

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023年3月30日 (30.03.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/045977 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/55 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/120265

(22) 国际申请日: 2022年9月21日 (21.09.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202111110032.3 2021年9月22日 (22.09.2021) CN

(71) 申请人: 信达生物制药(苏州)有限公司 (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 何开杰(HE, Kaijie); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。付凤根(FU, Fenggen); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。伍伟伟(WU, Weiwei); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。周帅祥(ZHOU, Shuaixiang); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。关剑(GUAN, Jian); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所(ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街26号新时代大厦7层, Beijing 100034 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

(54) Title: INTERLEUKIN-2 MUTANT AND FUSION PROTEIN THEREOF

(54) 发明名称: 白介素2突变体及其融合蛋白

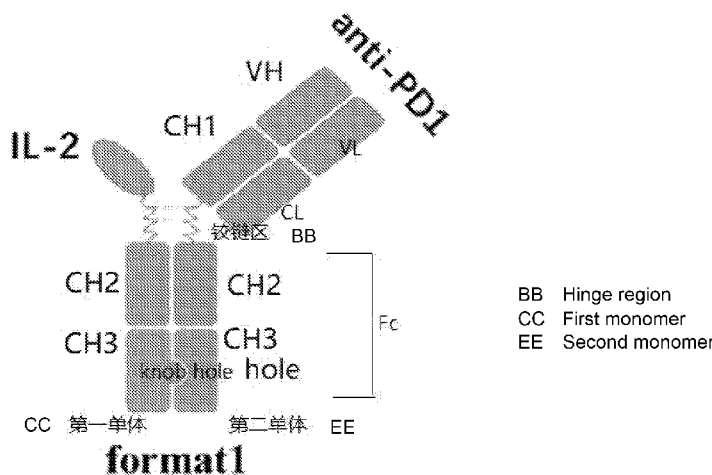


图 1.A

(57) Abstract: Disclosed are a new interleukin-2 (IL-2) mutant protein and the use thereof. Compared with wild-type IL-2, the IL-2 mutant protein has improved properties, such as an improved IL-2 receptor binding property and improved druggability. Also provided are a fusion protein, dimer and immunoconjugate comprising the IL-2 mutant protein, nucleic acids encoding the IL-2 mutant protein, the dimer and the immunoconjugate, and a vector and host cell comprising the nucleic acid. Further provided are methods for preparing the IL-2 mutant protein, the fusion protein, the dimer and the immunoconjugate, a pharmaceutical composition containing same, and the therapeutic use thereof.

(57) 摘要: 提供了新型白介素2(IL-2)突变蛋白及其用途, 其与野生型IL-2相比, 具有改善的性质, 例如, 改善的IL-2受体结合性质和改善的成药性的IL-2突变蛋白。还提供包含该IL-2突变蛋白的融合蛋白、二聚体、免疫缀合物以及编码该IL-2突变蛋白、二聚体、免疫缀合物的核酸、包含该核酸的载体和宿主细胞。进一步提供制备该IL-2突变蛋白、融合蛋白、二聚体和免疫缀合物的方法、包含其的药物组合物和治疗用途。

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

白介素 2 突变体及其融合蛋白

技术领域

本发明涉及新型白介素 2(IL-2)突变蛋白及其用途。具体地,本发明涉及,与野生型 IL-2 相比,具有改善的性质,例如,改善的 IL-2 受体结合性质和改善的成药性的 IL-2 突变蛋白。本发明还提供包含该 IL-2 突变蛋白的融合蛋白、二聚体、免疫缀合物,以及编码该 IL-2 突变蛋白、二聚体、免疫缀合物的核酸、包含该核酸的载体和宿主细胞。更具体地,本发明尤其提供一种包含 IL-2 突变蛋白和抗 PD-1 抗体的免疫缀合物。本发明进一步提供制备该 IL-2 突变蛋白、融合蛋白、二聚体和免疫缀合物的方法、包含其的药物组合物和治疗用途。

背景技术

白介素-2(IL-2),也称作 T 细胞生长因子(TCGF),是一种主要由活化的 T 细胞,尤其是 CD4⁺ T 辅助细胞产生的多功能细胞因子。在真核细胞中,人 IL-2(uniprot:P60568)作为 153 个氨基酸的前体多肽合成,在去除 N 端 20 个氨基酸后,产生成熟的分泌性 IL-2。其它物种的 IL-2 的序列也已经公开,参见 NCBI Ref Seq No. NP032392(小鼠)、NP446288(大鼠)或 NP517425(黑猩猩)。

白介素 2 具有 4 个反平行的、两亲性 α 螺旋,此 4 个 α 螺旋形成其功能必不可少的四级结构(Smith,Science 240,1169-76(1988); Bazan,Science257,410-413(1992))。在大多数情况下,IL-2 通过三种不同受体起作用:白介素 2 受体 α (IL-2R α ; CD25)、白介素 2 受体 β (IL-2R β ; CD122)和白介素 2 受体 γ (IL-2R γ ; CD132)。IL-2R β 和 IL-2R γ 对于 IL-2 的信号传导至关重要,而 IL-2R α (CD25)对于信号传导不是必需的,但可以赋予 IL-2 对受体的高亲和力结合(Krieg 等,Proc Natl Acad Sci 107,11906-11(2010))。由 IL-2R α , β , 和 γ 联合形成的三聚体受体(IL-2 $\alpha\beta\gamma$)为 IL-2 高亲和力受体(KD 约 10pM),由 β 和 γ 组成的二聚体受体(IL-2 $\beta\gamma$)为中间亲和力受体(KD 约 1nM),单独由 α 亚基形成的 IL-2 受体为低亲和力受体。

免疫细胞表达二聚体或三聚体 IL-2 受体。二聚体受体在细胞毒性 CD8⁺ T 细胞和天然杀伤细胞(NK)上表达,而三聚体受体主要在激活的淋巴细胞和 CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ 抑制性调节 T 细胞(Treg)上表达(Byman, O.和 Sprent. J. Nat. Rev. Immunol. 12, 180-190(2012))。由于静息状态的效应 T 细胞和 NK 细胞在细胞表面上没有 CD25,故对于 IL-2 相对不敏感。而 Treg 细胞在体内一贯表达最高水平的 CD25,因此,正常情况下 IL-2 会优先刺激 Treg 细胞增殖。

IL-2 通过与不同细胞上 IL-2 受体的结合,在免疫反应中介导多重作用。一方面,IL-2 具有免疫系统刺激作用,可以刺激 T 细胞和天然杀伤(NK)细胞增殖和分化。因此,IL-2 已经被批准作为免疫治疗剂用于癌症和慢性病毒感染的治疗。而另一方面,IL-2 也可以促进免疫抑制性 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞(即, Treg 细胞)的维持(Fontenot 等,Nature Immunol 6,1142-51(2005); D'Cruz 和 Klein,Nature Immunol 6,1152-59(2005); Maloy 和 Powrie,Nature Immunol6,1171-72(2005)),在患者中引起由激活的 Treg 细胞导致的免疫抑制。

此外,多年的临床实践经验发现,尽管高剂量 IL-2 能在癌症例如黑色素瘤和肾癌治疗中带来显著的临床药效,但是同时也会造成药物相关的严重毒副作用,包括血管渗漏综合症和低血压等心血管系统毒性。研究表明,这些毒性很有可能是由于 IL-2 对淋巴细胞(尤其是 T 细胞和 NK 细胞)的过度激活,刺激释放炎症因子所致。例如,这会导致血管内皮细胞收缩,增大细胞间的间隙,造成组织液外流,从而引起血管渗漏副作用。

临床上使用 IL-2 的另外一个限制性问题是其极短的半衰期导致给药的困难。由于 IL-2 分子量只有 15KDa,会主要通过肾小球的过滤作用进行清除,人体半衰期只有 1 小时左右。为了达到足够高的人体暴露量,在临床上需要每隔 8 小时输注一次大剂量 IL-2。然而,频繁的给药不仅给病人带来很重的负担,更重要的是大剂量输注 IL-2 会造成很高的峰值血药浓度

(Cmax), 这很可能是造成药物毒性的另外一个关键因素。

已经采取数种办法来克服这些与 IL-2 免疫疗法有关的问题。例如,已经发现在体内 IL-2 与某些抗 IL-2 单克隆抗体的组合增强 IL-2 的治疗效果(Kamimura et al., J Immunol 177, 306-14(2006); Boyman et al., Science 311, 1924-27(2006))。还提出了一些 IL-2 分子的改造方案。例如, Helen R.Mott 等公开了具有消除的 IL-2R α 结合能力的人 IL-2 的突变蛋白 F42A。Rodrigo Vazquez-Lombardi 等人(Nature Communications, 8:15373, DOI: 10.1038/ncomms15373) 也提出一种具有消除的 IL-2R α 结合能力的三重突变人 IL-2 突变蛋白 IL-2^{3X}, 该蛋白在氨基酸残基位置 38,43 和 61 分别具有残基突变 R38D+K43E+E61R。CN1309705A 公开了导致 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ 结合降低的 D20、N88 和 Q126 位置的突变。这些突变蛋白在药代动力学和/或药效学性质方面仍有缺陷, 并且在哺乳动物细胞中表达时也存在表达量低和/或分子稳定性较差的问题。

编程性细胞死亡蛋白 1(PD-1 或 CD279)是 CD28 受体家族的一个抑制性成员,该家族还包括 CD28,CTLA-4,ICOS 和 BTLA。PD-1 是一种细胞表面受体且在激活的 B 细胞,T 细胞,和髓样细胞上表达。PD-1 的结构是一种单体 1 型跨膜蛋白,由免疫球蛋白可变样胞外域和含有免疫受体基于酪氨酸的抑制性基序(ITIM)和免疫受体基于酪氨酸的转换基序(ITSM)的胞质域组成。已经鉴定出 PD-1 的两种配体,PD-L1 和 PD-L2,它们显示在结合 PD-1 后下调 T 细胞激活。PD-L1 和 PD-L2 均是 B7 同系物,结合 PD-1 但不结合其它 CD28 家族成员。PD-1 的一种配体,PD-L1 在多种人癌症中是丰富的。PD-1 和 PD-L1 之间的相互作用导致肿瘤浸润性淋巴细胞减少,T 细胞受体介导的增殖降低,和癌性细胞的免疫逃脱。

本领域已知多种结合 PD-1 的抗体,例如在 WO2017024465A1 中公开的 PD-1 抗体。

因此,本领域需要进一步开发具有改善性质(例如降低的与其受体的结合,改善的成药性等)的新的 IL-2 分子,特别是与 PD-1 抗体的免疫缀合物。

发明内容

本发明涉及以下实施方案:

1.一种免疫缀合物,其包含(i)结合 PD-1 的抗体和(ii)IL-2 突变蛋白,所述突变蛋白,与野生型 IL-2(优选人 IL-2,更优选包含 SEQ ID NO: 3 序列的 IL-2)相比,包含突变:

(i) 在 IL-2 与 IL-2R α 结合界面上,尤其是在位置 35 和/或 42 上,具有消除或降低对 IL-2R α 受体的结合亲和力的突变;

和/或

(ii) 在 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面上,尤其是在选自位置 88、127 和/或 130 的至少一个位置上,具有弱化对 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合的突变;

以及

(iii) 缩短的 B'C'环区(即,连接氨基酸残基 aa72 和 aa84 的序列),优选地,所述缩短的环区具有小于 10, 9, 8, 7, 6, 或 5 个的氨基酸长度,且优选 7 个氨基酸长度;优选地,所述缩短的 B'C'环区导致改善的蛋白表达量和/或纯度,以及

任选地(iv)在 IL-2 的 N 末端,尤其是在位置 3 上,具有去除 IL2 N 末端的 O 糖修饰的突变,其中氨基酸位置根据 SEQ ID NO: 3 编号。

2.根据实施方案 1 的免疫缀合物,其中所述突变蛋白,相对于野生型 IL-2,包含:

(i) N88D;

N88R;

N88R + S130R;

F42A+N88R + S127E;

F42A+N88R + S127E; 或

K35E+N88R + S127E;

和

(ii)B'C'环区序列 AGDASIH 或 AQSKNFH;

以及任选地(iii)T3A。

3. 根据实施方案 1 的免疫缀合物, 其中所述 IL-2 突变蛋白包含 SEQ ID NO: 4、23、25、27、29 或 31 的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由其组成。

4. 根据实施方案 1-3 中任一项的免疫缀合物, 其中所述免疫缀合物包含:

第一单体, 其包含与 Fc 片段融合的 IL-2 突变蛋白; 和

第二单体, 其包含特异性结合 PD-1 的抗体或其片段, 优选地, 所述片段包含所述抗 PD-1 抗体的一条重链和一条轻链。

5. 根据实施方案 4 的免疫缀合物, 其中第一单体的 Fc 片段中包含 Knob 突变, 第二单体的抗体重链中包含 hole 突变, 或者第一单体的 Fc 片段中包含 hole 突变, 第二单体的抗体重链中包含 knob 突变。

6. 根据实施方案 4 或 5 的免疫缀合物, 其中所述第一单体中的 Fc 片段是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 片段, 优选地包含 SEQ ID NO:6、42 或 43 的氨基酸序列或由其组成。

7. 根据实施方案 4-6 中任一项的免疫缀合物, 其中所述与 Fc 片段融合的 IL-2 突变蛋白包含 SEQ ID NO:7、24、26、28、30 或 32 的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由其组成。

8. 根据实施方案 4-7 中任一项的免疫缀合物, 其中所述 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含重链, 所述重链包含重链可变区, 所述重链可变区包含分别如以下氨基酸序列所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3: SEQ ID NO:9、10 和 11。

9. 根据实施方案 4-8 中任一项的免疫缀合物, 其中所述 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含轻链, 所述轻链包含轻链可变区, 其中所述轻链可变区包含分别如以下氨基酸序列所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:16、17 和 18。

10. 根据实施方案 4-9 中任一项的免疫缀合物, 其中所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含: 包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区, 和包含 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区。

11. 根据实施方案 4-9 中任一项的免疫缀合物, 其中所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含包含 SEQ ID NO:14 或 22 所示的氨基酸序列或与其具有至 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链; 和包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或与其具有至 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链。

12. 根据实施方案 1-11 任一项的免疫缀合物, 其中所述 IL-2 突变蛋白与 Fc 通过接头连接, 或所述 IL-2 突变蛋白与所述抗 PD-1 抗体通过接头连接, 优选地所述接头为(GGGGS)_n, 其中 n=1、2、3 或 4, 例如所述接头为 SEQ ID NO:5。

13. 一种分离的多核苷酸, 其编码实施方案 1-12 中任一项的免疫缀合物中的一条或多条链, 或第一单体和/或第二单体。

14. 一种表达载体, 其包含实施方案 13 的多核苷酸。

15. 一种宿主细胞, 其包含实施方案 13 的多核苷酸或实施方案 14 的载体, 优选所述宿主细胞是酵母细胞或哺乳动物细胞, 特别是 HEK293 细胞或 CHO 细胞。

16. 一种用于生产实施方案 1-12 中任一项的免疫缀合物的方法，包括，在适于表达所述免疫缀合物的条件下，培养实施方案 15 的宿主细胞。
17. 一种药物组合物，其包含实施方案 1-12 中任一项的免疫缀合物，任选地和药用辅料。
18. 实施方案 1-12 中任一项的免疫缀合物或实施方案 17 的药物组合物在制备用于预防和/或治疗癌症的药物中的用途，优选地，所述癌症是实体肿瘤或血液肿瘤，例如胃肠道肿瘤或黑色素瘤，例如结肠直肠癌或结肠癌；例如，所述癌症是 PD-1 抗体治疗耐受性癌症。
19. 实施方案 18 所述的用途，其中所述药物组合物还包含第二治疗剂。
20. 一种预防和/或治疗受试者癌症的方法，所述方法包括，向所述受试者施用实施方案 1-12 中任一项的免疫缀合物或实施方案 17 的药物组合物，优选地，所述癌症是实体肿瘤或血液肿瘤，例如胃肠道肿瘤或黑色素瘤，例如结肠直肠癌或结肠癌；例如，所述癌症是 PD-1 抗体治疗耐受性癌症。
21. 根据实施方案 20 中任一项所述的方法，其中所述突变蛋白、所述融合蛋白或所述药物组合物与第二治疗剂以组合法施用。

附图说明

图 1A 是本发明的抗 PD-1 与 IL-2 突变体的免疫缀合物的分子结构，图 1B 是分子 2124 和 3010 的 IL-2-Fc 融合蛋白的分子结构。

图 2 是 IL-2 与受体结合的晶体结构 (PDB:2ERJ)。

图 3 是免疫缀合物和对照分子与 IL-2R $\beta\gamma$ 的结合曲线。

图 4 是免疫缀合物或对照分子与 IL-2R α 的结合曲线。

图 5 是免疫缀合物或对照分子与人 PD1 的结合曲线。

图 6 是免疫缀合物或对照分子在 CTLL2WT (huPD1-) 和 CTLL2-hPD-1 (huPD1+) 中的活性测定。

图 7 是免疫缀合物或对照分子分别在 PD-1-和 PD-1+的 T 细胞群 (CD4 或 CD8) 中的活性。

图 8 显示了免疫缀合物分别在 HEK-Blue™ IL-2 Cells (huPD-1-细胞) 和过表达的 PD-1 的细胞 (HEK293+hIL2R+hPD-1/SEAP 稳转细胞系 (huPD-1+细胞)) 中的活性。

图 9A 显示了 2132 和 2063 对小鼠抗肿瘤作用的影响；图 9B 显示了 2132 和 2063 对小鼠体重的影响。

图 10A 显示了 2063 对小鼠 MC38 肿瘤的抗肿瘤作用的影响；图 10B 显示了 2063 对小鼠体重的影响。

图 11A 显示了 2063 对小鼠 B16F10 肿瘤的抗肿瘤作用的影响；图 11B 显示了 2063 对小鼠 B16F10 肿瘤的抗肿瘤作用的影响-个体肿瘤数值；图 11C 显示了 2063 对小鼠体重的影响。

图 12A 显示了 2149 对小鼠 MC38 肿瘤的抗肿瘤作用的影响；图 12B 显示了 2149 对小鼠 MC38 肿瘤的抗肿瘤作用的影响-生存曲线；图 12C 显示了 2149 对小鼠体重的影响。

图 13A 显示了 2149 对小鼠 B16F10 肿瘤的抗肿瘤作用的影响；图 13B 显示了 2149 对小鼠 B16F10 肿瘤的抗肿瘤作用的影响-个体肿瘤数值；图 13C 显示了 2149 对小鼠 B16F10 肿瘤的抗肿瘤作用的影响-生存曲线；图 13D 显示了 2149 对小鼠体重的影响。

图 14A 显示了 2061 和 2149 对小鼠 B16F10 肿瘤的抗肿瘤作用的影响-个体肿瘤数值；图 14B 显示了 2061 和 2149 对小鼠 B16F10 肿瘤的抗肿瘤作用的影响-生存曲线图；图 14C 显示了 2061 和 2149 对小鼠体重的影响。

图 15A 显示了 2214 对小鼠抗肿瘤作用的影响；图 15B 显示了 2214 对小鼠抗肿瘤作用的影响-生存曲线；图 15C 显示了 2214 对小鼠体重的影响。

图 16A 显示了 2214 对小鼠 B16F10 肿瘤的抗肿瘤作用的影响-生存曲线; 图 16B 显示了 2214 对小鼠 B16F10 肿瘤的抗肿瘤作用的影响-生存曲线; 图 16C 显示了 2214 对小鼠体重的影响。

发明详述:

I. 定义

在下文详细描述本发明前, 应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂, 因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案, 而并不意图限制本发明的范围, 其仅会由所附权利要求书限制。除非另外定义, 本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

为了解释本说明书, 将使用以下定义, 并且只要适当, 以单数形式使用的术语也可以包括复数, 并且反之亦然。要理解, 本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案, 并且不意欲是限制性的。

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。

如本文所用, 术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项。

如本文中所用, 术语“包含”或“包括”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”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。例如, 当提及“包含”或“包括”某个突变或突变组合的 IL-2 突变蛋白时, 也旨在涵盖仅具有所述突变或突变组合的 IL-2 突变蛋白。

