 IL2/15R β 的亲和力比较, IL-2/15 嵌合体 1 要明显弱于 IL-15, 稍弱于 IL-2, 而复合物 1、复合物 2 或复合物 3 的亲和力要强于 IL-2 或 IL-15, 但要弱于 IL-15(N72D)/sushi-hIgG1Fc 复合物。

表 1

蛋白名称	与 IL2R α 的亲和力 (M)	与 IL15R α 的亲和力 (M)	与 IL2/15R β 的亲和力 (M)
IL-2	8.21E-9	N.B	2.23E-7
IL-15	N.B	2.08E-10	6.78E-8
无 IL2R α 结合 IL-2 衍生物	N.B	N.B	2.8E-7
无 IL2R α 结合 IL-2 复合物	N.B	N.B	1.95E-8
复合物 1	N.B	N.B	3.37E-10
复合物 2	N.B	N.B	6.54E-10
复合物 3	N.B	N.B	5.12E-10
IL-15(N72D)/sushi-hIgG1Fc 复合物	N.B.	N.B	5.56E-11
IL-2/15 嵌合体 1	N.B.	3.89E-9	9.73E-7

注: N.B., no binding, 在 100nM 下不结合。

实施例 4 促进 T 细胞的增殖实验

CTL-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。本实施例通过 CTLL-2 细胞的增殖实验检测实施例 1 制备的 IL-2/15 嵌合体 1 的生物活性。用含有 FBS 和 Rat-T-Stim 的培养液重悬 CTLL-2 细胞（购自 ATCC，货号 No. ATCC® TIB-214™），将定量至 21000 个/孔的 CTLL-2 细胞接种于 96 孔培养板，同时将阳性对照（IL-2）和待测样品复合物 1 蛋白分别做倍比稀释，加入孔板中，起始工作浓度为 0.0078125 nM，每个稀释浓度均设 3 复孔。另设培养液对照孔（100 μL 细胞+100 μL 培养液）。37 度，5%CO₂ 孵育 72 小时，之后每孔加入 20μl CellTiter96® AQueous One Solution Reagent（购自 Promega，货号 Cat# G3581），37℃，5%CO₂ 孵育 2~4 小时，用酶标测定仪于波长 490 nm 测吸光值（A）并计算 EC50 值，结果如表 2 及图 3 所示，复合物 1 蛋白具有明显的促进 CTLL-2（T 细胞）增殖活性，且活性要高于阳性对照 IL-2。

表 2 各组 EC50 值

	阳性对照 (IL-2)	复合物 1
EC50 nM	0.07011	0.03469

实施例 5 促进 Mo7e 细胞的增殖实验

Mo7e 细胞株（表达 IL-2/15R β 和 γ 受体）于 37℃, 5% CO₂ 条件下培养于完全培养基（RPMI1640+10%FBS+GM-CSF(10 ng/mL)）。收获处于对数生长期的细胞。使用 PBS 洗涤细胞两次，洗掉细胞因子，然后用不含细胞因子的培养基重悬细胞。使用不含细胞因子的培养基调整细胞密度，随后接种于 96 孔细胞培养板，每孔接种 90 μL，共 5000 个细胞。将 96 孔板中的细胞置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养，待用。配制 10 倍药物溶液，使得最后工作浓度为 0.020116 μM，9 个浓度，3.16 倍稀释，然后转移连续稀释样品各 10 μL 至 96 孔细胞板的相应实验孔中，每个药物浓度设置三个复孔。将已加药的 96 孔板中的细胞置于 37℃、5% CO₂ 条件下继续培养 72 小时，之后进行 CTG（Celltiter Glo assay kit, Promega）分析。每孔加入等体积的 CTG 溶液。将细胞板放置于室温 20 分钟以稳定冷光信号。读取冷光值，收集数据。使用 GraphPad Prism 7.0 软件分析数据，利用非线性 S 曲线回归来拟合数据得出剂量-效应曲线，并由此计算 EC50 值。

$$\text{细胞存活率(\%)} = (\text{Lum}_{\text{待测药}} - \text{Lum}_{\text{培养基对照}}) / (\text{Lum}_{\text{溶剂对照}} - \text{Lum}_{\text{培养基对照}}) \times 100\%.$$

本实验中 hIgG1 和 hIgG4 作为对照，都不能促进细胞的增殖。从结果上看，单独 IL-2/15 嵌合体 1 活性介于 IL-15 和 IL-2 之间，比 IL-15 活性低 10 倍左右；而 IL-2/15 嵌合体 1 与 sushi 的复合物活性要弱于 IL-15(N72D)/ sushi-hIgG1Fc 复合物。由于早先的关于 IL-2/15R β γ 受体激动剂在临床上出现过活性太高而