在本文中, 野生型“白介素-2”或“IL-2”是指作为引入本发明突变或突变组合的模板的亲本 IL-2 蛋白, 优选天然存在的 IL-2 蛋白, 例如来源于人、小鼠、大鼠、非人灵长类动物的天然 IL-2 蛋白, 包括未经加工的(例如未去除信号肽)的形式和经加工的(例如去除了信号肽)的形式。包含信号肽的一个全长天然人 IL-2 序列显示于 SEQ ID NO: 1 中, 其成熟蛋白的序列显示于 SEQ ID NO: 2 中。此外, 该表述也包括天然存在的 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。该表述也包括天然 IL-2 的变体, 例如, 所述变体可以与天然 IL-2 具有至少 95%-99% 或更高同一性或具有不超过 1-10 个或 1-5 个氨基酸突变(例如, 保守取代), 并优选与天然 IL-2 蛋白具有基本相同的 IL-2R α 结合亲和力和/或 IL2R $\beta\gamma$ 结合亲和力。因此, 在一些实施方案中, 野生型 IL-2 相比于天然 IL-2 蛋白可以包含不影响其对 IL-2 受体结合的氨基酸突变, 例如, 在 125 位引入了突变 C125S 的天然人 IL-2 蛋白(uniprot:P60568)属于本发明的野生型 IL-2。一个包含 C125S 突变的野生型人 IL-2 蛋白的实例显示于 SEQ ID NO: 3 中。在一些实施方案中, 野生型 IL-2 序列可以与 SEQ ID NO: 1 或 2 或 3 的氨基酸序列具有至少 85%, 95%, 甚至至少 96%, 97%, 98%, 或 99% 或更高的氨基酸序列同一性。

在本文中, 氨基酸突变可以是氨基酸取代、缺失、插入和添加。可以进行取代、缺失、插入和添加的任意组合来获得具有期望性质(例如降低的 IL-2R α 结合亲和力和/或改善的成药性和/或弱化的 IL-2R $\beta\gamma$)的最终突变蛋白构建体。氨基酸缺失和插入包括在多肽序列的氨基和/或羧基末端的缺失和插入, 也包括在多肽序列内部的缺失和插入。例如, 可以在全长人 IL-2 位置 1 缺失丙氨酸残基, 或在 B'C' 环区缺失一个或数个氨基酸以缩短该环区的长度。在一些实施方案中, 优选的氨基酸突变是氨基酸取代, 例如单氨基酸取代的组合或氨基酸序列区段的置换。例如, 可以是将野生型 IL-2 的 B'C' 环区序列整体或部分替换为不同的序列(例如 IL-15

的 B'C' 环), 优选地以获得长度缩短的 B'C' 环区序列。

在本发明中, 当提及 IL-2 蛋白或 IL-2 序列区段中的氨基酸位置时, 通过参考野生型人 IL-2 蛋白(也称作 IL-2^{WT})的氨基酸序列 SEQ ID NO: 3, 予以确定。可以通过与 SEQ ID NO: 3 进行氨基酸序列比对, 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, 在本发明中, 除非另有说明, 否则 IL-2 蛋白或多肽的氨基酸位置为根据 SEQ ID NO: 3 编号的氨基酸位置。例如, 当提及“F42”时, 是指 SEQ ID NO:3 的第 42 位苯丙氨酸残基 F, 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。同时, 为了便于理解和对比, 当本发明的突变涉及某些特定区段的位点截短或缺失(例如, B'C' 环区的序列, 即 SEQ ID NO:3 的第 73-83 位共 11 个氨基酸残基)时, 在已给定具体突变区域及其突变方式的情况下, 该区域之外的氨基酸残基编号仍然维持不变, 例如, 将 B'C' 环区的序列, 即 SEQ ID NO:3 的第 73-83 位共 11 个氨基酸残基, 截短为 7 个氨基酸残基之后, 编号中的 80-83 不再分配, 而紧跟 B'C' 环区的下一位氨基酸残基位置编号仍然是 84。为进行氨基酸位置确定而实施的序列比对, 可以使用可从 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 获得的 Basic Local Alignment Search Tool, 采用默认参数进行。

在本文中, 在提及 IL-2 突变蛋白时, 以如下方式来描述单氨基酸取代: [原始氨基酸残基/位置/取代的氨基酸残基]。例如, 位置 35 的赖氨酸取代为谷氨酸, 可以表示为 K35E。当在一个给定位置(例如 K35 位)可以有多种可选氨基酸取代方式(例如 D,E)时, 该氨基酸取代可以表示为: K35D/E。相应地, 可以通过加号“+”或“-”将各单氨基酸取代连接起来, 以表示在多个给定位置的组合突变。例如 F42A、N88R 和 S127E 位置的组合突变, 可以表示为: F42A+N88R+S127E, 或 F42A-N88R-S127E。

在本文中, 可以通过在比较窗内比较两条最佳比对的序列来确定“序列同一性百分比”。优选地, 在参考序列(例如 SEQ ID NO: 3)的全长上确定序列同一性。用于比较的序列比对方法是本领域内公知的。适用于确定序列同一性百分比的算法包括例如 BLAST 和 BLAST 2.0 算法(参见 Altschul 等, Nuc. Acids Res.25: 3389-402,1977 和 Altschul 等 J.Mol. Biol. 215: 403-10, 1990)。可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公众获取用于进行 BLAST 分析的软件。出于本申请的目的, 同一性百分比采用可从 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 获得的 Basic Local Alignment Search Tool, 利用默认参数来确定。

如本文中使用的, 术语“保守取代”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的生物学功能的氨基酸取代。例如, 可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和 PCR 介导的诱变引入保守取代。典型的保守型氨基酸取代是指将一种氨基酸取代为具有相似的化学性质(例如电荷或疏水性)的另一种氨基酸。功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。在本发明中, 保守取代残基来自以下的保守替代表 X, 尤其是表 X 中的优选保守氨基酸取代残基。

表 X

原始残基	示例性取代	优选保守氨基酸取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln

Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

例如，野生型 IL-2 蛋白可以相对于 SEQ ID NO: 1-3 之一具有保守氨基酸取代，或仅具有保守氨基酸取代，且在一个优选实施方案中，保守取代不超过 10 个氨基酸残基，如 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 个残基。再例如，本发明的突变 IL-2 蛋白可以相对于本文中具体给出的 IL-2 突变蛋白序列(例如 SEQ ID NO: 4、23、25、27、29 和 31 之一)具有保守氨基酸取代，或仅具有保守氨基酸取代且在一个优选实施方案中，保守取代不超过 10 个氨基酸残基，如 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 个残基。

“亲和力”或“结合亲和力”可以用于反映结合对子的成员之间相互作用的内在结合能力。分子 X 对其结合配偶体 Y 的亲和力可以由平衡解离常数(K_D)表示，平衡解离常数是解离速率常数和结合速率常数(分别是 k_{dis} 和 k_{on})的比值。结合亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是本文中的 SPR 亲和力测定技术或 BLI 测定技术。

在本文中，抗原结合分子是可以特异性结合抗原的多肽分子，例如，免疫球蛋白分子、抗体或抗体片段，例如 Fab 片段和 scFv 片段。在一个实施方案中，本发明的抗原结合分子是针对免疫检查点分子作为抗原的结合分子，例如抗体，例如单克隆抗体。在一个实施方案中，免疫检查点分子为 PD-1 或 PD-L1 或 PD-L2。

在本文中，抗体 Fc 片段是指含有至少一部分的恒定区的免疫球蛋白重链的 C-端区域，并且可以包括天然序列 Fc 片段和变体 Fc 片段。天然序列 Fc 片段涵盖天然存在的各种免疫球蛋白 Fc 序列，例如各种 Ig 亚型以及其同种异型的 Fc 区 (Gestur Vidarsson 等, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.) 在一个实施方案中，人 IgG 重链 Fc 片段从重链的 Cys226 或从 Pro230 延伸至羧基端。在另一实施方案中，Fc-片段的 C-端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。在另一些实施方案中，Fc 片段是包含突变的变体 Fc 片段，例如包含 L234A-L235A 突变。除非本文中另外指出，Fc

片段中的氨基酸残基的编号根据 EU 编号系统, 也称为 EU 索引, 如 Kabat, E.A.等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242 中所述。在一些实施方案中, 抗体 Fc 片段可以在 N 端带有 IgG1 铰链序列或部分 IgG1 铰链序列, 例如根据 EU 编号, E216 到 T225 的序列或 D221 到 T225 的序列。在所述铰链序列中可以含有突变。

IL-2 蛋白属于具有四个 α 螺旋束(A,B,C,D)结构的短链 I 型细胞因子家族成员。在本文中, 术语“B'C' Loop”或“B'C' 环区”或“B'C' 环序列”可互换使用, 是指 IL-2 蛋白的 B 螺旋和 C 螺旋之间的连接序列。通过 IL-2 的晶体结构分析(例如 PDB:2ERJ), 可以确定一个 IL-2 蛋白的 B'C' 环序列。为了本发明的目的, 根据 SEQ ID NO:3 的编号, 该 B'C' 环序列是指 IL-2 多肽中连接位置 72 的残基和位置 84 的残基的序列。在 SEQ ID NO: 1、2 和 3 的野生型 IL-2 蛋白中, 该连接序列包括 A73-R83 共 11 个氨基酸。相应地, 在本文中, 术语“缩短的环区”或“缩短的 B'C' 环区”是指相对于野生型 IL-2 蛋白, 突变蛋白具有长度减小的 B'C' 环序列, 即, 根据 SEQ ID NO: 3 的编号, 氨基酸残基 aa72 和 aa84 之间的连接序列长度缩短。“缩短的环区”可以通过环序列的替换或截短来实现。所述替换或截短可以发生在 B'C' 环序列的任何区域或部分。例如, 替换或截短可是环区 A73-R83 序列的替换(例如替换为 IL-15 B'C' 环区)或自该序列 C 端的一个或多个氨基酸残基截短。再例如, 替换或截短可以是环区 Q74-R83 序列的替换或自该序列 C 端的一个或多个氨基酸残基截短。在进行所述替换或截短后, 如果需要, 可以进一步在环区序列中引入单氨基酸替代, 例如用于消除糖基化的氨基酸替代, 和/或回复突变, 以进一步改善突变蛋白的性能, 例如成药性能。因此, 在本文中, 经突变后的缩短 B'C' 环区可以通过在引入突变后连接位置 72 的残基和位置 84 的残基之间的序列来描述。

在本文中, “IL-2R α 结合界面”突变是指, 发生在 IL-2 与 IL-2R α (即, CD25)相互作用的氨基酸位点上的突变。可以通过分析 IL-2 与其受体复合物的晶体结构(例如 PDB:1Z92), 确定这些相互作用位点。在一些实施方案中, 所述突变尤其是指 IL-2 的氨基酸残基 35-72 区域的突变, 特别是在如下氨基酸位点上的突变: 35; 37; 38; 41; 42; 43; 45; 61; 62; 68; 72。优选地, 与引入所述突变前的对应蛋白相比, 包含所述突变的 IL-2 蛋白具有降低或消除的 IL-2R α 结合。

在本文中, “IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面”突变是指, 发生在 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ (即, CD122 和 CD132)相互作用的氨基酸位点上的突变。可以通过 IL-2 与其受体复合物的晶体结构分析(例如 PDB:2ERJ), 确定这些相互作用氨基酸位点。在一些实施方案中, 所述突变尤其是指 IL-2 的氨基酸残基 12-20、氨基酸残基 84-95、和氨基酸残基 126-130 区域的突变, 特别是在如下氨基酸位点上的突变: 12, 15, 16, 19, 20, 84, 87, 88, 91, 92, 95, 126, 127, 130。优选地, 与引入所述突变前的对应蛋白相比, 包含所述突变的 IL-2 蛋白具有减弱的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合。

在本文中, 对 IL-2R $\beta\gamma$ 受体结合而言, “弱化”IL-2 蛋白分子是指, 在 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面引入突变, 其中相对于引入此突变前的对应 IL-2 蛋白, 所述突变导致降低的对 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合亲和力。进一步优选地, 相对于对应蛋白, 所述弱化分子具有降低的 T 细胞(例如 CD8+T 细胞或 CD4+T 细胞)和/或 NK 细胞激活活性。例如通过检测所述弱化分子和对应蛋白激活 T 细胞 pSTAT5 信号的 EC50 值比值, 下降倍数可达到例如 5 倍以上, 例如 10 倍以上, 或 50 倍以上, 或 100 倍以上, 或甚至 1000 倍以上。例如, 相对于对应蛋白, 弱化分子对 T 细胞的激活活性可以下降 10-50 倍, 或 50-100 倍, 或 100-1000 倍, 或更高倍数。因此, 在本发明中, 在一些实施方案中, 本发明的弱化分子具有“弱化”的对 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合亲和力和“弱化”的 T 细胞激活活性。

“抗原结合片段”指与完整抗体不同的分子, 其包含完整抗体的一部分且结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; dAb(domain antibody); 线性抗体; 单链抗体(例如 scFv); 单结构域抗体例如 VHH; 双价抗体或其片段; 或骆驼科抗

体。

术语“抗原”是指引发免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体产生或特异性免疫细胞的活化，或两者兼有。技术人员将理解，任何大分子，包括基本上所有的蛋白质或肽，都可以用作抗原。此外，抗原可以衍生自重组或基因组 DNA。在一些实施方案中，本发明所述的抗原是肿瘤相关抗原，即与肿瘤的发生、发展或进展有关联的抗原，例如 PD-1、PD-L1 或 PD-L2。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环（“超变环”）和/或含有抗原接触残基（“抗原接触点”）的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3，从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中，各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派系统的任一种或其组合确定，所述指派系统包括例如：基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人, (1989) Nature 342: 877-883, Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)), 基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London), 国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (在万维网上 imgt.cines.fr/上), 以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类 (affinity propagation clustering) 的 North CDR 定义。

例如，根据不同的 CDR 确定方案，每一个 CDR 的残基如下所述。

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	Chothia 方案	Contact 方案
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
HCDR1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat 编号系统)				
HCDR1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia 编号系统)				
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101
(Kabat 编号系统)				

CDR 也可以基于与参考 CDR 序列(例如本发明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 编号位置而确定。

除非另有说明，否则在本发明中，术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式确定的 CDR 序列。

除非另有说明，否则在本发明中，当提及抗体可变区中的残基位置（包括重链可变区残基和轻链可变区残基）时，是指根据 Kabat 编号系统（Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）的编号位置。

在一个实施方案中，本发明抗体的重链可变区和轻链可变区 CDR 是依据 North 编号方案定义的 CDR 序列。

如本文所用的术语“接头”是指使得能够直接连接融合蛋白的不同部分的任何分子。在融合蛋白不同部分之间建立共价连接的接头的实例包括肽接头和非蛋白质聚合物，包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇、聚丙二醇的共聚物。根据本发明的术语“肽接头”是指氨基酸的序列，其中所述序列将融合蛋白的第一部分的氨基酸序列连接至融合蛋白的第二部分。例如，肽接头可以将融合蛋白的 IL-2 部分与 Fc 结构域或其片段连接。例如，肽接头也可以将抗体与 IL-2 连接，诸如将抗体重链的 C 末端与 IL-2 连接。优选地，所述肽接头具有这样的长度，其足以连接两个实体，其方式使得它们维持它们相对于彼此的构象，使得不妨碍期望的活性。肽接头可以主要包括或不主要包括以下氨基酸残基：Gly、Ser、Ala 或 Thr。有用的接头包括甘氨酸-丝氨酸聚合物，包括例如(GS)_n、(GSGGS)_n、(GGGGS)_n、(GGGS)_n 和(GGGGS)_nG，其中 n 是至少 1(且优选 2、3、4、5、6、7、8、9、10)的整数。有用的接头还包括甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和其他柔性接头。优选地，本发明的接头是(GGGGS)_n，其中 n=1、2、3、4 或 5，优选地为 2。优选地，本发明的接头是 SEQ ID NO:5。

“IgG 形式的抗体”是指抗体的重链恒定区所属的 IgG 形式。所有同一型的抗体的重链恒定区都是相同的，不同型的抗体之间的重链恒定区不同。例如，IgG4 形式的抗体是指其重链恒定区来自 IgG4，或者 IgG1 形式的抗体是指其重链恒定区来自 IgG1。

“人源化”抗体是指包含来自非人 CDR 的氨基酸残基和来自人 FR 的氨基酸残基的抗体。在一些实施方案中，人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、通常两个可变结构域，其中所有或基本上所有的 CDR(例如，CDR)对应于非人抗体的那些，并且所有或基本上所有的 FR 对应于人抗体的那些。人源化抗体任选可以包含至少一部分的来源于人抗体的抗体恒定区。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经进行了人源化的抗体。

“人抗体”或“全人抗体”或“全人源抗体”可以互换使用，其指具有这样的氨基酸序列的抗体，所述氨基酸序列对应于下述抗体的氨基酸序列，所述抗体由人或人细胞生成或来源于非人来源，其利用人抗体库或其它人抗体编码序列。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

本发明的免疫缀合物中的抗体部分可以是人源化抗体、人抗体或嵌合抗体。

本文使用的术语“融合物”是指通过连接两个或多个最初分开的蛋白/基因/化合物形成的融合物。如果构成融合物的实体是蛋白质，则被称为融合蛋白。融合蛋白涵盖在本申请的融合物的范围内。例如，IL-2 与 Fc 二聚体连接可以构成 IL-2 融合蛋白。构成融合物的两个实体分子之间的连接可以通过或不通过接头实现。

如本文中使用的术语“免疫缀合物”指包括至少一个 IL-2 分子和至少一个抗体或抗体片段的多肽分子。如本文中描述的，IL-2 分子可以通过多种相互作用及以多种构造连接至抗体。例如，IL-2 与 Fc 的融合蛋白与抗体分子的包含重链和轻链的片段可以通过二聚化构成免疫缀合物。优选地，本发明的免疫缀合物具有图 1A 所示的结构，或 IL-2 部分与 PD-1 抗体部分互换的图 1A 所示的结构。

如本文中使用的术语“第一”和“第二”就 Fc 结构域或单体等而言为了在有超过一个每类模

块时便于区分而使用。除非明确如此陈述,这些术语的使用不意图赋予免疫缀合物的特定次序或取向。

本文所述的术语“治疗剂”涵盖在预防或治疗肿瘤,例如癌症中有效的任何物质,包括化疗剂、细胞因子、血管生成抑制剂、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂(例如免疫抑制剂)。

术语“有效量”指本发明的抗体或片段或组合物或组合的这样的量或剂量,其以单一或多次剂量施用患者后,在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。“有效量”可以涵盖“治疗有效量”或“预防有效量”。

“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段,有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量也是这样的一个量,其中抗体或抗体片段或组合物或组合的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象,“治疗有效量”优选地抑制可度量参数(例如肿瘤体积)至少约 40%、甚至更优选地至少约 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 甚至 100%。“预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段,有效实现所需预防结果的量。通常,由于预防性剂量在对象中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用,故预防有效量将小于治疗有效量。

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可交换地使用且是指其中引入外源核酸的细胞,包括这种细胞的后代。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。本文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。

本文所使用的术语“标记”是指被直接或间接缀合或融合至试剂(诸如多核苷酸探针或抗体)并且促进其所缀合或融合的试剂的检测的化合物或组合物。标记本身可以是可检测的(例如,放射性同位素标记或荧光标记)或在酶促标记的情况下可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。术语旨在涵盖通过将可检测物质偶联(即,物理连接)至探针或抗体来直接标记探针或抗体以及通过与直接标记的另一种试剂反应来间接标记探针或抗体。

“个体”或“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于,家养动物(例如,牛,羊,猫,狗和马),灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物如猴),兔,以及啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。在一些实施方案中,个体或受试者是人。

术语“抗肿瘤作用”指可以通过多种手段展示的生物学效果,包括但不限于例如,肿瘤体积减少、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。在一些实施方案中,抗肿瘤作用还涉及在不减少受试者体重的情况下的抗肿瘤作用。

术语“肿瘤”和“癌症”在本文中互换地使用,涵盖实体瘤和血液肿瘤。

术语“癌症”指向或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理疾患在某些实施方案中,适合于通过本发明的抗体来治疗的癌症包括实体肿瘤或血液肿瘤等,包括癌症的转移性形式。术语“肿瘤”指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”和“肿瘤”在本文中提及时并不互相排斥。

术语“药用辅料”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂、载体或稳定剂等。

术语“药物组合物”指这样的组合物,其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在,并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

术语“药物组合或组合产品”是指非固定组合产品或固定组合产品,包括但不限于药盒、药物组合物。术语“非固定组合”意指活性成分(例如,(i)本发明的突变蛋白或融合物、以及

(ii)其他治疗剂)以分开的实体被同时、无特定时间限制或以相同或不同的时间间隔、依次地施用于患者,其中这类施用在患者体内提供预防或治疗有效水平的两种或更多种活性剂。术语“固定组合”意指两种或更多种活性剂以单个实体的形式被同时施用于患者。优选对两种或更多种活性剂的剂量和/或时间间隔进行选择,从而使各部分的联合使用能够在治疗疾病或病症时产生大于单独使用任何一种成分所能达到的效果。各成分可以各自呈单独的制剂形式,其制剂形式可以相同也可以不同。

术语“组合法”是指施用两种或更多种治疗剂或治疗方式(例如放射疗法或手术)以治疗本文所述疾病。这种施用包括以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂,例如以具有固定比例的活性成分的单一胶囊。或者,这种施用包括对于各个活性成分在多种或在分开的容器(例如片剂、胶囊、粉末和液体)中的共同施用。粉末和/或液体可以在施用前重构或稀释至所需剂量。此外,这种施用还包括以大致相同的时间或在不同的时间以顺序的方式使用每种类别的治疗剂。在任一情况下,治疗方案将提供药物组合在治疗本文所述的病症或病状中的有益作用。

用于本文时,“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性。

用于本文时,“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。在一些实施方式中,具有癌症家族病史的受试者是预防性方案的候选。通常,在癌症的背景中,术语“预防”是指在癌症的病征或症状发生前,特别是在具有癌症风险的受试者中发生前的药物施用。

术语“载体”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。一些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称作“表达载体”。

“受试者/患者/个体样品”指从患者或受试者得到的细胞或流体的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织,像来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品或活检样品或穿刺样品;血液或任何血液组分;体液,诸如脑脊液、羊膜液(羊水)、腹膜液(腹水)、或间隙液;来自受试者的妊娠或发育任何时间的细胞。组织样品可能包含在自然界中天然不与组织混杂的化合物,诸如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素、等等。

II. 本发明的 IL-2 突变蛋白

本发明 IL-2 突变蛋白的有利生物学性质

本发明人经长期研究发现,可以如下实施如下分子突变和改造或组合所述突变和改造中的一项或多项,来同时改善 IL-2 的药效、降低 IL-2 的毒副作用、和实现良好的生产性能:

(i) 在 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合界面引入特定的残基突变,弱化与 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合,一定程度地下调 IL-2 的活性。通过包含弱化 IL-2R $\beta\gamma$ 受体结合的此类突变,本发明的 IL-2 突变蛋白可以在激活淋巴细胞杀伤肿瘤的同时,避免由淋巴细胞过度激活导致的大量炎症因子释放,和由此带来的药物相关毒性。此外,该弱化突变还可以通过减低本发明 IL-2 突变蛋白与广泛存在于淋巴细胞上的 IL-2 受体的结合亲和力,减少由 IL-2 受体介导的 IL-2 突变蛋白清除,延迟 IL-2 突变蛋白的作用时效;

(ii) 将本发明的突变 IL-2 蛋白构建成 IL-2-Fc 二聚体。该二聚体的形成可以增加本发明 IL-2 突变蛋白的分子量,极大地减小肾清除,并通过 FcRn 介导的体内循环回收,进一步延长 IL-2-Fc 融合蛋白的半衰期。从而,克服由 IL-2 的短半衰期和高频大剂量施用带来的高峰值血

药浓度问题；

(iii) 对 IL-2 的 B'C' loop 结构进行改造，例如分别使用 IL-15 分子的 loop 进行替换或者将 IL-2 分子 B'C' loop 进行截短。该 B'C' 环突变可以显著地增强本发明 IL-2 突变蛋白中 B'C' loop 结构的稳定性，显著地提升 IL-2 突变蛋白和由其构建的 IL-2-Fc 二聚体分子的生产性能，例如显著提升的表达量和纯度；

(iv) 保持与野生型 IL-2 基本上相当的 IL-2R α 结合活性；或可以进一步组合如下突变：(v) 在 IL-2 与 IL-2R α 受体的结合界面的一个或多个特定的突变，以改变 IL-2 突变蛋白对 IL-2R α 的结合性能。而且，本发明人发现，在本发明的突变蛋白中，在保持上述优良性质的同时，还可以根据需要，调节 IL-2 突变蛋白与 IL-2R α 的结合活性，以满足 IL-2 在抗肿瘤或自身免疫疾病治疗等多方面不同的成药需求，从而，进一步赋予本发明突变蛋白优良的药效性质。

由此，通过对序列的改造，本发明的 IL2-Fc 系列分子，一方面弱化与其受体 IL2R β/γ 的结合亲和力，实现了更优秀的药代动力学实验结果和药效结果，另一方面在成药性例如蛋白表达量和纯度方面得到了显著的提升。

因此，本发明提供了具有改善的成药性质和改善的 IL-2 受体结合性质的 IL-2 突变蛋白。包含本发明 IL-2 突变蛋白的 IL-2-Fc 分子可以有效地避免对淋巴细胞的强激动造成的炎症因子的过度释放，具有更加平稳长效的药代特性。因此，可以用较低的单次给药剂量来达到足够高的人体药物暴露量，避免 C_{max} 过高导致的药物相关毒性。此外，更有意义的是，虽然本发明的长效 IL-2-Fc 分子相对于天然 IL-2 具有弱化的淋巴细胞免疫刺激活性，但是因为药代动力学性质的显著改善，本发明分子的体内有效药物浓度持续的时间更长，可以发挥较长时间的对淋巴细胞的持续刺激，达到与天然 IL-2 分子相当甚至更好的药效动力学效果，在动物中实现更好的抗肿瘤药效和耐受性。

此外，还可以将本发明的具有有利生物学性质的突变 IL-2 蛋白与抗原结合分子（例如抗体或其片段）形成免疫缀合物，在激活并扩增 T 细胞或 NK 细胞的同时，增强抗原结合分子的免疫或免疫治疗效果。

改善的成药性质

在一些实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白具有改善的成药性质，例如，当在哺乳动物细胞例如 HEK293 或 CHO 细胞中表达时，尤其是以 Fc 融合蛋白表达时，具有选自以下的一项或多项性质：(i) 优于野生型 IL-2 蛋白的表达量；和(ii) 易于纯化至更高的蛋白纯度。

在本发明的一些实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白与野生 IL-2 相比表现出表达水平的增加。在本发明的一些实施方案中，增加的表达发生在哺乳动物细胞表达系统中。表达水平可通过允许定量或半定量分析细胞培养上清液（优选一步亲和层析纯化后的上清液）中的重组 IL-2 蛋白量的任何合适方法来测定。例如，可以通过蛋白质印迹或 ELISA，评估样品中的重组 IL-2 蛋白量。在一些实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白，与野生型 IL-2 相比，在哺乳动物细胞中的表达量增加至少 1.1 倍，或至少 1.5 倍，或至少 2 倍、3 倍或 4 倍以上，或至少 5、6、7、8 或 9 倍，或甚至 10 倍以上，例如大约 10、15、20、25、30 和 35 倍。

在一些实施方案中,如通过测定蛋白 A 亲和层析后纯化蛋白的纯度所显示的,本发明 IL-2 突变蛋白-Fc 融合物,相对于野生型 IL-2 蛋白融合物,表现出更高的纯度。在一些实施方案中,蛋白纯度通过 SEC-HPLC 技术检测。在一些优选的实施方案中,在一步蛋白 A 亲和层析纯化后,本发明 IL-2 突变蛋白-Fc 融合物的纯度可以达到 70%,或 80%,或 90%以上,优选地 92%,93%,94%,95%,98%或 99%以上。

在一些实施方案中,如通过测定蛋白 A 亲和层析后纯化蛋白的纯度所显示的,本发明 IL-2-Fc 二聚体蛋白,相对于由野生型 IL-2 蛋白形成的对应 IL-2-Fc 二聚体蛋白,表现出更高的纯度。在一些实施方案中,蛋白纯度通过 SEC-HPLC 技术检测。在一些优选的实施方案中,在一步蛋白 A 亲和层析纯化后,本发明 IL-2-Fc 二聚体蛋白的纯度可以达到 70%,或 80%,或 90%以上,优选地 92%,93%,94%,95%,98%或 99%以上。

弱化的 IL-2 $\beta\gamma$ 受体结合性

通过在 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面引入突变,在一些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白,相对于引入所述突变前的对应蛋白,具有弱化的 IL-2 $\beta\gamma$ 结合亲和力。

在一些实施方案中,相对于引入 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变进行弱化前,本发明的 IL-2 突变蛋白对 IL-2R β 和/或 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合亲和力降低。在一些实施方案中,相对于进行弱化前,本发明的 IL-2 突变蛋白对 IL-2R β 受体的结合亲和力降低,例如降低 1-20 倍或更高,包括在一些实施方案中,去除对 IL-2R β 受体的结合。在一些实施方案中,相对于进行弱化前,本发明的 IL-2 突变蛋白对 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合亲和力降低,例如降低 1-100 倍或更高。在一些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白不与 IL-2R β 受体的结合,但仍能够与 IL-2R $\beta\gamma$ 受体结合,优选地其中所述与 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合,相比于进行弱化前,可以例如降低 1-100 倍,如大约 20-80 倍。可以通过 SPR 亲和测定技术,测定本发明 IL-2 突变蛋白,例如与 Fc 片段融合的本发明 IL-2 突变蛋白或其二聚体分子,与受体 IL-2R β 或 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的平衡解离常数(K_D)来确定结合亲和力。

通过在 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面引入突变,在一些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白,相对于引入所述突变前的对应蛋白,具有弱化的 IL-2 活性,例如选自以下至少一项的 IL-2 活性:

- 相比于弱化前,降低对 T 细胞(例如 CD4+和 CD8+ T 细胞,例如 CD4+/CD8+ CD25- T 细胞, CD4+ CD25+ T 细胞)的激活;
- 相比于弱化前,降低对 NK 细胞的激活;
- 相比于弱化前,降低由 IL-2 刺激的 T 细胞/NK 细胞炎症因子释放。

在一个实施方案中,相对于弱化前,本发明 IL-2 突变蛋白导致减少的由 IL-2 介导的淋巴细胞(例如 T 细胞和/或 NK 细胞)激活和/或增殖。在一个实施方案中,淋巴细胞是 CD4+和 CD8+ T 细胞,例如 CD25- T 细胞。在一个实施方案中,在 STAT5 磷酸化测定试验中,通过检测 IL-2 突变蛋白在淋巴细胞例如 T 细胞或 NK 细胞中对 STAT5 磷酸化信号的激活,来鉴定 IL-2 突变蛋白激活 CD4+和 CD8+ T 细胞的能力。例如,如本申请实施例所述,可以通过流式细胞术分析细胞中的 STAT5 磷酸化,确定半最大有效浓度(EC50)。例如通过检测所述本发明的 IL-2 弱化分子和对应蛋白激活 T 细胞 STAT5 磷酸化信号的 EC50 值的比值,本发明的 IL-2 突变分子具有“弱化”的 T 细胞激活活性。根据该比值,本发明 IL-2 突变分子的 T 细胞激活活性下降可达到例如 5 倍以上,例如 10 倍以上,或 50 倍以上,或 100 倍以上,或甚至 1000 倍以上。

例如,相对于对应蛋白,本发明 IL-2 突变分子对 T 细胞的激活活性可以下降 10-50 倍,或 50-100 倍,或 100-1000 倍,或更高倍数。在一些优选实施方案中,本发明 IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2,具有减少的由细胞表面 IL-2 受体介导的 IL-2 清除,表现出增加的体内半衰期。

在一些优选实施方案中,本发明 IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2 具有减小的由 IL-2 与其受体介导的体内毒性。

保持或改变(优选地弱化的)的 IL-2R α 受体结合

IL-2 蛋白通过与 IL-2 受体相互作用来引发信号传导和发挥功能。野生型 IL-2 对不同 IL-2 受体显示出不同的亲合力。在静息效应细胞(包括 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞)上表达与野生型 IL-2 具有较低亲合力的 IL-2 β 和 γ 受体。在调节性 T 细胞(Treg)细胞和激活的效应细胞上表达与野生型 IL-2 具有高亲合力的 IL-2R α 。由于高亲合力的原因,野生型 IL-2 会优先结合细胞表面的 IL-2R α ,再招募 IL-2R $\beta\gamma$,通过 IL-2R $\beta\gamma$ 释放下游 p-STAT5 信号,刺激 Treg 细胞和激活的效应细胞。不受理论的束缚,改变 IL-2 对 IL-2R α 受体的亲合力,将改变 IL-2 优先激活 CD25⁺ 细胞的偏向性,改变 IL-2 介导的 Treg 细胞的免疫下调作用。

在一些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白,相对于野生型 IL-2,具有保持或改变的 IL-2R α 受体结合能力。

在一些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白,相对于野生型 IL-2,保持对 IL-2 R α 受体的结合。在本文中,表述“保持对 IL-2 R α 受体的结合”是指 IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2 蛋白与 IL-2 R α 受体具有相当的结合活性。优选地,“相当的结合活性”为,当采用相同的测量方式测定时,IL-2 突变蛋白与野生型 IL-2 蛋白的结合活性数值(例如结合亲和力 K_D)之间的比值在 1:20 至 20:1 之间,优选地,1:10 至 10:1 之间。优选地,IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2,不具有 IL-2R α 结合界面突变。

在一些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白是弱化 IL-2 突变分子,且保持对 IL-2R α 受体的结合。在再一些实施方案中,本发明的弱化 IL-2 突变蛋白,相对于野生型 IL-2,不具有 IL-2R α 结合界面突变。优选地,所述弱化 IL-2 突变分子具有改善的 Treg 选择性和/或改善的 NK 细胞(例如,CD3⁻CD56⁺NK 细胞)选择性。在一个实施方案中,在 STAT5 磷酸化测定试验中,通过检测 IL-2 突变蛋白在不同淋巴细胞例如 Treg 细胞、NK 细胞、CD4⁺和 CD8⁺效应 T 细胞中对 STAT5 磷酸化信号的激活,来鉴定 IL-2 突变蛋白对淋巴细胞的选择性。在一个实施方案中,在 STAT5 磷酸化测定试验中,IL-2 突变蛋白的选择性可以通过选择性激活特定的(一种或多种)淋巴细胞而不实质性激活其它淋巴细胞的 IL-2 突变蛋白剂量窗口来反映。例如,在一些实施方案中,本发明的弱化 IL-2 突变蛋白可以表现出改善的 Treg 选择性和/或改善的 NK 细胞(CD3⁻CD56⁺NK 细胞)选择性,所述选择性相对于效应 T 细胞,例如 CD25^{-low} CD4⁺和/或 CD8⁺效应 T 淋巴细胞而言。在再一些实施方案中,改善的选择性可以反映为 IL-2 突变蛋白的低药物相关毒性。

在另一些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白,相对于野生型 IL-2,引入 IL-2R α 结合界面突变,所述突变导致 IL-2 突变蛋白具有降低或消除的 IL-2R α 受体结合。

在再一些实施方案中,本发明的该 IL-2 突变蛋白,相对于野生型 IL-2,降低 IL-2 优先激活 CD25⁺细胞的偏向性。在再一些实施方案中,本发明的该 IL-2 突变蛋白,相对于野生型 IL-2,

降低 IL-2 介导的 Treg 细胞的免疫下调作用。

在另一些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白具有免疫下调作用。在再一些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白可以用于自身免疫疾病的治疗。

因此,在一些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白具有选自例如以下的一项或多项的改善性质:

- 与野生型 IL-2 相比,保持或改变(例如降低或增加,优选地降低的)对 IL-2R 受体(IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 、IL-2R α 和/或 IL2R $\alpha\beta\gamma$)的结合亲和力;

- 与野生型 IL-2 相比,保持或改变(例如降低或增加)对 CD25⁺ 细胞(例如 CD8⁺T 细胞和 Treg 细胞)的激活;

- 与野生型 IL-2 相比,保持或改变(例如去除或降低,或增加)IL-2 优先激活 CD25⁺ 细胞(例如 Treg 细胞)的偏向性;

- 与野生型 IL-2 相比,保持或改变(例如降低或增加)由 IL-2 诱导的经 Treg 细胞引起的免疫反应下调作用。

在一些实施方案中,相对于野生型 IL-2(例如 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 中所示 IL-2^{WT}),本发明 IL-2 突变蛋白对 IL-2R α 受体的结合亲和力降低至少 5 倍、至少 10 倍、或至少 25 倍,尤其是至少 30 倍、50 倍或 100 倍以上。在优选的实施方案中,本发明的突变蛋白不结合 IL-2 受体 α 。可以通过 SPR 亲和测定技术,测定本发明 IL-2 突变蛋白,例如与 Fc 片段融合的本发明 IL-2 突变蛋白或其二聚体分子,与受体 IL-2R α 受体的平衡解离常数 (K_D) 来确定结合亲和力。

在一个实施方案中,相对于野生型 IL-2,本发明 IL-2 突变蛋白导致减少的由 IL-2 介导的 CD25⁺细胞激活和/或增殖。在一个实施方案中,CD25⁺细胞是 CD25⁺ CD8⁺T 细胞。在另一实施方案中,CD25⁺细胞是 Treg 细胞。在一个实施方案中,在 STAT5 磷酸化测定试验中,通过检测 IL-2 突变蛋白在 CD25⁺细胞中对 STAT5 磷酸化信号的激活,来鉴定 IL-2 突变蛋白激活 CD25⁺细胞的能力。例如,如本申请实施例所述,可以通过流式细胞术分析细胞中的 STAT5 磷酸化,确定半最大有效浓度(EC50)。

在一个实施方案中,相对于野生型 IL-2,本发明 IL-2 突变蛋白去除或降低 IL-2 对 CD25⁺细胞优先激活的偏向性。在一个实施方案中,CD25⁺细胞是 CD25⁺ CD8⁺T 细胞。在另一实施方案中,CD25⁺细胞是 Treg 细胞。在一个实施方案中,在 STAT5 磷酸化测定试验中,通过检测 IL-2 突变蛋白分别在 CD25⁻细胞中和在 CD25⁺细胞中激活 STAT5 磷酸化信号的 EC50 值,来鉴定 IL-2 突变蛋白激活 CD25⁻细胞的能力。例如,通过计算在 CD25⁻和 CD25⁺T 细胞上激活 STAT5 磷酸化信号的 EC50 值的比值,确定 IL-2 突变蛋白对 CD25⁺细胞的激活偏向性。优选地,相对于野生型蛋白,突变蛋白对 CD25⁺的偏向性降低了至少 10 倍,优选至少 100 倍,150 倍,200 倍,300 倍或更高。

在一些实施方案中,本发明的 IL-2 突变蛋白具有 PCT/CN2021/081840 所示的突变蛋白的性质,所述专利以其全文引入本发明。

本发明的突变蛋白

一方面,本发明提供一种 IL-2 突变蛋白,其中所述突变蛋白,与野生型 IL-2(优选人 IL-2,更优选包含 SEQ ID NO: 3 序列的 IL-2)相比,包含突变:

(i) 在 IL-2 与 IL-2R α 结合界面上,尤其是在位置 35 和/或 42 上,具有消除或降低对 IL-2R α 受体的结合亲和力的突变;

和/或

(ii) 在 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面上,尤其是在选自位置 88、127 和/或 130 的至少一个位置上,具有弱化/降低的对 IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合的突变;

以及

(iii) 缩短的 B'C' 环区 (即,连接氨基酸残基 aa72 和 aa84 的序列),优选地,所述缩短的环区具有小于 10, 9, 8, 7, 6, 或 5 个的氨基酸长度,且优选 7 个氨基酸长度;优选地,所述缩短的 B'C' 环区导致改善的蛋白表达量和/或纯度,

其中氨基酸位置根据 SEQ ID NO: 3 编号。

在一个实施方案中,所述突变蛋白包含突变(i)和(iii) 或包含突变(ii)和(iii)或包含(i)、(ii)和(iii)。

IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变

适用于本发明突变蛋白的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变,可以是任何能够与本发明其他突变组合并导致弱化或降低的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合亲和力和/或弱化的淋巴细胞(例如 T 细胞/NK 细胞)激活活性的突变。

这样的突变的例子包括,但不限于:在 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面上,尤其是在选自位置 88、127 和 130 的至少一个位置上,导致弱化或减低的 IL-2R $\beta\gamma$ 受体结合的突变。

在一些实施方案中,IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变包含选自以下的突变中的一个或多个或以下突变的组合:

N88D, N88R, S127E, S130R, N88R+S130R, N88R+S127E。

在另一些实施方案中,包含本发明的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面突变的本发明 IL-2 突变蛋白具有弱化或降低的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合,例如采用 SPR 亲和力测定,弱化或降低的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合亲和力。

B'C' 环区突变

在一个方面,本发明的 IL-2 突变蛋白,相对于野生型 IL-2,包含 B'C' 环区突变,优选地所述突变导致稳定性增加的 B'C' 环区;更优选地,所述突变导致本发明 IL-2 突变蛋白具有改善的成药性,例如,增加的表达量和/或纯度。

在一些实施方案中,所引入的突变导致,与野生型 IL-2(优选人 IL-2,更优选包含 SEQ ID NO: 3 序列的 IL-2)相比,突变蛋白包含缩短的 B'C' 环区 (即,氨基酸残基 aa72 和 aa84 之间的连接序列长度缩短)。

优选地,所述缩短的环区具有小于 10, 9, 8, 7, 6 个或 5 个氨基酸长度,且优选 7 个氨基酸长度,其中氨基酸残基根据 SEQ ID NO: 3 编号。

在本文中，适用于本发明的 B'C' 环区突变包括 B'C' 环区的截短和替换。在一个实施方案中，所述突变包括 B'C' 环区氨基酸残基 aa73 至 aa83 的截短（例如截短 B'C' 环区的 1、2、3、或 4 个氨基酸）或替换，例如截短为 A(Q/G)SKN(F/D)H，优选地为 AQSKNFH，或替换为 SGDASIH。在另一实施方案中，所述突变包括 B'C' 环区氨基酸残基 aa74 至 aa83 的截短或替换，例如截短为(Q/G)SKN(F/D)H，或替换为 GDASIH 或 AGDASIH。

在一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白包含 B'C' 环嵌合突变。相对于野生型 IL-2，所述突变蛋白包含对连接 aa72 至 aa84 的序列的全部或部分替代，例如替代为来自其它四螺旋短链细胞因子家族成员的短 B'C' 环序列。可以通过晶体结构的 superpose，从其它四螺旋短链细胞因子 IL 家族成员，例如 IL-15，IL-4，IL-21，或来自非人物种(如小鼠)的 IL 家族成员，鉴定适用于替代野生型 IL-2 的短 B'C' 环。在一个实施方案中，用于替代的序列为来自白介素 IL-15（尤其是人 IL-15）的 B'C' 环序列。在一个实施方案中，所述替代包括 B'C' 环区氨基酸残基 aa73 至 aa83 的替代。在另一实施方案中，所述替代包括 B'C' 环区氨基酸残基 aa74 至 aa83 的替代。优选地，经替代后，本发明 IL-2 突变蛋白具有选自以下的 B'C' 环序列(即，连接 aa72 至 aa84 的序列)：SGDASIH 或 AGDASIH，优选地 AGDASIH。

在一些实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白包含 B'C' 环截短突变。相对于野生型 IL-2，所述突变蛋白包含对连接 aa72 至 aa84 的序列的截短。在一个实施方案中，所述截短包括 B'C' 环区氨基酸残基 aa73 至 aa83 的截短。在另一实施方案中，所述截短包括 B'C' 环区氨基酸残基 aa74 至 aa83 的截短。例如，可以自 C 端截短 1、2、3 或 4 个氨基酸。优选地，经截短后，本发明 IL-2 突变蛋白的 B'C' 环区具有序列 A(Q/G)SKN(F/D)H，优选地为 AQSKNFH。优选地，经截短后，本发明 IL-2 突变蛋白具有选自以下的 B'C' 环序列(即，连接 aa72 至 aa84 的序列)：

B'C'loop 序列
AQSKNFH
AGSKNFH
AQSANFH
AQSANIH

在一个优选的实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白包含选自以下的 B'C' 环区序列(即，连接 aa72 至 aa84 的序列)：AQSKNFH 或 AGDASIH。

IL-2R α 结合界面突变

在一个方面，本发明的 IL-2 突变蛋白，相对于野生型 IL-2，在 IL-2R α 结合界面，优选地在位置 35 和/或 42 上，包含一个或多个突变。优选地，所述突变消除或降低对 IL-2R α 受体的结合亲和力。

在一些优选的实施方案中，本发明的 IL-2R α 结合界面突变包含突变 K35E 和/或 F42A。

在另一些实施方案中，包含本发明的 IL-2R α 结合界面突变的本发明 IL-2 突变蛋白具有改变的 IL-2R α 结合，例如采用 SPR 亲和力测定，改变的（优选降低或消除的）IL-2R α 结合。

其它突变

除了上述“IL-2R β 结合界面突变”、“B'C' 环区突变”和“IL-2R α 结合界面突变”，本发明的

IL-2 突变蛋白还可以在其它区域或位置上具有 1 个或多个突变，只要其保留本发明 IL-2 突变蛋白的上述一个或多个有益性质即可。例如，本发明 IL-2 突变蛋白还可以包含在位置 125 的取代，例如 C125S, C125A, C125T, 或 C125V, 以提供额外的优点，例如改善的表达或同质性或稳定性(参见例如，美国专利号 4,518,584)。再例如，本发明 IL-2 突变蛋白还可以包含在位置 3 的取代，例如 T3A, 以去除 IL2 N 末端的 O 糖修饰。本领域技术人员知晓如何确定可以并入本发明 IL-2 突变蛋白中的额外突变。

优选的示例性突变组合

在一些优选实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白具有弱化的 IL-2R $\beta\gamma$ 结合，且具有选自以下一项或全部两项的改善性质：(i)降低的(或消除的)IL-2R α 结合；和(ii)改善的表达水平和纯度。在一些实施方案中，所述 IL-2 突变蛋白相对于野生型 IL-2 蛋白保持 IL-2R α 受体结合。

在一些实施方案中，本发明提供 IL-2 突变蛋白，其中所述突变蛋白，相对于野生型 IL-2，包含：

(i) N88D;

N88R;

N88R + S130R;

F42A+N88R + S127E; 或

K35E+N88R + S127E;

和

(ii)B'C'环区序列 AGDASIH 或 AQSKNFH;

以及任选地(iii)T3A。

在一些实施方案中，本发明提供 IL-2 突变蛋白，其中所述突变蛋白，相对于野生型 IL-2，包含：

(i) N88D;

N88R;

N88R + S130R;

F42A+N88R + S127E; 或

K35E+N88R + S127E;

和

(ii)B'C'环区序列 AGDASIH 或 AQSKNFH;

以及 (iii)T3A。

在一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白

(i)包含与 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变,

优选地,其中所述突变蛋白包含 N88D 取代和 B'C'环区序列 AGDASIH,以及任选地 T3A。

在一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白

(i)包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变,

优选地,其中所述突变蛋白包含 N88R 取代和 B'C'环区序列 AGDASIH,以及任选地 T3A。

在一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白

(i)包含与 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变,

优选地,其中所述突变蛋白包含 N88R+S130R 取代和 B'C'环区序列 AGDASIH,以及任选地 T3A。

在一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白

(i)包含与 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变,

优选地,其中所述突变蛋白包含 F42A+N88R+S127E 取代和 B'C'环区序列 AQSKNFH,

以及任选地 T3A。

在一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白

(i)包含与 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变，

优选地，其中所述突变蛋白包含 F42A+N88R+S127E 取代和 B'C'环区序列 AGDASIH，以及任选地 T3A。

在一些实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白

(i)包含与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变，

优选地，其中所述突变蛋白包含 K35E+N88R+S127E 取代和 B'C'环区序列 AQSKNFH，以及任选地 T3A。

关于适用于本发明的突变以及突变组合，也可以参见本申请人的共同待决申请 PCT/CN2021/081840。该申请整体并入本文作为参考。

IL-2 突变蛋白与野生型蛋白之间的序列差异性可以用序列同一性表述，也可以用两者之间差异氨基酸的数量来表达。在一个实施方案中，IL-2 突变蛋白与野生型蛋白之间具有至少 85%，86%，87%，88%，89%同一性，优选 90%以上同一性，优选 95%，但优选不超过 97%，更优选不超过 96%同一性。在另一实施方案中，除了本发明的上述突变外，IL-2 突变蛋白与野生型蛋白之间还可以具有不超过 15 个，例如 1-10 个，或 1-5 个突变，例如，0, 1, 2, 3, 4 个突变。在一个实施方案中，所述其余突变可以是保守取代。

III. 融合蛋白和 IL-2-Fc 二聚体蛋白

在一个方面，本发明还提供包含本发明 IL-2 突变蛋白的融合蛋白。在一个优选的实施方案中，本发明 IL-2 突变蛋白与可以赋予改善的药代动力学性质的另一多肽融合，例如清蛋白，更优选抗体 Fc 片段。

在一个实施方案中，本发明提供 IL-2 突变蛋白融合蛋白，其包含与抗体 Fc 片段融合的本发明 IL-2 突变蛋白。

用于本发明的 Fc 片段可以包含减小或去除效应子功能的突变。在一个优选的实施方案中，

Fc 片段具有减少的由 Fc 区介导的效应子功能，例如减少的或消除的 ADCC 和/或 ADCP 和/或 CDC 效应子功能。例如，在一些特别的实施方案中，用于本发明的 Fc 片段具有降低与 Fcγ 受体结合的 L234A/L235A 突变或 L234A/L235E/G237A。

在再一优选的实施方案中，Fc 片段可以具有导致增加的血清半衰期的突变，例如改善 Fc 片段与 FcRn 结合的突变。

在一些实施方案中，与 IL-2 突变蛋白融合的 Fc 片段为人的 IgG Fc，例如，人 IgG1 Fc，人 IgG2 Fc，或人 IgG4 Fc。在一个实施方案中，Fc 片段包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 6 或 12 或 42 或 43 或与其具有至少 90% 同一性，例如 95%，96%，97%，99% 或更高的同一性或由其组成。

在一些实施方案中，IL-2 突变蛋白直接或通过接头与 Fc 融合。在一些实施方案中，可以选择接头以提高 Fc 融合蛋白对于 CD25⁺ T 细胞的激活作用。在一个实施方案中，接头是 (GGGGS)_n 或 GSGS，更优选为 (GGGGS)₂。

在再一方面，本发明也提供包含与 Fc 片段融合的本发明 IL-2 突变蛋白的二聚体分子。这样的二聚体分子将分子量提高到 60-80KDa，极大地减小了肾清除，而且通过 FcRn 介导的体内循环回收，能进一步的延长 IL2-Fc 融合蛋白的半衰期。

在一些实施方案中，本发明提供 IL-2-Fc 二聚体蛋白，其是同二聚体，其中第一单体和第二单体分别由自 N 端到 C 端包含：i) IL-2 突变蛋白；ii) 接头；和 iii) Fc 片段。

在另一些实施方案中，本发明提供 IL-2-Fc 二聚体蛋白，其是异二聚体，包含：

a) 第一单体，其中所述第一单体自 N 端到 C 端包含：i) IL-2 突变蛋白；ii) 接头；和 iii) 第一 Fc 片段；和

b) 第二单体，其中所述第二单体包含第二 Fc 片段。

在一些实施方案中，第一 Fc 片段和第二 Fc 片段分别包含促进第一单体与第二单体形成异二聚体的第一和第二异二聚化突变。在一些优选实施方案中，第一和第二异二聚化突变包含 Knob : Hole 突变组合，例如突变组合 T366W/S354C: Y349C/T366S/L368A/Y407V。

在一些优选实施方案中，第一 Fc 片段上的第一异二聚体突变包含 Knob 突变，第二 Fc 片段的第二异二聚体突变包含 Hole 突变；或者，第一 Fc 片段上的第一异二聚体突变包含 Hole 突变，第二 Fc 片段的第二异二聚体突变包含 Knob 突变。

如本领域技术人员理解的，适用于本发明融合蛋白和二聚体分子的 Fc 片段可以是任何抗体 Fc 片段。在一个实施方案中，本发明的 Fc 片段是效应物功能沉默的。

在一个实施方案中，在一个或多个选自以下的特性上修饰 Fc 片段：Fc 区的效应子功能和 Fc 区的补体激活功能。在一个实施方案中，所述效应子功能或补体激活功能相对于相同同种型的野生型 Fc 区已经被降低或消除。在一个实施方案中，通过选自以下的方法来降低或消除效应子功能：降低 Fc 区的糖基化、使用天然具有降低或消除的效应子功能的 Fc 同种型、和 Fc 区修饰。

在一个实施方案中，通过降低 Fc 区的糖基化来降低或消除效应子功能。在一个实施方案中，通过选自以下的方法来降低 Fc 区的糖基化：在不允许野生型糖基化的环境中生产本发明的融合蛋白或二聚体分子；除去 Fc 区上已经存在的碳水化合物基团；和修饰 Fc 区使得不发生野生型糖基化。在一个实施方案中，通过修饰使得不发生野生型糖基化的方法来降低 Fc 区的糖基化，如在 Fc 区的位置 297 包含突变，使得该位置的野生型天冬酰胺残基被另一个干扰

该位置糖基化的氨基酸替代，例如 N297A 突变。

在一个实施方案中，通过至少一个 Fc 区修饰来降低或消除效应子功能。在一个实施方案中，至少一个 Fc 区修饰选自：选自以下位置的、损害与一个或多个 Fc 受体的结合的 Fc 区点突变：238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、297、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438 和 439；选自以下位置的损害 C1q 结合的 Fc 区点突变：270、322、329 和 321；以及 CH1 结构域的位置 132 的点突变。在一个实施方案中，通过 Fc 区的点突变 L234A&L235A（即 LALA 突变）降低或消除效应子功能。在一个实施方案中，所述修饰是选自以下位置的损害 C1q 结合的 Fc 区点突变：270、322、329 和 321。在另一个实施方案中，所述修饰是消除一些 Fc 区。

如本领域技术人员理解的，为了促进本发明的异二聚体形成，本发明二聚体分子的 Fc 片段可以包含利于第一单体与第二单体二聚化的突变。优选地，基于 Knob-in-Hole 技术，在第一单体和第二单体中引入相应的 Knob 突变和 Hole 突变。

因此，在一个实施方案中，本发明的二聚体分子包含：

- i) 任选具有突变 P329G、L234A 和 L235A 或具有突变 L234A 和 L235A 的、人 IgG1 亚类的同二聚 Fc-区，或
- ii) 任选具有突变 P329G、S228P 和 L235E 的、人 IgG4 亚类的同二聚 Fc-区，或
- iii) 异二聚 Fc-区，其中
 - a) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A 和 Y407V，或
 - b) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W 和 Y349C，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 S354C，或
 - c) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W 和 S354C，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C，
 或
- iv) 人 IgG4 亚类的异二聚 Fc-区，其中两个 Fc-区多肽都包含突变 P329G、L234A 和 L235A，且
 - a) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A 和 Y407V，或
 - b) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W 和 Y349C，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 S354C，或
 - c) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W 和 S354C，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C，
 或
- v) 人 IgG4 亚类的异二聚 Fc-区，其中两个 Fc-区多肽都包含突变 P329G、S228P 和 L235E，且
 - a) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W，而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A 和 Y407V，或

- b) 一个Fc-区多肽包含突变 T366W 和 Y349C, 而另一个Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 S354C, 或
- c) 一个Fc-区多肽包含突变 T366W 和 S354C, 而另一个Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C。

在一些实施方案中, Fc 区还包含其他利于异二聚体纯化的突变。例如, 可以将 H435R 突变 (Eric J. Smith, Scientific Reports | 5:17943 | DOI: 10.1038/srep17943) 引入异二聚体的 Fc 区之一中 (例如, 带 Hole 突变的 Fc 区), 以利于使用蛋白 A 纯化异二聚体。在另一些实施方案中, 对于包含铰链区的异二聚体单体, 也可以在铰链区中引入突变, 例如 C220S, 以利于异二聚体的形成。

适用于本发明的融合蛋白的 Fc 区也可用于本发明的免疫缀合物中的 Fc 部分。

在一些实施方案中, 与 Fc 区融合的 IL-2 突变蛋白

(i) 包含与 SEQ ID NO: 7、24、26、28、30 或 32 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 7、24、26、28、30 或 32 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 7、24、26、28、30 或 32 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变,

其中所述 IL-2 突变蛋白包含本文所述的突变。

在一些实施方案中, 本发明的与 Fc 融合的 IL-2 突变蛋白

(i) 包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变,

优选地, 其中所述突变蛋白包含 N88D 取代和 B'C' 环区序列 AGDASIH, 以及任选地 T3A。

在一些实施方案中, 本发明的与 Fc 融合的 IL-2 突变蛋白

(i) 包含与 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优

选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变,

优选地, 其中所述突变蛋白包含 N88R 取代和 B'C' 环区序列 AGDASIH, 以及任选地 T3A。

在一些实施方案中, 本发明的与 Fc 融合的 IL-2 突变蛋白

(i) 包含与 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变,

优选地, 其中所述突变蛋白包含 N88R+S130R 取代和 B'C' 环区序列 AGDASIH, 以及任选地 T3A。

在一些实施方案中, 本发明的与 Fc 融合的 IL-2 突变蛋白

(i) 包含与 SEQ ID NO: 28 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 28 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 28 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变,

优选地, 其中所述突变蛋白包含 F42A+N88R+S127E 取代和 B'C' 环区序列 AQSKNFH, 以及任选地 T3A。

在一些实施方案中, 本发明的与 Fc 融合的 IL-2 突变蛋白

(i) 包含与 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变,

优选地, 其中所述突变蛋白包含 F42A+N88R+S127E 取代和 B'C' 环区序列 AGDASIH, 以及任选地 T3A。

在一些实施方案中, 本发明的与 Fc 融合的 IL-2 突变蛋白

(i)包含与 SEQ ID NO: 32 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 32 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个(优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个)的氨基酸改变,

优选地, 其中所述突变蛋白包含 K35E+N88R+S127E 取代和 B'C'环区序列 AQSKNFH, 以及任选地 T3A。

如本领域技术人员明了的, 适用于本发明融合蛋白和二聚体分子中连接 IL-2 突变蛋白和 Fc 片段的接头可以是本领域已知的任何接头。在一些实施方案中, 接头可以包含 IgG1 铰链, 或可以包含选自以下的接头序列: (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGGS)_n, and (GGGS)_n, 其中 n 是至少 1 的整数。优选地, 接头包含(G₄S)₂, 即 GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:5)。

IV. 免疫缀合物

本发明还提供免疫缀合物, 其包含本发明的 IL2 突变蛋白或 IL-2 突变蛋白融合蛋白(例如与 Fc 片段融合的融合蛋白)和抗原结合分子。优选地, 抗原结合分子是免疫球蛋白分子, 特别是 IgG 分子, 或抗体或抗体片段, 特别是 Fab 分子和 scFv 分子或半抗体(包含一条重链和一条轻链, 或由一条重链和一条轻链组成)。

在一些实施方案中, 所述抗原结合分子特异性结合肿瘤细胞上或肿瘤环境中呈现的抗原, 特别优选的是 PD-1、PD-L1 和/或 PD-L2。由此, 本发明免疫缀合物在施用于受试者体内后可以靶向肿瘤细胞或肿瘤环境, 从而提供进一步的治疗益处, 例如以更低的剂量进行治疗的可行性和由此带来的低副作用; 增强的免疫治疗效应或抗肿瘤效应等。

在本发明的免疫缀合物中, 本发明 IL-2 突变蛋白可以直接或通过接头与另一分子或抗原结合分子连接, 且在一些实施方案中, 在两者之间包含蛋白水解切割位点。在本发明的免疫缀合物中, 本发明的 IL-2 突变蛋白或其融合蛋白还可以通过二聚化与另一分子或抗原结合分子连接。

在一些实施方案中, 所述抗体是针对肿瘤相关抗原的抗体, 例如 PD-1、PD-L1 或 PD-L2。

适用于与 IL-2 突变蛋白连接的抗体可以是完整抗体, 或其抗原结合片段。在一些实施方案中, 本发明的抗体是 IgG1 形式的抗体或 IgG2 形式的抗体或 IgG3 形式的抗体或 IgG4 形式的抗体, 优选的, 为 IgG1 形式的抗体。在一些实施方案中, 本发明的抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中, 本发明的抗体是人源化的。在一些实施方案中, 本发明的抗体是人抗体。在一些实施方案中, 本发明的抗体是嵌合抗体。在一个实施方案中, 本发明的抗体的抗原结合片段选自以下的抗体片段: Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、(Fab')₂、单结构域抗体例如 VHH、dAb(domain antibody)或线性抗体或半抗体。