导致的药物毒性,所以有可能 IL-2/15 嵌合体 1 与 sushi 的复合物的安全性更好。

表 3 促 Mo7e 细胞增殖实验结果

蛋白名称	EC50 (nM)
IL-2	2.557
IL-15	0.267
复合物 2	0.329
复合物 3	0.319
IL-15(N72D)/sushi-hIgG1Fc 复合物	0.090
IL-2/15 嵌合体 1	2.251
hIgG1 对照	N/A
hIgG4 对照	N/A

实施例 6 在食蟹猴中的预毒理试验

实验分为两个组别,分别为复合物 2 和 IL-15(N72D)/sushi-hIgG1Fc 复合物组别,每个组别随机分有雄性和雌性各一只,给药剂量为 1 mg/kg,静脉注射,每周给药一次,共给药两次,每天观察动物临床表现,并进行称重,分析药物是否耐受。

经过实验发现,复合物 2 组雌性动物在 D2-D4 天有黄色少量稀便,但雌雄 14 天的体重都比较稳定(如图 4 所示),显示 1mg/kg 的剂量是耐受的;而 IL-15(N72D)/sushi-hIgG1Fc 复合物组的雌、雄动物在 D3-D4 天时精神不振、自发活动减少、黄色少量/中量稀便、眼窝凹陷,并在 D4 时死亡,显示在 1 mg/kg 的剂量是不耐受的。

实施例 7 IL-2/15 嵌合体复合物在小鼠皮肤黑色素瘤 B16F10 皮下移植 C57BL/6 小鼠肿瘤模型中的药效学评价

将 B16F10 细胞悬液 5.0×10^6 细胞/mL,吹打至均匀,置于冰上。小鼠右侧后肢剔除体毛并用碘伏棉球消毒,用 1 mL 注射器在小鼠右侧后肢皮下接种 0.1 mL 细胞悬液, 5×10^5 细胞/点。接种肿瘤细胞当日,依据动物体重随机分为 3 组,每组 5 只。分组当日视为实验 Day0,分组后第二日(Day1)开始给药。给药及分组信息见下表 4。

表 4 分组及给药信息

组别	动物数	化合物治疗	剂量 (mg/kg)	给药体积 (μL/g)	给药途径	给药频次
----	-----	-------	------------	-------------	------	------

1	5	溶媒 (PBS)	--	10	i.v.	BIW Day1,Day4, Day8,Day11,Day15,Day18
2	5	复合物 2	2	10	i.v.	BIW Day1,Day4, Day8,Day11,Day15,Day18
3	5	复合物 3	2	10	i.v.	BIW Day1,Day4, Day8,Day11,Day15,Day18

在肿瘤接种后，日常检查动物的肿瘤生长情况、活动能力、饮食、体重、眼睛、毛发和其他异常行为，并相应给予人道终点。分组给药后，每周测量 2 次动物肿瘤体积。肿瘤体积测量采用双向测量法，首先利用游标卡尺测量肿瘤长短径，再使用公式 $T = 0.5 \times a \times b^2$ 计算肿瘤体积。 a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。

相对肿瘤抑制率 TGI (%)：TGI=1-T/C (%)。T/C %为相对肿瘤增殖率，即在某一时间点，治疗组和对照组相对肿瘤体积或瘤重的百分比值。T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的相对肿瘤体积 (RTV)。计算公式如下：T/C % = TRTV / CRTV × 100% (TRTV：治疗组平均 RTV；CRTV：溶媒对照组平均 RTV；RTV=V_t-V₀，V₀为分组时该动物的瘤体积，V_t为治疗后该动物的瘤体积)。

结果如图 5 所示，本实验中在小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞皮下接种的 C57BL/6 雌性小鼠模型中验证了受试药单独给药的药效。其中：G1 对照组动物至 Day13，动物平均肿瘤体积为 2942±545.3 mm³。G2 复合物 2 2 mg/kg BIW 给药至 Day13，该组 TGI%=95%，与对照组相比呈极显著性差异 ($p<0.01$)。G3 复合物 3 2 mg/kg BIW 给药至 Day13，该组 TGI%=92%，与对照组相比呈极显著性差异 ($p<0.01$)。通过数据表明，在小鼠黑色素瘤肿瘤细胞 B16F10 接种的 C57BL/6 小鼠模型上给药 13 天实验中，复合物 2 或复合物 3 受试药均呈现强药效，与对照组相比都具有统计学差异 ($p<0.01$)；而复合物 2 和复合物 3 未呈现出差异，都具有明显的抑瘤作用。