在本发明的一个实施方案中, 本发明的免疫缀合物包含 IL-2 突变蛋白或其融合蛋白与抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段。

在本发明的一个实施方案中, 本发明的免疫缀合物包含:

第一单体，其包含与 Fc 片段融合的 IL-2 突变蛋白；和

第二单体，其包含特异性结合 PD-1 的抗体或其片段，优选地，包含所述抗 PD-1 抗体的一条重链和一条轻链的片段。

在一些实施方案中，第一单体的 Fc 片段中包含 Knob 突变，第二单体的抗体重链中包含 hole 突变，反之亦然。在一些实施方案中，Knob 突变为 Knob: S354C & T366W，和/或 Hole 突变为 Y349C & T366S & L368A & Y407V。

在一个具体实施方案中，本发明的 IL-2 突变蛋白融合蛋白具有如图 1A 的 Format 1 所示的形式。

在本发明的一个实施方案中，所述针对 PD-1 的抗体或其抗原结合片段为 WO2017024465A1 中公开的抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中，所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含 WO2017024465A1 中公开的抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段的一个或多个 CDR（优选 3 个 CDR，即 HCDR1、HCDR2H 和 HCDR3；或 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，更优选 6 个 CDR，即 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3），或包含 WO2017024465A1 中公开的抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段的 VH 和/或 VL，或包含所述抗体的重链和/或轻链。

在一些实施方案中，所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中，所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一些实施方案中，所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR）和 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR）。

在一些方面中，所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）。在一些方面中，所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区（VL）。在一些方面中，所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）。在一些实施方案中，所述重链可变区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（CDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中，所述轻链可变区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（CDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链。在一些实施方案中，所述抗 PD-1 抗体重链包含重链可变区和重链恒定区。在一些实施方案中，本发明抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含抗体轻链。在一些实施方案中，本发明的抗 PD-1 抗体轻链包含轻链可变区和轻链恒定区。在一些实施方案中，本发明抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段还包含重链和轻链。

在一些实施方案中，所述重链可变区 VH

(i) 包含与 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中, 所述轻链可变区 VL

(i)包含与 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii)包含与 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中, 所述 3 个来自重链可变区的互补决定区 (HCDR), HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自

(i) 如 SEQ ID NO:8 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 或

(ii)相对于(i)中的序列, 在所述三个 HCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的序列。

在一些实施方案中, 所述 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (LCDR), LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 选自

(i) 如 SEQ ID NO:15 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 或

(ii) 相对于(i)中的序列, 在所述三个 LCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的序列。

在一些实施方案中, HCDR1 包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序列组成, 或者 HCDR1 包含与 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中, HCDR2 包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序列组成, 或者 HCDR2 包含与 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中, HCDR3 包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序列组成, 或者 HCDR3 包含与 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中, LCDR1 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序列组成, 或者 LCDR1 包含与 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中，LCDR2 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 LCDR2 包含与 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中，LCDR3 包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 LCDR3 包含与 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段重链恒定区 HC 为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区，优选的 IgG1 的重链恒定区，例如带有 L234A&L235A(LALA)突变的 IgG1 的重链恒定区。在一些实施方案中，向重链恒定区中引入 knob-ino-hole 的突变，例如引入 S354C 和 T366W 的突变，获得包含 knob 突变的抗体重链，和/或引入 Y349C & T366S & L368A & Y407V 的突变，获得包含 hole 突变的抗体重链。在一些实施方案中，所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段轻链恒定区为 lambda 或 Kappa 轻链恒定区。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的重链恒定区

(i)包含与选自 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的包含 hole 突变的重链恒定区

(i)包含与选自 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的包含 hole 突变的重链

(i)包含与选自 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的的重链

(i)包含与选自 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个(优选不超过 20 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段的轻链恒定区

(i)包含与选自 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个(优选不超过 20 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段的轻链

(i)包含与选自 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个(优选不超过 20 个或 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中, 所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含:

如 SEQ ID NO:8 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 和如 SEQ ID NO:15 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在本发明的一些具体实施方案中, 所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含:

分别如以下氨基酸序列所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3: SEQ ID NO:9、10 和 11, 以及分别如以下氨基酸序列所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:16、17 和 18。

在本发明的一些具体实施方案中, 所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含:

包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的 VH, 和包含 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的 VL。

在本发明的一些具体的实施方案中，所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含

包含 SEQ ID NO:14 或 22 所示的氨基酸序列或与其具有至 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链；和包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或与其具有至 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链。

在一些优选的实施方案中，所述免疫缀合物中的抗 PD-1 抗体片段包含一条重链和一条轻链或由其组成。

在本发明的一些具体的实施方案中，所述抗 PD-1 抗体片段包含

包含 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列或与其具有至 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的包含 hole 突变的重链；

和包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或与其具有至 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链。

本发明的免疫缀合物，优选地相比抗 PD-1 抗体、相比 IL-2 突变蛋白或其与 Fc 的融合蛋白，和/或相比已知的包含抗 PD-1 抗体和 IL-2 突变蛋白的免疫缀合物，具有如下一个或多个或全部性质：

(1) 具有降低的或消除的与 IL-2R α 结合的亲和力，特别是相比野生型 IL-2 或其融合蛋白；

(2) 具有降低的与 IL-2R $\beta\gamma$ 结合的亲和力，特别是相比 IL-2 突变蛋白或其与 Fc 的融合蛋白，和/或相比已知的包含抗 PD-1 抗体和 IL-2 突变蛋白的免疫缀合物；

(3) 能够选择性激活表达 PD-1 的细胞，即对 PD-1 具有高度选择性；

(4) 在不表达 PD-1 的 T 细胞（例如 CD8 $^+$ 或 CD4 $^+$ T 细胞）中的活性较低，而在表达 PD-1 的 T 细胞（例如 CD8 $^+$ 或 CD4 $^+$ T 细胞）中活性较高，表明其对 PD-1 具有高选择性，特别是相比已知的包含抗 PD-1 抗体和 IL-2 突变蛋白的免疫缀合物；

(5) 在表达（例如过表达）IL-2 受体的细胞中 IL-2 的活性更弱，特别是相比已知的包含抗 PD-1 抗体和 IL-2 突变蛋白的免疫缀合物；

(6) 在表达 IL-2 受体和 PD-1 的细胞中，相比表达 IL-2 受体但是不表达 PD-1 的细胞中，具有更强的 IL-2 活性，表明对 PD-1 阳性细胞的选择性；

(7) 优选地相比抗 PD-1 抗体、相比 IL-2 突变蛋白或其与 Fc 的融合蛋白，或相比抗 PD-1 抗体与 IL-2 突变蛋白或其融合蛋白的联合，和/或相比已知的包含抗 PD-1 抗体和 IL-2 突变蛋白的免疫缀合物，具有更强的抗肿瘤作用，和/或更低的毒性（例如不影响或较低影响被治疗对象的体重）。

V. 多核苷酸、载体和宿主

本发明提供编码以上任何 IL-2 突变蛋白或融合蛋白或二聚体分子或缀合物中的任一条链或任何单体或结构域的核酸。可以采用本领域熟知的方法，通过从头固相 DNA 合成或通过 PCR 诱变编码野生型 IL-2 的现有序列，产生编码本发明突变蛋白的多核苷酸序列。此外，本发明的多核苷酸和核酸可以包含编码分泌信号肽的区段，并与编码本发明突变蛋白的区段可操作连接，从而可以指导本发明突变蛋白的分泌性表达。

本发明也提供包含本发明核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在优选的实施方案中，本发明的表达载体是 pYDO_017 表达载体。

本发明也提供包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。适用于复制并支持突变 IL-2 蛋白或融合物或二聚体或免疫缀合物表达的宿主细胞是本领域中公知的。可以用特定的表达载体转染或转导这类细胞，并且可以生长大量的含载体细胞以用于接种大规模发酵罐，从而获得充足量的 IL-2 突变体或融合物或二聚体或免疫缀合物用于临床应用。在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞或 293 细胞)。可用的哺乳动物宿主细胞系的例子是由 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)；人胚胎肾系(293 或 293T 细胞，如例如记载于 Graham 等,JGenVirol36,59(1977))、幼仓鼠肾细胞 (BHK)、小鼠塞托利 (sertoli) 细胞 (TM4 细胞，如例如记载于 Mather,BiolReprod23,243-251(1980))、猴肾细胞(CV1)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76)、人宫颈癌细胞(HELA)、犬肾细胞(MDCK)、buffalo 大鼠肝细胞(BRL3A)、人肺细胞(W138)、人肝细胞(HepG2)、小鼠乳房肿瘤细胞(MMT060562)、TRI 细胞(如例如记载于 Mather 等,AnnalsN.Y.AcadSci383,44-68(1982))、MRC5 细胞和 FS4 细胞。其它可用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞，包括 dhfr-CHO 细胞 (Urlaub 等,ProcNatlAcadSciUSA77,4216(1980))；和骨髓瘤细胞系如 YO、NS0、P3X63 和 Sp2/0。在一个实施方案中，宿主细胞是真核生物细胞，优选为哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚胎肾(HEK)细胞或淋巴细胞(例如 YO、NS0、Sp20 细胞)。

VI. 制备方法

再一方面，本发明提供制备本发明 IL-2 突变蛋白或融合物或二聚体或缀合物的方法，其中所述方法包括，在适合 IL-2 突变蛋白或融合物或二聚体或缀合物表达的条件下，培养包含编码所述蛋白或融合物或二聚体或缀合物的核酸的宿主细胞，如上文所提供的，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述蛋白或融合物或二聚体或缀合物。

在一个实施方案中，将包含编码 IL-2 突变蛋白的核酸的载体转入细胞中使其表达，随后收集细胞(或细胞培养上清)，提取所述 IL-2 突变蛋白，并进行纯化，以获得所述 IL-2 突变蛋白。在一个具体的实施方案中，所述纯化方法是亲和纯化方法。在另一个具体的实施方案中，所述纯化方法是离子交换纯化。

在一个实施方案中，将包含编码与 Fc 融合的 IL-2 突变蛋白的核酸的载体转入细胞中使其表达，随后收集细胞(或细胞培养上清)，提取所述 Fc 融合的 IL-2 突变蛋白，并进行纯化，以获得所述 Fc 融合的 IL-2 突变蛋白。在一个具体的实施方案中，所述纯化方法是亲和纯化方法。在另一个具体的实施方案中，所述纯化方法是离子交换纯化。

在一个实施方案中，将包含编码与 Fc 融合的 IL-2 突变蛋白的核酸、编码 PD-1 抗体重链的核酸和编码 PD-1 抗体轻链的核酸的载体转入细胞中，使其分别表达并组装为免疫缀合物，随后收集细胞（或细胞培养上清），提取所述免疫缀合物，并进行纯化，以获得所述免疫缀合物。在一个具体的实施方案中，所述纯化方法是亲和纯化方法。在另一个具体的实施方案中，所述纯化方法是离子交换纯化。

VII. 测定法

可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供 IL-2 突变蛋白进行鉴定，筛选，或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

一方面，可以对本发明的 IL-2 突变蛋白，测试其与 IL-2 受体的结合活性。例如，可以通过本领域已知的方法，诸如 ELISA，Western 印迹等，或本文实施例公开的例示性方法，来测定与人 IL-2R α 或 β 蛋白或 IL-2R $\beta\gamma$ 或 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 的结合。例如，可以使用流式细胞术进行测定，其中使经转染在细胞表面上表达突变蛋白的细胞例如酵母展示细胞，与标记的（例如生物素标记的）IL-2R α 或 β 蛋白或 IL-2R $\beta\gamma$ 或 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 复合物进行反应。备选地，突变蛋白与受体的结合，包括结合动力学（例如 K_D 值），可以使用 IL-2-Fc 融合物或二聚体分子形式，在 SPR 测定法中测定。

再一方面，可以通过测定在受体结合下游发生的信号传导和/或免疫激活效应。来间接测量 IL-2 突变蛋白结合 IL-2 受体的能力。

因此，在一些实施方案中，提供了用于鉴定具有生物学活性的突变 IL-2 蛋白的测定法。生物学活性可以包括，例如诱导具有 IL-2 受体的 T 和/或 NK 细胞和/或 Treg 细胞增殖的能力、诱导具有 IL-2 受体的 T 和/或 NK 细胞和/或 Treg 细胞中 IL-2 信号传导的能力、降低的诱导 T 细胞中细胞凋亡的能力、诱导肿瘤消退和/或改善存活的能力、和降低的体内毒性性质，例如降低的血管通透性。本发明也提供体内和/或体外具有这类生物学活性的突变 IL-2 蛋白、其 Fc 融合物和包含其二聚体分子。

本领域中公知多种方法可以用于测定 IL-2 的生物学活性。例如，用于测试本发明 IL-2 突变蛋白（例如以二聚体分子形式）刺激 NK 细胞生成 IFN- γ 的能力的合适测定法，可以包括如下步骤：将培养的 NK 细胞与本发明的突变 IL-2 蛋白温育，并随后通过 ELISA 测量培养基中的 IFN- γ 浓度。IL-2 信号传导诱导数个信号传导途径，并且牵涉 JAK(Janus 激酶)和 STAT(信号转导物和转录的激活剂)信号传导分子。

IL-2 与受体 β 和 γ 亚基的相互作用导致受体以及 JAK1 和 JAK3(分别与 β 和 γ 亚基结合)的磷酸化。然后，STAT5 与磷酸化受体结合，并自身在非常重要的酪氨酸残基上磷酸化。这导致 STAT5 从受体解离、STAT5 二聚化以及 STAT5 二聚体移位至细胞核，在该处它们促进靶基因的转录。由此，可以例如通过测量 STAT5 的磷酸化，评估突变体 IL-2 多肽经由 IL-2 受体诱导信号传导的能力。此方法的详情已经披露在实施例中。例如，可以将 PBMC 用本发明的突变体 IL-2 多肽或融合物或二聚体或免疫缀合物处理，并通过流式细胞术测定磷酸化 STAT5 的水平。

在本发明的与针对抗原的抗体的免疫缀合物的情况下，可以通过在表达抗原的细胞中测定 IL-2 的上述活性或水平。

再有，可以在多种本领域中已知的动物肿瘤模型中评估突变的 IL-2 或其融合物或二聚体或免疫缀合物对肿瘤生长和存活的影响。例如，可以将癌症细胞系的异种移植物植入免疫缺陷型小鼠，并用本发明的突变体 IL-2 多肽或融合物或二聚体或免疫缀合物处理。可以基于肿瘤抑制率(例如，相对于同种型对照抗体计算)，检测本发明的突变体 IL-2 多肽、融合物、二聚体分子和免疫缀合物的体内抗肿瘤效应。此外，可以基于动物的体重变化(例如，相对于给药前，绝对体重的变化或体重变化百分比)来测定本发明的突变体 IL-2 多肽、融合物、二聚体分子和免疫缀合物在体内的毒性。也可以基于死亡率、生命期观察(不良作用的可见症状，例如行为、体重、体温)以及临床和解剖病理学(例如测量血液化学值和/或组织病理学分析)来测定所述体内毒性。

再一方面，可以通过本领域已知的方法，表征本发明突变蛋白的成药性能，例如，表达量和产品的纯度。对于表达量的测定，当突变蛋白自培养细胞中分泌表达达到培养上清液中时，可以对离心收集的细胞培养液进行蛋白含量的测定。或者，可以在对收集的细胞培养液进行一个步骤的纯化后，例如在一步亲和层析纯化后，进行测定。对于产品纯度的测定，可以在对收获的生产细胞的培养上清液实施一步亲和层析纯化后，进行纯度确定，以检测突变蛋白的纯化性能。优选地，本发明突变蛋白，按照此一步亲和层析纯化后，具有显著优于野生型蛋白的纯度，表明本发明突变蛋白具有更好的纯化性能。纯度确定方法可以是本领域已知的任何常规方法，包括但不限于，SEC-HPLC 法。

再一方面，可以通过本领域已知的方法，表征本发明突变体 IL-2 多肽或融合物或二聚体或免疫缀合物的药代动力学性质，例如半衰期。

VIII. 药物组合物和药物制剂

本发明还包括包含突变体 IL-2 多肽或融合物或二聚体或免疫缀合物的组合物(包括药物组合物或药物制剂)和包含编码突变体 IL-2 多肽或融合物或二聚体或免疫缀合物的多核苷酸的组合物。这些组合物还可以任选地包含合适的药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。

可以通过常规的混合、溶解、乳化、包囊、包载或冻干过程来制备包含本发明的突变体 IL-2 多肽或融合物或二聚体或免疫缀合物的药学组合物。可以以常规方式配制药学组合物，其使用一种或多种有助于将蛋白质加工成可药学使用的制剂的生理学可接受载体、稀释剂、赋形剂或辅助剂。合适的配制剂依赖于选择的施用路径。

可以将免疫缀合物以游离酸或碱、中性或盐形式配制成组合物。药学可接受盐是基本保留游离酸或碱的生物学活性的盐。这些包括酸加成盐(acid addition salt)，例如与蛋白质性组合物的游离氨基基团形成的那些，或与无机酸(如例如氢氯酸或磷酸)或与有机酸如乙酸、草酸、酒石酸或扁桃酸形成的。与游离羧基基团形成的盐还可以自无机碱如例如氢氧化钠、钾、铵、钙或铁；或有机碱如异丙胺、三甲胺、组氨酸或普鲁卡因(procaine)衍生。药用盐倾向于比相应的游离碱形式更可溶于水性溶剂和其它质子溶剂中。

IX. 组合产品

在一方面，本发明还提供了组合产品，其包含本发明的突变体 IL-2 多肽或融合物或二聚体或免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂（例如化疗剂、其他抗体、细胞毒性剂、疫苗、抗感染活性剂等）。本发明的组合产品可用于本发明的治疗方法中。

在一些实施方案中，所述组合产品用于预防或治疗癌症。

X. 治疗方法和用途

在一方面中，本发明涉及预防或治疗受试者疾病，如癌症的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何突变体 IL-2 多肽或融合物或二聚体或免疫缀合物。癌症可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌。在一些实施方案中，癌症可以是实体肿瘤或血液肿瘤。在一些实施方案中，所述癌症是胃肠道肿瘤或黑素瘤，例如结肠癌或结直肠癌。在一些实施方案中，所述肿瘤是对已知药物，例如已知抗 PD-1 抗体具有耐受性的肿瘤或癌症，例如难治性肿瘤或癌症。

在一些实施方案中，所述癌症是表征为具有升高的 PD-1、PD-L1 和/或 PD-L2 的蛋白质水平和/或核酸水平（例如表达升高）的癌症。在一些实施方案中，本发明的突变体 IL-2 多肽或融合物或二聚体或免疫缀合物能够用于刺激宿主的免疫系统，例如增强细胞的免疫应答。。依照任何上述实施方案的“刺激免疫系统”可包括免疫功能整体升高，T 细胞功能升高，B 细胞功能升高，淋巴细胞功能恢复，IL-2 受体表达升高，T 细胞响应性升高，天然杀伤细胞活性或淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞活性升高，等等中任一项或多项。

本发明的突变体 IL-2 多肽或融合物或二聚体或免疫缀合物(以及包含其的药物组合物，其任选地另外的治疗剂)可以通过任何合适的方法给药，包括肠胃外给药，肺内给药和鼻内给药，并且，如果局部治疗需要，病灶内给药。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。在一定程度上根据用药是短期或长期性而定，可通过任何适合途径，例如通过注射，例如静脉内或皮下注射用药。本文中涵盖各种用药时程，包括，但不限于，单次给药或在多个时间点多次给药、推注给药及脉冲输注。

为了预防或治疗疾病，本发明的突变体 IL-2 多肽或融合物或二聚体或免疫缀合物的合适剂量(当单独或与一种或多种其他的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和进程、以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述抗体的应答，和主治医师的判断力。所述抗体以一次治疗或经过一系列治疗合适地施用于患者。在一些实施方案中，本发明的突变体 IL-2 多肽或融合蛋白或二聚体或免疫缀合物可以以较高的剂量施用于患者而不会产生毒性。

再一方面，本发明也提供本发明突变体 IL-2 多肽或融合物或二聚体或免疫缀合物在制备用于前述方法(例如用于治疗)的药物中的用途。

描述以下实施例以辅助对本发明的理解。不意在且不当以任何方式将实施例解释成限制本发明的保护范围。

本发明的这些以及其它方面和实施方案在附图(附图简述紧随其后)和以下的发明详述中得到描述并且示例于以下实施例中。上文以及整个本申请中所论述的任何或所有特征可以在本发明的各种实施方案中组合。以下实施例进一步说明本发明，然而，应理解实施例以说明