权 利 要 求 书

1、经修饰的 IL-2 分子,其特征在于,所述修饰包括使用 IL-15 分子中介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域取代 IL-2 分子中介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域,所述 IL-15 分子中介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包含 9 个以上的氨基酸残基。

2、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子,其特征在于,所述修饰能够降低所述经修饰的 IL-2 分子与 IL2R α 的亲合力。

3、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子,其特征在于,所述修饰能够消除所述经修饰的 IL-2 分子与 IL2R α 的亲合力。

4、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子,其特征在于,所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域包括环 M 或其变体,所述环 M 包含如 SEQ ID NO. 1 所示的序列。

5、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子,其特征在于,所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域包括环 N 或其变体,所述环 N 包含如 SEQ ID NO. 5 所示的序列。

6、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子,其特征在于,所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域包括螺旋 B 或其变体,所述螺旋 B 包含如 SEQ ID NO. 2 所示的序列。

7、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子,其特征在于,所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域包括环 M 或其变体、螺旋 B 或其变体,所述环 M 包含如 SEQ ID NO. 1 所示的序列,所述螺旋 B 包含如 SEQ ID NO. 2 所示的序列。

8、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子,其特征在于,所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域包括螺旋 B 或其变体、环 N 或其变体,所述螺旋 B 包含如 SEQ ID NO. 2 所示的序列,所述环 N 包含如 SEQ ID NO. 5 所示的序列。

9、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子,其特征在于,所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域包括环 M 或其变体、环 N 或其变体,所述环 M 包含如 SEQ ID NO. 1 所示的序列,所述环 N 包含如 SEQ ID NO. 5 所示的序列。

10、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子,其特征在于,所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域自 N 端至 C 端依次包含:环 M 或其变体、螺旋 B 或其变体、环 N 或其变体,所述环 M 包含如 SEQ ID NO. 1 所示的序列,所述螺旋 B 包含如 SEQ ID NO. 2 所示的序列,所述环 N 包含如 SEQ ID NO. 5 所示的序列。

11、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子,其特征在于,所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包括环 m 或其变体,所述环 m 包含如 SEQ ID NO. 8 所

示的序列。

12、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包括环 n 或其变体，所述环 n 包含如 SEQ ID NO. 12 所示的序列。

13、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包括螺旋 b 或其变体，所述螺旋 b 包含如 SEQ ID NO. 9 所示的序列。

14、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包括环 m 或其变体、螺旋 b 或其变体，所述环 m 包含如 SEQ ID NO. 8 所示的序列，所述螺旋 b 包含如 SEQ ID NO. 9 所示的序列。

15、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包括螺旋 b 或其变体、环 n 或其变体，所述螺旋 b 包含如 SEQ ID NO. 9 所示的序列，所述环 n 包含如 SEQ ID NO. 12 所示的序列。

16、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域包括环 m 或其变体、环 n 或其变体，所述环 m 包含如 SEQ ID NO. 8 所示的序列，所述环 n 包含如 SEQ ID NO. 12 所示的序列。

17、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域自 N 端至 C 端依次包含：环 m 或其变体、螺旋 b 或其变体、环 n 或其变体，所述环 m 包含如 SEQ ID NO. 8 所示的序列，所述螺旋 b 包含如 SEQ ID NO. 9 所示的序列，所述环 n 包含如 SEQ ID NO. 12 所示的序列。

18、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，所述修饰包括使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 m 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 M 或其变体，所述环 m 包含如 SEQ ID NO. 8 所示的序列，所述环 M 包含如 SEQ ID NO. 1 所示的序列。

19、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，所述修饰包括使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的螺旋 b 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的螺旋 B 或其变体，所述螺旋 b 包含如 SEQ ID NO. 9 所示的序列，所述螺旋 B 包含如 SEQ ID NO. 2 所示的序列。

20、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，所述修饰包括使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 n 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 N 或其变体，所述环 n 包含如 SEQ ID NO. 12 所示的序列，所述环 N 包含如 SEQ ID NO. 5 所示的序列。

21、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，所述修饰包括使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 m 或其变体取代所述介导 IL-2

分子与 IL2R α 结合的区域内的环 M 或其变体, 以及, 使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的螺旋 b 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的螺旋 B 或其变体, 所述环 m 包含如 SEQ ID NO. 8 所示的序列, 所述环 M 包含如 SEQ ID NO. 1 所示的序列, 所述螺旋 b 包含如 SEQ ID NO. 9 所示的序列, 所述螺旋 B 包含如 SEQ ID NO. 2 所示的序列。

22、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子, 其特征在于, 所述修饰包括使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的螺旋 b 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的螺旋 B 或其变体, 以及, 使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 n 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 N 或其变体, 所述螺旋 b 包含如 SEQ ID NO. 9 所示的序列, 所述螺旋 B 包含如 SEQ ID NO. 2 所示的序列, 所述环 n 包含如 SEQ ID NO. 12 所示的序列, 所述环 N 包含如 SEQ ID NO. 5 所示的序列。

23、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子, 其特征在于, 所述修饰包括使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 m 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 M 或其变体, 以及, 使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 n 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 N 或其变体, 所述环 m 包含如 SEQ ID NO. 8 所示的序列, 所述环 M 包含如 SEQ ID NO. 1 所示的序列, 所述环 n 包含如 SEQ ID NO. 12 所示的序列, 所述环 N 包含如 SEQ ID NO. 5 所示的序列。

24、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子, 其特征在于, 所述修饰包括使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 m 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 M 或其变体、使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的螺旋 b 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的螺旋 B 或其变体, 以及, 使用所述介导 IL-15 分子与 IL15R α 结合的区域内的环 n 或其变体取代所述介导 IL-2 分子与 IL2R α 结合的区域内的环 N 或其变体。

25、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子, 其特征在于, 所述修饰使得所述经修饰的 IL-2 分子能够与 IL15R α 或 IL15R α 的 sushi 结构域结合。

26、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子, 其特征在于, 所述修饰还包括使用 IL-15 分子中的环 x 或其变体取代 IL-2 分子中的环 X 或其变体, 所述环 x 包含如 SEQ ID NO. 10 所示的序列, 所述环 X 包含如 SEQ ID NO. 3 所示的序列。

27、如权利要求 1 所述的经修饰的 IL-2 分子, 其特征在于, 所述修饰还包括使用 IL-15 分子中的螺旋 c 或其变体取代 IL-2 分子中的螺旋 C 或其变体, 所述螺旋 c 包含如 SEQ ID NO. 11 所示的序列, 所述螺旋 C 包含如 SEQ ID NO. 4 所示的序列。

28、如权利要求 26 或 27 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，与不包含所述取代的 IL-2 分子相比，所述取代能够提高所述的经修饰的 IL-2 分子的稳定性。

29、如权利要求 1-27 中任一项所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，所述修饰还包括在 IL-2 分子的螺旋 D 区域进行氨基酸置换，置换后的氨基酸能够与所述螺旋 b 中的第 43 位苯丙氨酸形成芳香环相互作用从而稳定疏水内核，其中氨基酸的位置以天然 IL-15 分子氨基酸序列为基础，根据 KABAT 编号的 EU 索引确定；所述螺旋 D 包含如 SEQ ID NO. 6 所示的序列。

30、如权利要求 29 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，所述天然 IL-15 分子氨基酸序列如 SEQ ID NO. 13 所示。

31、如权利要求 29 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，所述氨基酸置换包括 W121F，其中氨基酸的位置以天然 IL-2 分子氨基酸序列为基础，根据 KABAT 编号的 EU 索引确定。

32、如权利要求 31 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，所述天然 IL-2 分子氨基酸序列如 SEQ ID NO. 7 所示。

33、如权利要求 32 所述的经修饰的 IL-2 分子，其特征在于，包含如 SEQ ID NO. 14 所示的序列。

34、蛋白异二聚体，其特征在于，包括如权利要求 1-32 中任一项所述的经修饰的 IL-2 分子，以及 IL15R α 或其变体。

35、如权利要求 34 所述的蛋白异二聚体，其特征在于，所述 IL15R α 包含如 SEQ ID NO. 16 所示的序列。

36、蛋白异二聚体，其特征在于，包括如权利要求 1-32 中任一项所述的经修饰的 IL-2 分子，以及 IL15R α 受体的 sushi 结构域或其变体。

37、如权利要求 35 所述的蛋白异二聚体，其特征在于，所述 sushi 结构域包含如 SEQ ID NO. 15 或 SEQ ID NO. 20 所示的序列。

38、如权利要求 34 或 35 所述的蛋白异二聚体，其特征在于，所述蛋白异二聚体不与 IL2R α 受体结合，并且和 IL-2 分子相比与 IL2R β 具有更高的亲和力，所述 IL-2 分子包括天然 IL-2 分子及其功能性变体。