而非限定的方式来描述，并且本领域技术人员可以进行多种修改。

实施例 1. 抗-hPD-1 与 IL-2 突变体的免疫缀合物设计

本发明设计了一个可以特异性结合人 PD-1 阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合从而解除免疫刹车机制，同时也可以特异性结合 T 细胞或 NK 细胞上 IL-2 受体进而起到激活并扩增 T 或 NK 细胞的免疫缀合物分子 (α PD-1/IL-2m 免疫缀合物)，所述免疫缀合物分子包含抗-PD-1 抗体和 IL-2 突变体，能够增强 PD-1 抗体免疫治疗的效果。

本发明的免疫缀合物分子形式如图 1A 所示，包括两部分：1) 第二单体：其来自结合 PD-1 的抗体，所述结合 PD-1 的抗体序列来源于 WO2017024465A1；和 2) 第一单体：IL-2 突变体 (IL-2 突变蛋白或 IL-2m)，所述突变体经过如下改造：根据 IL-2 与受体复合物的晶体结构 2ERJ (图 2)，在受体的结合界面选择突变位点，降低 IL-2 与受体的结合；优化 IL-2 的 B'C' 环区序列 (A73-R83，野生型为 SEQ ID NO:40) 改善 IL-2 的成药性，所述环区优化为应用人 IL-15 B'C' 环区 (AGDASIH, SEQ ID NO:39) 替换 IL-2 的 B'C' 环区，或对 IL-2 B'C' 环区的最后 4 个氨基酸删除，获得截短的 IL-2B'C' 环区 (AQSKNFH, SEQ ID NO:41)。

实施例中应用的对照分子、IL-2-Fc 融合蛋白和 IL-2 突变体-抗 PD-1 抗体免疫缀合物中的序列信息参见序列列表，且 IL-2 突变信息见下表。

表 1 IL-2 突变体-抗 PD-1 抗体免疫缀合物和对照分子

分子名称	突变位点	B'C' 环区
2061	本研究的对照分子，来源于 US20180326010A1，被设计为消除或降低了突变体 IL-2 多肽对 IL-2R α 亚基的亲和力	WT
3010	C125S	WT
2063	T3A+N88D	IL15B'C' 环区替换
2132	T3A+N88R	IL15B'C' 环区替换
2149	T3A+N88R + S130R	IL15B'C' 环区替换
2213	T3A+F42A+N88R + S127E	IL-2B'C' 环区截短
2214	T3A+F42A+N88R + S127E	IL15B'C' 环区替换
2219	T3A+K35E+N88R + S127E	IL-2B'C' 环区截短

实施例 2. IL-2 受体和免疫缀合物制备

IL-2 受体的表达和纯化

载体构建

将 IL-2 受体 IL-2R α (Uiprot:P01589, aa22-217) 在序列的 C 末端接上 avi 标签 (GLNDIFEAQKIEWHE, 该标签肽可被 BirA 酶催化发生生物素化) 和 6 个组氨酸标签 (HHHHHH), 构建到 pTT5 载体 (Addgene) 上, 然后转染 HEK293 细胞表达, 通过镍柱 (HisTrap excel, GE, 17-3712-06) 亲和纯化得到 IL-2 R α 。

IL-2R $\beta\gamma$ 复合物是基于 Knobs in holes 的 Fc 异源二聚, IL-2R β 的序列被构建到 Fc-Knob 的 N 端 (SEQ ID NO:37), IL-2R γ 的序列被构建到 Fc-Hole 的 N 端 (SEQ ID NO:38), 分别构建到 pcDNA3.1 载体上, 然后在细胞中共转表达。使用瞬时转染的方法将含有 IL-2R β 的载体和 IL-2R γ 的载体共转入 HEK293 细胞中进行表达。首先在超净工作台中准备质粒 DNA 和转染试剂 PEI (Polysciences, 23966), 取 3 mL Opti-MEM 培养基 (Gibco 货号: 31985-070) 加入 50ml 离心管中, 加入 30 μ g 对应质粒的 DNA, 利用 0.22 μ m 的滤头过滤含有质粒的 Opti-MEM 培养基, 随后加入 90 μ g PEI (1g/L), 静置 20 min。将 DNA/PEI 混合物轻柔倒入 27

mL HEK293 细胞并混匀, 在 37 °C, 8% CO₂ 的条件下继续培养 6 天。获得细胞上清用于纯化得到 IL-2R β γ 复合物。镍柱亲和纯化: 将纯化使用的镍柱 (5 ml HisTrap excel, GE, 17-3712-06) 用 0.1 M NaOH 浸泡 2 h, 然后用 5-10 倍柱体积的超纯水冲洗, 去除碱液。纯化前用 5 倍柱体积的结合缓冲液 (20 mM Tris pH 7.4, 300 mM NaCl) 平衡纯化柱; 将细胞上清通过平衡后的柱子; 用 10 倍柱体积的冲洗缓冲液 (20 mM Tris 7.4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole) 通过柱子, 去除非特异性结合的杂蛋白; 然后用 3-5 倍柱体积洗脱液 (20 mM Tris 7.4, 300 mM NaCl, 100 mM imidazole) 将目标蛋白洗脱下来。将收集的蛋白超滤浓缩交换到 PBS (Gibco, 70011-044) 中, 然后用 superdex200 increase (GE, 10/300GL, 10245605) 进一步分离纯化, 收集单体的洗脱峰, 柱子的平衡和洗脱缓冲液为 PBS。

Mabselect 亲和纯化: 细胞以 13000 rpm 离心 20 min, 收集上清, 用预装柱 Hitrap Mabselect Sure 纯化上清液。操作如下: 纯化前用 5 倍柱体积的平衡液 (0.2 M Tris, 0.15 M NaCl, pH7.2) 平衡填料柱; 将收集的上清通过柱子, 再用 10 倍柱体积的平衡液清洗填料柱, 去除非特异性结合蛋白; 用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液 (0.1M sodium citrate, pH 3.5) 冲洗填料, 收集洗脱液; 每 1 ml 洗脱液加入 80 μ L Tris (2M Tris), 使用超滤浓缩管交换到 PBS 缓冲液中, 并测定浓度及纯度。

离子交换纯化: 通过离子交换层析分离出双特异分子中的异源二聚体分子, 去除同源二聚体杂质。

免疫缀合物的制备

抗 PD-1 抗体的重链 Hole 和轻链分别构建到 pcDNA3.1 载体上, IL-2 蛋白通过接头连接到 IgG1 Fc Knob 的 N 末端并构建到 pcDNA3.1 载体上, 将以上三质粒与 3 倍质量的 PEI (如转染 3ml HEK293, 需要 1 μ g 重链 Hole+1 μ g 轻链+1 μ g IL-2m-接头-Fc-Knob+9 μ g PEI) 共转染 HEK293 细胞, 表达制备本实施例中用的各个免疫缀合物分子。

细胞的准备和样品收集纯化与上文受体的制备方法相同。

实施例 3. IL-2 与受体的亲和力测定

采用表面等离子共振法 (SPR) 测定本发明免疫缀合物结合人 IL-2 受体 (IL2R α 或 IL-2R β γ) 的平衡解离常数 (K_D)。基于 SPR 原理, 当一束偏振光以一定的角度入射到棱镜端面, 在棱镜与金膜的界面将产生表面等离子波, 引起金属膜内自由电子产生共振, 即表面等离子共振。分析时, 先在传感芯片表面固定一层蛋白, 然后将待测样品流过芯片表面, 若样品中有能够与芯片表面的蛋白相互作用的分子, 会引起金膜表面折射率变化, 最终导致 SPR 角变化, 通过检测 SPR 角度变化, 获得被分析物的亲和力、动力学常数等信息。

本实施例通过 Biacore T200 (Cytiva) 测定免疫缀合物与 IL-2 受体的 K_D , 具体方法如下: 将含有生物素标签的 IL2R α 及 IL2R β γ 蛋白分别捕获到偶联有 SA (链霉亲和素) 芯片表面后, 通过检测芯片表面蛋白与流动相中的所研究的免疫缀合物和对照分子之间的结合与解离获得亲和力及动力学常数。

该方法包括芯片制备和亲和力检测。测定过程使用 10 倍稀释后的 10 \times HBS-EP+ (BR-1006-69, Cytiva) 作为实验缓冲液。芯片制备过程使用氨基偶联试剂盒 (BR-1006-33, Cytiva), 将 SA 偶联在 CM5 芯片 (29-1496-03, Cytiva) 表面, 偶联后注入 1 M 乙醇胺, 对剩余的活化位点进行封闭。亲和力检测每个循环包括捕获受体、结合一种浓度待研究分子及芯片再生。将梯度稀释后的分子 (分子浓度梯度为 0-400 nM), 以 30 μ l/min 的流速流由低浓度到高浓度的顺序流过芯片表面, 结合时间 180 s, 解离时间 300 s。最后使用 5 mM NaOH (BR-1003-58, Cytiva) 对芯片进行再生。数据结果使用 Biacore T200 分析软件 (版本号 3.1), 使用分析 1:1 结合或稳态分析模型进行分析。

Biacore T200 (Cytiva, T200) 测定待研究的免疫缀合物或对照分子与人 PD1(货号:

PD1-H5221, ACRO Biosystem)的亲和力,具体方法如下:将待研究分子捕获到偶联有 Protein A 芯片 (29127555, Cytiva) 表面后,通过检测芯片表面分子与流动相中的抗原之间的结合与解离获得亲和力及动力学常数。测定过程使用 10 倍稀释后的 10×HBS-EP+ (BR-1006-69, Cytiva) 作为实验缓冲液。亲和力检测每个循环包括捕获待研究分子、结合一种浓度抗原及芯片再生。将梯度稀释后的抗原 (与待研究分子结合时,抗原浓度梯度为 0-40 nM),以 30 μl/min 的流速流由低浓度到高浓度的顺序流过芯片表面,结合时间 180 s,解离时间 600 s。最后使用 10 mM Glycine-HCl, pH 1.5 (BR-1003-54, Cytiva) 对芯片进行再生。数据结果使用 Biacore T200 分析软件 (版本号 3.1),使用 1:1 结合模型进行分析。

表 2 和图 3 分别为免疫缀合物或对照分子与 IL-2Rβγ 的结合常数和结合曲线,3010 为与 Fc 融合的野生型 IL-2 序列,序列参见序列列表,其亲和力为 1.09nM,2061(来源于 US20180326010A1)是对照分子,2061 与 IL-2Rβγ 的亲和力为 1.48nM,本研究 IL-2 免疫缀合物的亲和力都要弱于 3010 和 2061。

表 3 和图 4 分别为免疫缀合物或对照分子与 IL-2Rα 的亲和力和结合曲线,3010 与 IL-2Rα 的亲和力为 4.38E-08M,2061 为不结合,本研究的双特异分子与 IL-2Rα 的结合要弱于野生型的 IL-2,但强于对照分子 2061。

表 4 和图 5 分别为免疫缀合物或对照分子与人 PD1 的亲和力和结合曲线,对照分子和本研究的分子都对 PD1 有很强亲和力。

表 2: 免疫缀合物或对照分子与 IL-2Rβγ 的结合常数

样品 (分子编号)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
3010	2.71E+05	2.94E-04	1.09E-09
2061	9.04E+04	1.34E-04	1.48E-09
2063	9.14E+04	3.88E-03	4.25E-08
2132	3.45E+04	8.88E-03	2.58E-07
2149	2.01E+04	1.27E-02	6.30E-07
2213	3.25E+04	1.51E-02	4.66E-07
2214	4.90E+05	4.92E-02	1.00E-07
2219	3.30E+04	1.82E-02	5.51E-07

表 3. 免疫缀合物或对照分子与 IL-2Rα 的亲和力

样品 (分子编号)	KD (M)
3010	4.38E-08
2061	N.B
2063	3.14E-07
2132	3.84E-07
2149	4.45E-07
2213	Weak binding
2214	Weak binding
2219	5.56E-07

表 4. 免疫缀合物或对照分子与人 PD1 的亲和力

样品 (分子编号)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
-----------	-----------	----------	--------

号)			
2061	4.601E+5	1.755E-4	3.815E-10
2063	3.923E+5	6.189E-5	1.578E-10
2132	4.303E+5	9.091E-5	2.113E-10
2149	4.015E+5	9.708E-5	2.418E-10
2213	4.002E+5	1.052E-4	2.627E-10
2214	4.276E+5	8.897E-5	2.081E-10
2219	4.260E+5	9.967E-5	2.340E-10

实施例 4. 免疫缓合物的体外活性测定

一、在 CTLL2 (huPD1-) 和 CTLL2-hPD-1 (huPD1+) 中针对 PD-1 的活性检测

IL-2 与 CTLL2 细胞表面 IL-2 受体结合, 会激活 CTLL2 JAK-STAT 信号通路, 引发报告基因信号。在 CTLL2 细胞系表面过表达人 PD-1 (hPD-1, uniprot: Q15116), 在 hPD-1 富集作用下, 可以进一步增强 CTLL2 JAK-STAT 信号通路。

CTLL2-hPD-1 细胞系构建:

构建和包装 Lentivirus+hPD-1 慢病毒:

- 1、 6×10^6 293T 细胞铺 T75 培养瓶, 以融合率达到 75-80% 为宜。
- 2、按如下表所列混合均匀包装体系, 室温静置 15min。

组分	加入量
Opti-MEM (gibco)	1 ml
pWPT+hPD1(金唯智)	8 ug
psPAX2(SynbioTech)	4 ug
pMD2g(SynbioTech)	2 ug
PEI (Polysciences)	42 ug

- 3、预先弃去培养皿培养基, 加入 6ml 10%FBS(PEAK) DMEM(ATCC)新鲜培养基。

4、将第<2>步制备的中包装体系加入第<3>步中的更换后的培养基中, 37°C 5%CO₂ 培养箱静置 4-6h。

5、37°C 5%CO₂ 培养箱静置 4-6h 后, 更换 2% 减血清 DMEM 培养基培养, 于 48h 和 72h 分别收集病毒。

6、病毒浓缩: 将收集的病毒离心, 并用 0.45 μ m 滤膜过滤。按照各组分体积比: 病毒上清: 50% PEG8000: 5M NaCl=87: 10: 3, 混合均匀, 4°C 浓缩过夜。4°C, 3000g, 离心 20min, 1ml CTS 培养基 (Gibco, A3021002) 重悬病毒, 4°C 溶解, -80°C 保存。

用 Lentivirus+hPD-1 感染 CTLL2(Promega, CS2028B04), 通过加压筛选和分选获得 CTLL2-hPD-1 稳转细胞系。

实验方法:

- 1、配置 Assay Medium: 1%MEM NEAA (Gibco, 11140-050), 10%FBS(PEAK, PS-FB1) 和 89% IMDM(Gibco, 12440-053)。
- 2、用 Assay Medium 洗涤 CTLL2 或 CTLL2-hPD-1 细胞 2 次。
- 3、用含 0.4ng/ml rhIL2 (R&D, 202-IL) Assay Medium 调整 CTLL2 或 CTLL2-hPD-1 细胞

密度, 铺中间 96 孔白色细胞培养板(NUNC), 每孔 50000 个细胞。

4、边缘孔用等体积 Assay Medium 铺板, 5%CO₂ 37 °C 饥饿处理 18-20h。

5、分别将稀释待测免疫缀合物分子加到细胞板, 5%CO₂ 37°C 孵育 6h。

6、取出培养板室温平衡 15-20min, 每孔添加等体积 Luciferase assay system 试剂(Bio-Glo), 室温孵育 5-15min, 酶标仪(Molecular Devices)读数。

结果见图 6。图 6 结果显示, 本研究的 α PD-1/IL-2m 免疫缀合物在 PD-1 阳性的 CTLL2 细胞上活性要强于 PD-1 阴性的 CTLL2 上的活性, 其中 2132 在两种细胞之间的活性(EC50) 有 24 倍的选择性, 2063 的选择性为 42 倍, 2149 的选择性为 115 倍, 2219 的选择性为 500 倍, 2213 和 2214 的选择性超过 >10000 倍。结果表明, 本发明的免疫缀合物分子可以选择性激活 PD-1 阳性的 CTLL2 细胞。

二、 α PD-1/IL2m 免疫缀合物分子在 PBMC 细胞中 pSTAT5 信号检测

IL-2 与 T 细胞表面 IL-2 受体结合, 会激活 T 淋巴细胞 JAK-STAT 信号通路, 其中 STAT5 磷酸化水平是评判该信号通路激活水平的重要指标。

实验方法:

1. PBMC 细胞复苏

(1)、取液氮冻存 PBMC 细胞 (妙通生物, 货号 PB100C), 37 °C 快速摇动融化。

(2)、将细胞缓慢加入 10ml CTS 培养基(Gibco) 培养基需提前 37 °C 预热, 并加入 100ul DNA 酶(STRMCELL, 货号 07900)。

(3)、离心 300g/8min, 去除上清。

(4)、用 10ml CTS 重悬, 转移至 T75 培养瓶, 37°C 5% 培养箱稳定过夜。

2. pSTAT5 实验

(1)、用 AlexaFluor™488Antibody Labeling Kit(Thermo Fisher, A20181)标记 PD-1 mAb (Innovent, ADI-11416), 制备 AF488-anti human PD-1 荧光抗体, 荧光抗体标记过夜培养的 PBMC 悬浮细胞。

(2)、标记的 PBMC 悬浮细胞铺 96 孔 U 型板, 细胞数量 5×10^5 cells/well。

(3)、分别将不同稀释浓度的待测免疫缀合物加入 96 孔型板, 待检测样品与细胞 37 °C 孵育 30min。

(4)、离心 400g/5min, 去除上清。

(5)、按照 200ul/孔, 加入 4%组织细胞固定液 (Solarbio, P1110), 常温离心 400g/30min。

(6)、按照 200ul/孔, 加破膜液, 4°C 静置 30min, 离心 400g/10min。

(7)、按照 200ul/孔, 加入 perm/wash Buffer (BD), 共细胞洗涤两次。

(8)、配置抗体染液, AF647-pSTAT5 抗体量为 3ul/100ul perm/wash Buffer/well, 其余染色抗体为 1ul/100ul perm/wash Buffer/well; 室温孵育 1.5h, perm/wash Buffer 洗涤 2 次。

名称	厂家	货号/型号
BV421 anti-human CD3	Biolegend	300434
PE anti-human CD4	Biolegend	300508
AF700 anti-human CD8a	Biolegend	300924
BV785 anti-human CD25	Biolegend	356140
Dynabeads Human T-Activator CD3/ CD28	Invitrogen	11131D
AF647-pSTAT5 抗体	BD	562076
AlexaFluor™488Antibody Labeling Kit	Thermo Fisher	A20181
Perm/Wash Buffer	BD	554723

Perm BufferIII	BD	558050
Human IgG Isotype	abcam	Ab206195

(9)、150ul perm/wash Buffer/well 重悬，流式检测。

三、免疫缀合物分子在活化的 PBMC 细胞中 pSTAT5 信号检测

T 淋巴细胞被激活活化后，在 PD-1 作用下，探究和验证，免疫缀合物对活化 T 淋巴细胞 pSTAT5 信号的影响。

1. PBMC 细胞复苏

- (1)、取液氮冻存 PBMC 细胞，37°C 快速摇动融化。
- (2)、将细胞缓慢加入 10ml CTS 培养基(37°C 预热，并含有 100ul DNA 酶)。
- (3)、离心 300g/8min，去除上清。
- (4)、用 10ml CTS 重悬，转移至 T75 培养瓶，37°C 5% 培养箱稳定过夜。

2. T 淋巴细胞活化和静息

(1)、取过夜培养 PBMC 中悬浮细胞，细胞计数，加入等细胞数量 CD3/CD28 Beads，活化刺激 48h。

- (2)、去除 Beads 和培养基洗涤活化细胞。
- (3)、活化细胞转至 T75 培养瓶，37°C 5%静息 48h。

3. pSTAT5 实验

(1)、用 AlexaFluor™488Antibody Labeling Kit(Thermo Fisher, A20181)标记 PD-1 mAb (Innovent, ADI-11416)，制备 AF488-anti human PD-1 荧光抗体，荧光抗体标记活化和静息的 T 细胞。

- (2)、细胞铺 96 孔 U 型板，细胞数量 5×10^5 cells/well。
- (3)、分别将不同稀释检测分子加入 96 孔型板，待检测分子与细胞 37° 孵育 30min。
- (4)、400g/5min 离心，去除上清。
- (5)、按照 200ul/孔，加入 4%组织细胞固定液，常温离心 400g/30min。
- (6)、按照 200ul/孔，加破膜液，4°C 静置 30min，离心 400g/10min。
- (7)、按照 200ul/孔，加入 perm/wash Buffer，共细胞洗涤两次。
- (8)、配置抗体染液，pSTAT5 抗体 (BD) 量为 3ul/100ul perm/wash Buffer/well，其余染色抗体为 1ul/100ul perm/wash Buffer/well；室温孵育 1.5h，perm/wash Buffer 洗涤 2 次。
- (9)、150ul perm/wash Buffer/well 重悬，流式检测。

图 7 的结果显示，在 PD-1 阴性(PD-1-)的 T 细胞 (CD4+PD1-T 或 CD8+PD1-T) 上，本研究的分子活性都要比对照分子 2061 弱；在 PD-1 阳性(PD-1+)的 T 细胞(CD4+PD1+T 或 CD8+PD1+T)上，2063 的活性要优于对照分子 2061，说明 2063 对 PD-1 的选择性要大于 2061，本研究的另外几个分子在 PD-1+的 T 细胞上活性也是弱于 2061，说明本研究的分子因高活性 IL-2 带来的毒性要小于 2061，在体内能够耐受的剂量也要高于 2061。

四、HEK- Blue™ IL-2 cell reporter assay 检测本发明的免疫缀合物活性

在 HEK293 细胞中，引入过表达 IL2R(CD25,CD122,CD132)、JAK3 和 STAT5 基因，构建拥有 IL2 信号通路的 HEK293+hIL2R/SEAP 细胞系 (huPD-1-细胞，HEK-Blue™ IL-2 Cells, Invivogen, hkb-il2)，在 IL2 作用下，激活 HEK293+hIL2R/SEAP cell reporter 报告基因。

实验材料

名称	厂家/品牌	货号/型号
DMEM 培养基	Gibco	11965-118

Normocin	Invivogen	ANT-NR-1
Penicillin-Streptomycin	Gibco	15070-063
澳洲胎牛血清 (FBS)	PeakSerum	PS-FB1
HEK-Blue™ IL-2 Cells	Invivogen	hkb-il2
QUANTI-Blue	Invivogen	REP-QBS2
F96MicroWell 微孔板	NUNC	167008
荧光定量酶标仪	Molecular Devices	spectra Max I3x
离心机	Thermo	ST40R

HEK293+hIL2R+hPD-1/SEAP 细胞系构建: 如上构建和包装 Lentivirus+hPD-1 慢病毒, 用 Lentivirus+PD-1 感染 HEK293+h IL2R/SEAP(Invivogen, hkb-il2), 加压筛选和分选 HEK293+hIL2R+hPD-1/SEAP 稳转细胞系 (huPD-1+细胞), 用于下述实验。

实验方法:

1. 细胞消化, 调整细胞密度, 铺中间 60 孔, 每孔细胞数量 50000。
2. 将如图所示稀释的免疫缀合物和对照分子分别加入相应细胞孔板, 37°C 培养 20-24h。
4. 取 20ul 细胞培养上清加入 180ul QUANTI-Blue, 室温 15min, 测定 OD630。

HEK-Blue™ IL-2 Cells (huPD-1-细胞) 是一个过表达了 IL-2 受体的 HEK293 细胞。从图 8 和表 4 可以看出, 本研究获得的免疫缀合物在 IL-2 的活性比 2061 弱了最小 3.14 倍, 最大的弱化到 2.21E+08 倍。

在过表达的 PD-1 的细胞 (HEK293+hIL2R+hPD-1/SEAP 稳转细胞系 (huPD-1+细胞)) 上, 免疫缀合物可以达到很强的 IL-2 活性, 在两种细胞保持很高的选择性, 如 2063 的选择性可以达到 3.52 倍, 2132 的选择性可以达到 53.45 倍, 2149 的选择性可以达到 96.04 倍, 2219 为 606.11 倍, 2214 为 5119.78 倍, 2213 为 1.57E+07 倍。

表 4. 本研究免疫缀合物在 PD-1-细胞和 PD-1+细胞的选择活性

	2061	2063	2132	2149	2213	2214	2219
Fold [#]	1	3.52	53.45	96.04	1.57E+7	5119.78	606.11

#:Fold=分子在 PD-1- reporter assay EC50 / PD-1+ reporter assay EC50

实施例 5. 免疫缀合物的体内药效实验

为了证明 α PD-1/IL2m 免疫缀合物在体内的药效, 采用 MC38 细胞(小鼠结肠癌细胞系, 上海和元生物)接种 hPD-1 敲入小鼠测定本发明的双功能 PD-1 抗体和 IL-2 突变分子免疫缀合物 (2063, 2132) 的抗肿瘤药效。实验使用 SPF 等级的雌性 hPD-1 敲入小鼠 (购自上海南方模式生物), 合格证编号为 NO. 20170010005748。

将 MC38 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞, 以 PBS(1×)重悬 MC38 细胞, 制备成细胞浓度为 5×10^6 个/ml 细胞悬液。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 hPD-1 敲入小鼠右侧腹部区域中来建立 MC38 荷瘤小鼠模型。

肿瘤细胞接种 6 天后检测各只小鼠瘤体积, 进行分组 (每组 8 只小鼠), 给药剂量和方式如表 5 所示。

表 5: 体内实验的分组、给药剂量和方式

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
----	------	------	------

h-IgG*	20 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2063	10 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2132	10 mg/kg	QW x3	腹腔注射

*: h-IgG 为同种型对照抗体, 购自 Equitech-Bio, 批号 161206-0656。

h-IgG, 2063 和 2132 的使用浓度分别为 2 mg/ml, 1 mg/ml 和 1 mg/ml, 每周给药一次, 共 3 次(QWx3)。分别在 MC38 细胞接种后第 6、13、20 天给药, 每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重, 如图 9A 所示, 监测至 24 天后结束。

接种后第 24 天计算相对肿瘤抑制率 (TGI%), 计算公式如下: $TGI\% = 100\% * (\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / (\text{对照组肿瘤体积} - \text{对照组给药前肿瘤体积})$ 。肿瘤体积测定: 采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴 (L) 和最大宽轴 (W), 肿瘤体积按如下公式计算: $V = L * W^2 / 2$ 。采用电子天平测定体重。

肿瘤抑制率结果如表 6 所示: 在接种后第 24 天, 与 h-IgG, 20 mg/kg 组对比, 2063 和 2132 的肿瘤抑制率分别为 98% 和 96%。同时对小鼠体重进行检测的结果(图 9B)显示, 在接种后第 24 天, 小鼠体重无显著差异。

表 6、抗肿瘤药效统计

组别	肿瘤体积(mm ³)	肿瘤抑制率 (%)
h-IgG	2329.61	N/A
2063	112.47	98
2132	170.91	96

为了进一步证明 α PD-1/IL2m 免疫缀合物体内药效优于亲本的抗 PD-1 单抗 (Sintilimab, 又称 IBI308), 采用 MC38 细胞(小鼠结肠癌细胞系, 上海和元生物)接种 hPD-1 敲入小鼠测定本发明的免疫缀合物 (2063) 的抗肿瘤药效。实验使用 SPF 等级的雌性 hPD-1 敲入小鼠 (购自上海南方模式生物), 合格证编号为 NO. 20170010004237。

将 MC38 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞, 以 PBS(1x) 重悬 MC38 细胞, 制备成细胞浓度为 5×10^6 个/ml 细胞悬液。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 hPD-1 敲入小鼠右侧腹部区域中来建立 MC38 荷瘤小鼠模型。

肿瘤细胞接种 12 天后检测各只小鼠瘤体积, 进行分组 (每组 8 只小鼠), 给药剂量和方式如表 7 所示。

表 7: 体内实验的分组、给药剂量和方式

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG*	10 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2063	10 mg/kg	QW x3	腹腔注射
IBI308	10 mg/kg	QW x3	腹腔注射

*: h-IgG 为同种型对照抗体, 购自 Equitech-Bio, 批号 161206-0656。

h-IgG, 2063 和 IBI308 的使用浓度均为 1 mg/ml, 每周给药一次, 共 3 次(QWx3)。分别在 MC38 细胞接种后第 12、19、26 天给药, 每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重, 如图 10A 所

示, 监测至 29 天后结束。接种后第 29 天计算相对肿瘤抑制率 (TGI%), 计算公式如下: $TGI\% = 100\% * (\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / (\text{对照组肿瘤体积} - \text{对照组给药前肿瘤体积})$ 。肿瘤体积测定: 采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴 (L) 和最大宽轴 (W), 肿瘤体积按如下公式计算: $V = L * W^2 / 2$ 。采用电子天平测定体重。

肿瘤抑制率结果如表 8 所示: 在接种后第 29 天, 与 h-IgG, 20 mg/kg 组对比, 2063 和 IBI308 的肿瘤抑制率分别为 112% 和 56%。同时对小鼠体重进行检测的结果(图 10B)显示, 在接种后第 29 天, 小鼠体重无显著差异。

表 8、抗肿瘤药效统计

组别	肿瘤体积(mm ³)	肿瘤抑制率 (%)
h-IgG	2041.49	N/A
2063	66.19	112
IBI308	1057.37	55

为了进一步证明 α PD-1/IL2m 免疫缀合物的体内药效, 采用 PD-1 抗体耐药的 B16F10 细胞(小鼠黑色素瘤细胞系, ATCC CRL-6475)接种 hPD-1 敲入小鼠测定本发明的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物 (2063), 亲本抗 PD-1 单抗 (IBI308), 以及 PD-1 单抗和 IL2m-Fc 融合蛋白 (2124, IL-2 序列与 2063 相同, 序列见序列表) 联合给药的抗肿瘤药效。实验使用 SPF 等级的雌性 hPD-1 敲入小鼠 (购自上海南方模式生物), 合格证编号为 NO. 20170010004768。

将 B16F10 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞, 以 PBS(1x) 重悬 B16F10 细胞, 制备成细胞浓度为 2.5×10^6 个/ml 细胞悬液。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 hPD-1 敲入小鼠右侧腹部区域中来建立 B16F10 荷瘤小鼠模型。

肿瘤细胞接种 7 天后检测各只小鼠瘤体积, 进行分组 (每组 6 只小鼠), 给药剂量和方式如表 9 所示。

表 9: 体内实验的分组、给药剂量和方式

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG*	10 mg/kg	QW x3	腹腔注射
IBI308	10 mg/kg	QW x3	腹腔注射
IBI308 + 2124	10 mg/kg + 6 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2063	10 mg/kg	QW x3	腹腔注射

*: h-IgG 为同种型对照抗体, 购自 Equitech-Bio, 批号 161206-0656。

h-IgG, IBI308, 2124 和 2063 的使用浓度分别为 1 mg/ml, 1 mg/ml, 0.6 mg/ml 和 1 mg/ml, 每周给药一次, 共 3 次 (QWx3)。分别在 B16F10 细胞接种后第 8、15 天和 22 天给药, 每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重, 如图 11A-C 所示, 监测至 28 天后结束。

因为 B16F10 细胞容易转移诱导小鼠死亡, 因此按照接种后第 22 天计算相对肿瘤抑制率 (TGI%), 计算公式如下: $TGI\% = 100\% * (\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / (\text{对照组肿瘤体积} - \text{对照组给药前肿瘤体积})$ 。肿瘤体积测定: 采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴 (L) 和最大宽轴 (W), 肿瘤体积按如下公式计算: $V = L * W^2 / 2$ 。采用电子天平测定体重。肿瘤超过 2000 mm^3 会对该小鼠进行安乐死处理。若组内超过半数死亡, 整个组的肿瘤生长曲线在该时间点不显

示。

肿瘤抑制率结果如表 10 所示：在接种后第 22 天,与 h-IgG 组对比, IBI308, IBI308 + 2214, 2063 的肿瘤抑制率分别为 2%, 84%和 99%, 且 2063 在 CR 率明显优于 IBI308 以及 IBI308 联合无靶向的 IL2m-Fc 分子 (2124)。同时对小鼠体重进行检测的结果(图 11C)显示, 在监测期间内,小鼠体重无显著差异。

表 10. 抗肿瘤药效统计

组别	肿瘤体积(mm ³)	肿瘤抑制率(%) @Day17	完全缓解率* @Day28
h-IgG	2900.61	N/A	0/6
IBI308	2838.44	2	0/6
IBI308 + 2214	362.03	90	0/6
2063	90.74	99	3/6

*完全缓解率：肿瘤完全消退，肿瘤体积为 0。

为了进一步证明本发明的 α PD-1/IL2m 免疫缀合物 2149 的体内药效, 采用 MC38 细胞(小鼠结肠癌细胞系, 上海和元生物)接种 hPD-1 敲入小鼠测定本发明的免疫缀合物 (2149) 的抗肿瘤药效。实验使用 SPF 等级的雌性 hPD-1 敲入小鼠小鼠 (购自上海南方模式生物), 合格证编号为 NO. 20170010006762。

将 MC38 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞, 以 PBS(1 \times)重悬 MC38 细胞, 制备成细胞浓度为 5×10^6 个/ml 细胞悬液。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 hPD-1 敲入小鼠右侧腹部区域中来建立 MC38 荷瘤小鼠模型。

肿瘤细胞接种 8 天后检测各只小鼠瘤体积, 进行分组 (每组 8 只小鼠), 给药剂量和方式如表 11 所示。

表 11: 体内实验的分组、给药剂量和方式

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG*	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 10 mg/kg	10 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 20 mg/kg	20 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 40 mg/kg	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射

*: h-IgG 为同种型对照抗体, 购自 Equitech-Bio, 批号 161206-0656。

h-IgG, 2149, 10 mg/kg, 2149, 20 mg/kg 和 2149, 40 mg/kg 的使用浓度分别为 4 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml 和 4 mg/ml, 每周给药一次, 共 3 次(QWx3)。分别在 MC38 细胞接种后第 8、15 和 22 天给药, 每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重, 如图 12A-B 所示。肿瘤超过 2000 mm³ 会对该小鼠进行安乐死处理, 整个实验部分小鼠一直监测至 61 天后结束。因为部分组别小鼠肿瘤体积超过 2000 mm³ 被安乐死, 因此按照接种后第 36 天计算相对肿瘤抑制率 (TGI%), 计算公式如下: $TGI\% = 100\% * (\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / (\text{对照组肿瘤体积} - \text{对照组给药前肿瘤体积})$ 。肿瘤体积测定: 采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴 (L) 和最大宽轴 (W), 肿瘤体积按如下公式计算: $V = L * W^2 / 2$ 。采用电子天平测定体重。

肿瘤生长曲线和生存曲线如图 12A 和 12B 所示, 2149 分子不同剂量组抗肿瘤作用呈现剂

量依赖性,并且在 20 mg/kg 以及 40 mg/kg 组别,小鼠肿瘤完全消退。并且这一优势在图 12B 的生存曲线中也有体现,该两组小鼠 100%肿瘤消退,而 10 mg/kg 组别中,8 只小鼠仅有 2 只肿瘤完全消退。肿瘤抑制率结果如表 12 所示:在接种后第 36 天,与 h-IgG 组对比,2149, 10 mg/kg, 2149, 20 mg/kg 和 2149,40 mg/kg 的肿瘤抑制率分别为 84%, 103%和 103%。同时对小鼠体重进行检测的结果(图 12C)显示,在接种后第 36 天,小鼠体重无显著差异。

表 12. 抗肿瘤药效统计

组别	肿瘤体积(mm ³)	肿瘤抑制率(%) @ Day17	完全缓解率* @ Day36
h-IgG	2426.63	N/A	0/8
2149, 10 mg/kg	458.62	84	2/8
2149, 20 mg/kg	0	103	8/8
2149, 40 mg/kg	0	103	8/8

*完全缓解率: 肿瘤完全消退, 肿瘤体积为 0.

为了证明免疫缀合物 2149 的体内药效, 采用 PD-1 抗体耐药的 B16F10 细胞(小鼠黑色素瘤细胞系, ATCC CRL-6475)接种 hPD-1 敲入小鼠测定本发明的双功能 PD-1 抗体和 IL-2 突变分子融合蛋白(2149)的抗肿瘤药效。实验使用 SPF 等级的雌性 hPD-1 敲入小鼠(购自上海南方模式生物), 合格证编号为 NO. 20170010007909。

将 B16F10 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞, 以 PBS(1×)重悬 B16F10 细胞, 制备成细胞浓度为 2.5×10^6 个/ml 细胞悬液。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 hPD-1 敲入小鼠右侧腹部区域中来建立 B16F10 荷瘤小鼠模型。

肿瘤细胞接种 6 天后检测各只小鼠瘤体积, 进行分组(每组 8 只小鼠), 给药剂量和方式如表 13 所示。

表 13: 体内实验的分组、给药剂量和方式

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG*	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射
IBI308, 20 mg/kg	20 mg/kg	QW x3	腹腔注射
IBI308, 40 mg/kg	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 20mg/kg	20 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 40mg/kg	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射

*: h-IgG 为同种型对照抗体, 购自 Equitech-Bio, 批号 161206-0656。

h-IgG, IBI308, 20mg/kg, IBI308, 40mg/kg, 2149-20mg/kg 和 2149, 40mg/kg 的使用浓度分别为 4 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml 和 4 mg/ml, 每周给药一次, 共 3 次(QWx3)。分别在 B16F10 细胞接种后第 8、15、22 天给药, 每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重, 如图 13A-B 所示, 监测至 22 天后结束。因为 B16F10 细胞容易转移诱导小鼠死亡, 因此按照接种后第 15 天计算相对肿瘤抑制率(TGI%), 计算公式如下: $TGI\% = 100\% * (\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / (\text{对照组肿瘤体积} - \text{对照组给药前肿瘤体积})$ 。肿瘤体积测定: 采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴(L)和最大宽轴(W), 肿瘤体积按如下公式计算: $V = L * W^2 / 2$ 。采用电子天平测

定体重。肿瘤超过 2000 mm³ 会对该小鼠进行安乐死处理。

小鼠肿瘤生长曲线如图 13A 和 13B 所示，在 PD1 耐药模型中，IBI308 几乎未显示出药效，但是 2149 的 20 mg/kg 和 40 mg/kg 组别展现出一定的抗肿瘤作用，且高剂量抗肿瘤作用优于低剂量，该作用同时在小鼠生存曲线中得到一定体现，高剂量组别在实验终点仍有 2 只小鼠肿瘤完全消退（图 13C 和表 14）。

肿瘤抑制率结果如表 12 所示：在接种后第 15 天，与 h-IgG, 40 mg/kg 组对比，IBI308, 20 mg/kg, IBI308, 40 mg/kg, 2149, 20 mg/kg 和 2149, 40 mg/kg 的肿瘤抑制率分别为 29%, 27%, 82% 和 86%。同时对小鼠体重进行检测的结果(图 13D)显示，在接种后第 22 天，小鼠体重无显著差异。

表 14. 抗肿瘤药效统计

组别	肿瘤体积(mm ³)	肿瘤抑制率 (%) @Day15	完全缓解率 @Day22
h-IgG	1014.92	N/A	0/6
IBI308, 20 mg/kg	735.02	29	0/6
IBI308, 40 mg/kg	757.11	27	0/6
2149, 20 mg/kg	227.62	82	0/6
2149, 40 mg/kg	193.90	86	2/6

为了证明 α PD-1/IL2m 免疫缀合物 2149 的体内药效优于对照药物 PD-1-IL2v (分子编号 2061, 序列来源 US20180326010A1, 也参见序列表), 采用 PD-1 抗体耐药的 B16F10 细胞(小鼠黑色素瘤细胞系, ATCC CRL-6475)接种 hPD-1 敲入小鼠测定本发明的双功能 PD-1 抗体和 IL-2 突变分子融合蛋白 (2149) 的抗肿瘤药效。实验使用 SPF 等级的雌性 hPD-1 敲入小鼠 (购自上海南方模式生物), 合格证编号为 NO. 20170010008942。

将 B16F10 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞, 以 PBS(1 \times)重悬 B16F10 细胞, 制备成细胞浓度为 2.5 \times 10⁶ 个/ml 细胞悬液。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 hPD-1 敲入小鼠右侧腹部区域中来建立 B16F10 荷瘤小鼠模型。