39、如权利要求 34 所述的蛋白异二聚体，其特征在于，所述 IL15R α 变体包含 Fc 片段。

40、如权利要求 39 所述的蛋白异二聚体，其特征在于，所述 Fc 片段位于所述 IL15R α 的 C 端。

41、如权利要求 39 或 40 所述的蛋白异二聚体，其特征在于，所述 Fc 包括人 IgG1Fc、人 IgG4Fc 和鼠 IgG2aa.1Fc 中的任意一种。

42、如权利要求 40 所述的蛋白异二聚体，其特征在于，所述 Fc 包含如 SEQ ID

NO. 18 所示的序列。

43、如权利要求 36 或 37 所述的蛋白异二聚体，其特征在于，所述蛋白异二聚体不与 IL2R α 受体结合，并且和 IL-2 分子相比与 IL2R β 具有更高的亲和力，所述 IL-2 分子包括天然 IL-2 分子及其功能性变体。

44、如权利要求 36 所述的蛋白异二聚体，其特征在于，所述 sushi 结构域变体包含 Fc 片段。

45、如权利要求 44 所述的蛋白异二聚体，其特征在于，所述 Fc 片段位于所述 sushi 结构域的 C 端。

46、如权利要求 44 或 45 所述的蛋白异二聚体，其特征在于，所述 Fc 包括人 IgG1Fc、人 IgG4Fc 和鼠 IgG2aa.1Fc 中的任意一个。

47、如权利要求 45 所述的蛋白异二聚体，其特征在于，所述 Fc 包含如 SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 24 或 SEQ ID NO. 25 所示的序列。

48、如权利要求 45 所述的蛋白异二聚体，其特征在于，包含如 SEQ ID NO. 14 所示的序列，以及如 SEQ ID NO. 19、SEQ ID NO. 21 或 SEQ ID NO. 22 所示的序列。

49、核酸分子，其特征在于，其编码权利要求 1-33 中任一项所述的经修饰的 IL-2 分子。

50、核酸分子组合，其特征在于，其编码 a) 权利要求 1-33 中任一项所述的经修饰的 IL-2 分子，以及 b) 权利要求 34-48 中的任一项中所述的 IL15R α 或其变体，或所述的 sushi 结构域或其变体。

51、载体，其特征在于，包含权利要求 49 所述的核酸分子，或权利要求 48 所述的核酸分子组合。

52、如权利要求 51 所述的载体，其特征在于，编码权利要求 1-33 中任一项所述的经修饰的 IL-2 分子的核酸分子与编码权利要求 34-48 中的任一项中所述的 IL15R α 或其变体，或所述的 sushi 结构域或其变体的核酸分子位于同一载体中。

53、如权利要求 52 所述的载体，其特征在于，包括第一载体和第二载体，所述第一载体包含编码权利要求 1-33 中任一项所述的经修饰的 IL-2 分子的核酸分子，所述第二载体包含编码权利要求 34-48 中的任一项中所述的 IL15R α 或其变体，或所述的 sushi 结构域或其变体的核酸分子。

54、细胞，其特征在于，包含权利要求 1-33 中任一项所述的经修饰的 IL-2 分子、权利要求 34-48 中任一项所述的蛋白异二聚体、权利要求 49 所述的核酸分子、权利要求 50 所述的核酸分子组合或权利要求 51-53 中任一项所述的载体。

55、药物组合物，其特征在于，包含权利要求 1-33 中任一项所述的经修饰的 IL-2 分子、权利要求 34-48 中任一项所述的蛋白异二聚体、权利要求 49 所述的核

酸分子、权利要求 50 所述的核酸分子组合、权利要求 51-53 中任一项所述的载体或权利要求 53 中所述的细胞。

56、权利要求 1-33 中任一项所述的经修饰的 IL-2 分子、权利要求 34-48 中任一项所述的蛋白异二聚体、权利要求 49 所述的核酸分子、权利要求 49 所述的核酸分子组合、权利要求 51-53 中任一项所述的载体、权利要求 54 中所述的细胞用于制备药物的用途，其特征在于，所述药物用于预防和/或治疗肿瘤。

57、如权利要求 56 所述的用途，其特征在于，所述肿瘤包括肛门癌、胆道癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胃癌、结肠癌、头颈部鳞状细胞癌、肝癌、实体瘤、黑色素瘤、默克尔细胞癌、间皮瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、肾细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、小细胞肺癌、胸腺癌、甲状腺癌、结肠癌和/或黑色素瘤。