肿瘤细胞接种 8 天后检测各只小鼠瘤体积, 进行分组 (每组 7 只小鼠), 给药剂量和方式如表 15 所示。

表 15. 体内实验的分组、给药剂量和方式

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG*	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射
IBI308	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2061, 10mg/kg	10 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2061, 20mg/kg	20 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2061, 40mg/kg	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 10mg/kg	10 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 40mg/kg	20 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2149, 40mg/kg	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射

*: h-IgG 为同种型对照抗体, 购自 Equitech-Bio, 批号 161206-0656。

h-IgG, IBI308, 40mg/kg, 2061, 10mg/kg, 2061, 20mg/kg, 2061, 40mg/kg, 2149, 10mg/kg, 2149, 20mg/kg 和 2149-40mg/kg 的使用浓度分别为 4 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml 和 4 mg/ml, 每周给药一次, 共 3 次(QWx3)。分别在 B16F10 细胞接种后第 8、15、22 天给药, 每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重, 如图 14A 所示, 监测至 33 天后结束。由于 B16F10 细胞容易转移造成小鼠死亡, 因此按照接种后第 19 天计算相对肿瘤抑制率 (TGI%), 计算公式如下: $TGI\% = 100\% * (\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / (\text{对照组肿瘤体积} - \text{对照组给药前肿瘤体积})$ 。肿瘤体积测定: 采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴 (L) 和最大宽轴 (W), 肿瘤体积按如下公式计算: $V = L * W^2 / 2$ 。采用电子天平测定体重。肿瘤超过 2000 mm³ 会对该小鼠进行安乐死处理。若组内超过半数死亡, 整个组的肿瘤生长曲线在该时间点不显示。

肿瘤抑制率结果如表 16 所示: 在接种后第 19 天, 与 h-IgG, 40 mg/kg 组对比, IBI308, 40 mg/kg, 2061, 10mg/kg, 2149, 10mg/kg, 2149, 20mg/kg 和 2149-40mg/kg 的肿瘤抑制率分别为 21%, 96%, 79%, 87% 和 97%。2061 的 20 mg/kg 和 40 mg/kg 因为第一针给药后出现体重大幅下降且小鼠出现死亡, 因此该组别的 TGI 并未计算。

并且我们对小鼠生存做了统计分析 (图 14B), 图示可见, 对比 2061 和 2149 在本实验中最大给药/耐受剂量, 我们可以看出, 2149 在 40 mg/kg 剂量下、2061 分子 10 mg/kg 剂量下小鼠生存的更多, 对于 2149, 7 只小鼠中有 3 只肿瘤完全消退, 而 2061 仅有 1 只小鼠肿瘤完全消退。同时对小鼠体重进行检测的结果 (图 14C) 显示, 在接种后第 29 天, 2149 各给药剂量组别小鼠体重均未出现下降, 而 2061 组别的小鼠出现体重下降, 在低剂量 (10 mg/kg) 情况下, 小鼠体重平均下降超过 5%, 中剂量 (20 mg/kg) 和高剂量 (40 mg/kg) 出现小鼠死亡, 每组小鼠总共有 7 只, 死亡 6 只, 详细情况见表 12。而 2149 相对安全, 无论是低剂量, 中剂量还是高剂量, 体重下降均不明显, 且仅在低剂量和中剂量死亡 1 只小鼠, 而在高剂量小鼠未出现小鼠死亡, 且有比 2061 更高的完全肿瘤缓解率 (表 16)。因此 2149 比 2061 药效更优, 且更为安全, 具有更高的治疗窗口。

表 16. 抗肿瘤药效统计

组别	Day 19 肿瘤体积 (mm ³)	Day 19 小鼠死亡情况	Day 33 肿瘤完全缓解率
h-IgG	1934.73	3/7	0/7
IBI308, 40 mg/kg	1540.91	2/7	0/7
2061, 10 mg/kg	146.28	0/7	1/7
2061, 20 mg/kg	N/A	6/7	0/7
2061, 40 mg/kg	N/A	6/7	0/7
2149, 10 mg/kg	450.77	1/7	0/7
2149, 20 mg/kg	301.05	1/7	1/7
2149, 40 mg/kg	114.50	0/7	3/7

为了验证 α PD-1/IL2m 免疫缀合物 2214 体内药效, 采用 MC38 细胞 (小鼠结肠癌细胞系, 上海和元生物) 接种 hPD-1 敲入小鼠测定本发明的双功能 PD-1 抗体和 IL-2 突变分子融合蛋白 (2214) 的抗肿瘤药效。实验使用 SPF 等级的雌性 hPD-1 敲入小鼠 (购自上海南方模式生物), 合格证编号为 NO. 20170010010829。

将 MC38 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞, 以 PBS(1x) 重悬 MC38

细胞,制备成细胞浓度为 5×10^6 个/ml 细胞悬液。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 hPD-1 敲入小鼠右侧腹部区域中来建立 MC38 荷瘤小鼠模型。

肿瘤细胞接种 7 天后检测各只小鼠瘤体积,进行分组(每组 7 只小鼠),给药剂量和方式如表 17 所示。

表 17. 体内实验的分组、给药剂量和方式

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
h-IgG*	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2214	20 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2214	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射

*: h-IgG 为同种型对照抗体,购自 Equitech-Bio,批号 161206-0656。

h-IgG 和 2214 的使用浓度均为 4 mg/ml,每周给药一次,共 3 次(QWx3)。分别在 MC38 细胞接种后第 7、14、21 天给药,每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重,如图 15A 所示,监测至 56 天后结束。因对照组肿瘤体积超过 2000 mm^3 ,因此我们接种后第 28 天计算相对肿瘤抑制率(TGI%),计算公式如下: $\text{TGI}\% = 100\% * (\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / (\text{对照组肿瘤体积} - \text{对照组给药前肿瘤体积})$ 。肿瘤体积测定:采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴(L)和最大宽轴(W),肿瘤体积按如下公式计算: $V = L * W^2 / 2$ 。采用电子天平测定体重。

肿瘤抑制率结果如表 18 所示:在接种后第 28 天,与 h-IgG, 20 mg/kg 组对比, 2214 的肿瘤抑制率为 104%。同时对小鼠体重进行检测的结果(图 15C)显示,在接种后第 28 天,小鼠体重无显著差异。

表 18. 抗肿瘤药效统计

组别	肿瘤体积(mm^3)	肿瘤抑制率 (%) @Day28	肿瘤完全缓解 @Day56
h-IgG	2183.75	N/A	0/7
2214, 20mg/kg	17.60	104	6/7
2214, 40mg/kg	16.73	104	7/7

为了证明 $\alpha\text{PD-1/IL2m}$ 免疫缀合物 2214 的体内药效,采用 PD-1 抗体耐药的 B16F10 细胞(小鼠黑色素瘤细胞系, ATCC CRL-6475)接种 hPD-1 敲入小鼠测定本发明的双功能 PD-1 抗体和 IL-2 突变分子融合蛋白(2214)的抗肿瘤药效。实验使用 SPF 等级的雌性 hPD-1 敲入小鼠(购自上海南方模式生物),合格证编号为 NO. 20170010010829。

将 B16F10 细胞进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞,以 PBS(1x)重悬 B16F10 细胞,制备成细胞浓度为 2.5×10^6 个/ml 细胞悬液。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 hPD-1 敲入小鼠右侧腹部区域中来建立 B16F10 荷瘤小鼠模型。

肿瘤细胞接种 7 天后检测各只小鼠瘤体积,进行分组(每组 7 只小鼠),给药剂量和方式如表 19 所示。

表 19: 体内实验的分组、给药剂量和方式

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
----	------	------	------

h-IgG*	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2214, 20mg/kg	20 mg/kg	QW x3	腹腔注射
2214, 40mg/kg	40 mg/kg	QW x3	腹腔注射

*: h-IgG 为同种型对照抗体, 购自 Equitech-Bio, 批号 161206-0656。

h-IgG, 2214-20mg/kg 和 2214, 40mg/kg 的使用浓度分别为 4 mg/ml, 2 mg/ml 和 4 mg/ml, 每周给药一次, 共 3 次(QWx3)。分别在 B16F10 细胞接种后第 7、14、21 天给药, 每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重, 如图 16A-B 所示, 监测至 63 天后结束。肿瘤体积测定: 采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴 (L) 和最大宽轴 (W), 肿瘤体积按如下公式计算: $V=L*W^2/2$ 。采用电子天平测定体重。肿瘤超过 2000 mm³ 会对该小鼠进行安乐死处理。

小鼠生存曲线如图 16A 所示, 2214 的两个剂量均能显著延长小鼠的生存期。同时对小鼠体重进行检测的结果(图 16C)显示, 在接种后第 22 天, 小鼠体重无显著差异。

序列表

SEQ ID NO	描述	序列
1	全长天然 IL-2	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQC LEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
2	成熟 IL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQC LEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
3	野生型 IL-2 (包含 C125S)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQC LEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
分子 2063	具有 T3A+N88D 突变, 和 IL15B'C' 环区替换	
4	IL-2 突变蛋白	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQC LEEEELKPLEEVLNLAGDASIHDLISDINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
5	接头	GGGGSGGGGS
6	Fc-knob	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS

		KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	IL-2m- 接头 -Fc-knob	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVNLNLAGD ASIHDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	抗 PD-1 重链 可变区	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGLIIPMFDTAGYAQKFQGRVAITVDE STSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAEHSSTGTFDYWG QGTLVTVSS
9	抗 PD-1 重链 可变区 CDR1	GGTFSSYAIS
10	抗 PD-1 重链 可变区 CDR2	LIIPMFDTAGYAQKFQG
11	抗 PD-1 重链 可变区 CDR3	AEHSSTGTFDY
12	Fc-hole	DKTHTCPPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	抗 PD-1 重链 恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPEA APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	抗 PD-1 重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGLIIPMFDTAGYAQKFQGRVAITVDE STSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAEHSSTGTFDYWG

		QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLV KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
15	抗 PD-1 轻链 可变区	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPKLLISAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYCQQANHLPTFGGGTKVEIK
16	抗 PD-1 轻链 可变区 CDR1	RASQGISSWLA
17	抗 PD-1 轻链 可变区 CDR2	AASSLQS
18	抗 PD-1 轻链 可变区 CDR3	QQANHLPT
19	抗 PD-1 轻链 恒定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
20	抗 PD-1 轻链	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPKLLISAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYCQQANHLPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
21	重链恒定区 (无 knob-hole)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (具有 LALA 突变 (L234A & L235A), 降低 IgG1 Fc 的 ADCC 效应)
22	重链(无 hole 突变)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGLIIPMFDTAGYAQKFQGRVAITVDE

		STSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAEHSSTGTDFDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK (具有 LALA 突变 (L234A & L235A), 降低 IgG1 Fc 的 ADCC 效应)
分子 2132	具有 T3A+N88R 突变, 和 IL15B'C'环区替换 抗 PD-1 抗体部分重链和轻链均同分子 2063	
23	IL-2 突变蛋 白	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAGD ASIHDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLT
5	接头	GGGGSGGGGS
6	Fc-knob	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
24	IL-2m- 接头 -Fc-knob	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAGD ASIHDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
分子 2149	具有 T3A+N88R + S130R 突变, 和 IL15B'C'环区替换 抗 PD-1 抗体部分重链和轻链均同分子 2063	
25	IL-2 突变蛋 白	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAGD ASIHDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIIRTLT

5	接头	GGGGSGGGGS
6	Fc-knob	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
26	IL-2m- 接头 -Fc-knob	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAGD ASIHDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIIRTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
分子 2213 具有 T3A+F42A+N88R + S127E 突变, 和 B'C' 环区截短 抗 PD-1 抗体部分重链和轻链均同分子 2063		
27	IL-2 突变蛋 白	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQEIISTLT
5	接头	GGGGSGGGGS
6	Fc-knob	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
28	IL-2m- 接头 -Fc-knob	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQEIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

分子 2214	具有 T3A+F42A+N88R + S127E 突变, 和 IL15B'C'环区替换 抗 PD-1 抗体部分重链和轻链均同分子 2063	
29	IL-2 突变蛋白	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAGD ASIHDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQEIISTLT
5	接头	GGGGSGGGGS
6	Fc-knob	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
30	IL-2m- 接头 -Fc-knob	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAGD ASIHDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQEIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
分子 2219	具有 T3A+K35E+N88R + S127E 突变, 和 B'C'环区截短 抗 PD-1 抗体部分重链和轻链均同分子 2063	
31	IL-2 突变蛋白	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPELTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQEIISTLT
5	接头	GGGGSGGGGS
6	Fc-knob	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
32	IL-2m- 接头 -Fc-knob	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPELTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQEIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

		VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
分子 2124	图 1B Format 2 第一单体为: IL-2 蛋白-接头-Fc(Knob) 第二单体为: 铰链区-Fc(hole)	
4	IL-2 蛋白	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAGD ASIHDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLT
5	接头	GGGGSGGGGS
6	Fc-Knob	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLS PGK
7	IL-2m- 接头 -Fc-knob	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAGD ASIHDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
35	铰链区	EPKAS
12	Fc-hole	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLS PGK
36	铰 链 区 -Fc-hole	EPKASDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS

		FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
分子 3010	图 1B Format 2 第一单体为: IL-2 蛋白-接头-Fc(Knob) 第二单体为: Hinge-Fc(hole)	
3	IL-2 蛋白	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT
5	接头	GGGGSGGGGS
6	Fc-Knob	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
37	IL-2 蛋白-接 头-Fc-knob	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
35	铰链区	EPKAS
12	Fc-hole	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV S KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
36	Hing-Fc-hole	EPKASDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

其它序列		
37	IL-2R β -Fc-Knob	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGH TWEEAPLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTGLNDIFEAQKIEWHEDKTHTCPPEAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
38	IL-2R γ -Fc-Hole	LNTTILTPNGNEDTTADFFLTMTPTDSLVSSTLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLTLYWYKNSDNDKVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHLYQTFVVQLQDPREPRRQATQMLKLQNLVIPWAPENLTLHKLSSESQLELNWNNRFLNHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSVDYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFNPLCGSAQHWSEWSHPIHWGSNTSKENGLNDIFEAQKIEWHEHHHHHHHDKTHTCPPEAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKLSLSLSPGK
39	IL-15B'C'环区	AGDASIH
40	IL-2 的 B'C'环区	AQSKNFHLRPR
41	截短的 IL-2B'C'环区	AQSKNFH 把后面 4 位氨基酸 (LRPR) 删除
42	Fc (无 Knob-hole 突变, 有 LALA 突变)	DKTHTCPPEAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
43	Fc(无 Knob-hole 突	DKTHTCPPEAPELLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ

	变, 无 LALA 突变)	YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
分子 2061	本研究的对照分子, 来源于 US20180326010A1	
33	重链 knob	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFSSYTMSWV RQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTKKTQLQLEHLLLD LQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT
45	重链 hole	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFSSYTMSWV RQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
34	轻链 LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIH WYQQKPGQSPKLLIYRSSTLES GVPDRFSGSGSGTDF LTISSLQAEDVAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIKRTV AAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

权利要求

1.一种免疫缀合物,其包含(i)结合PD-1的抗体和(ii)IL-2突变蛋白,所述突变蛋白,与野生型IL-2(优选人IL-2,更优选包含SEQ ID NO: 3序列的IL-2)相比,包含突变:

(i) 在IL-2与IL-2R α 结合界面上,尤其是在位置35和/或42上,具有消除或降低对IL-2R α 受体的结合亲合力的突变;

和/或

(ii) 在IL-2与IL-2R $\beta\gamma$ 结合界面上,尤其是在选自位置88、127和/或130的至少一个位置上,具有弱化对IL-2R $\beta\gamma$ 受体的结合的突变;

以及

(iii) 缩短的B'C'环区(即,连接氨基酸残基aa72和aa84的序列),优选地,所述缩短的环区具有小于10,9,8,7,6,或5个的氨基酸长度,且优选7个氨基酸长度;优选地,所述缩短的B'C'环区导致改善的蛋白表达量和/或纯度,其中氨基酸位置根据SEQ ID NO: 3编号。

2.根据权利要求1的免疫缀合物,其中所述突变蛋白,相对于野生型IL-2,包含:

(i) N88R + S130R;

N88D;

N88R;

F42A+N88R + S127E; 或

K35E+N88R + S127E; 和

(ii)B'C'环区序列AGDASIH或AQSKNFH;

以及任选地(iii) T3A。

3. 根据权利要求1的免疫缀合物,其中所述IL-2突变蛋白包含SEQ ID NO: 4、23、25、27、29或31的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由其组成。

4. 根据权利要求1-3中任一项的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物包含:

第一单体,其包含与Fc片段融合的IL-2突变蛋白;和

第二单体,其包含特异性结合PD-1的抗体或其片段,优选地,所述片段包含所述抗PD-1抗体的一条重链和一条轻链。

5. 根据权利要求4的免疫缀合物,其中第一单体的Fc片段中包含Knob突变,第二单体的抗体重链中包含hole突变,或者第一单体的Fc片段中包含hole突变,第二单体的抗体重链中包含knob突变。

6. 根据权利要求4或5的免疫缀合物,其中所述第一单体中的Fc片段是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc片段,优选地包含SEQ ID NO:6、42或43的氨基酸序列或由其组成。

7. 根据权利要求4-6中任一项的免疫缀合物,其中所述与Fc片段融合的IL-2突变蛋白包含SEQ ID NO: 7、24、26、28、30或32的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由其组成。

8. 根据权利要求4-7中任一项的免疫缀合物,其中所述PD-1抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含重链可变区,所述重链可变区包含分别如以下氨基酸序列所示的HCDR1、HCDR2、HCDR3: SEQ ID NO:9、10和11。

9. 根据权利要求4-8中任一项的免疫缀合物,其中所述PD-1抗体或其抗原结合

片段包含轻链，所述轻链包含轻链可变区，其中所述轻链可变区包含分别如以下氨基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3: SEQ ID NO:16、17和18。

10. 根据权利要求4-9中任一项的免疫缀合物，其中所述抗PD-1抗体或其抗原结合片段包含:

包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区，和

包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区。

11. 根据权利要求4-9中任一项的免疫缀合物，其中所述抗PD-1抗体或其抗原结合片段包含

包含SEQ ID NO:14或22所示的氨基酸序列或与其具有至85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链；和

包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列或与其具有至85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链。

12. 根据权利要求1-11任一项的免疫缀合物，其中所述IL-2突变蛋白与Fc通过接头连接，或所述IL-2突变蛋白与所述抗PD-1抗体通过接头连接，优选地所述接头选自为(GGGGS)_n，其中n=1、2、3或4，例如所述接头为SEQ ID NO:5。

13. 一种分离的多核苷酸，其编码权利要求1-12中任一项的免疫缀合物中的一条或多条链，或第一单体和/或第二单体。

14. 一种表达载体，其包含权利要求13的多核苷酸。

15. 一种宿主细胞，其包含权利要求13的多核苷酸或权利要求14的载体，优选所述宿主细胞是酵母细胞或哺乳动物细胞，特别是HEK293细胞或CHO细胞。

16. 一种用于生产权利要求1-12中任一项的免疫缀合物的方法，包括，在适于表达所述免疫缀合物的条件下，培养权利要求15的宿主细胞。

17. 一种药物组合物，其包含权利要求1-12中任一项的免疫缀合物，任选地和药用辅料。

18. 权利要求1-12中任一项的免疫缀合物或权利要求17的药物组合物在制备用于预防和/或治疗癌症的药物中的用途，优选地，所述癌症是实体肿瘤或血液肿瘤，例如胃肠道肿瘤或黑色素瘤，例如结肠直肠癌或结肠癌；例如，所述癌症是PD-1抗体治疗耐受性癌症。

19. 权利要求18所述的用途，其中所述药物组合物还包含第二治疗剂。

20. 一种预防和/或治疗受试者癌症的方法，所述方法包括，向所述受试者施用权利要求1-12中任一项的免疫缀合物或权利要求17的药物组合物，优选地，所述癌症是实体肿瘤或血液肿瘤，例如胃肠道肿瘤或黑色素瘤，例如结肠直肠癌或结肠癌；例如，所述癌症是PD-1抗体治疗耐受性癌症。

21. 根据权利要求20中任一项所述的方法，其中所述突变蛋白、所述融合蛋白或所述药物组合物与第二治疗剂以组合疗法施用。

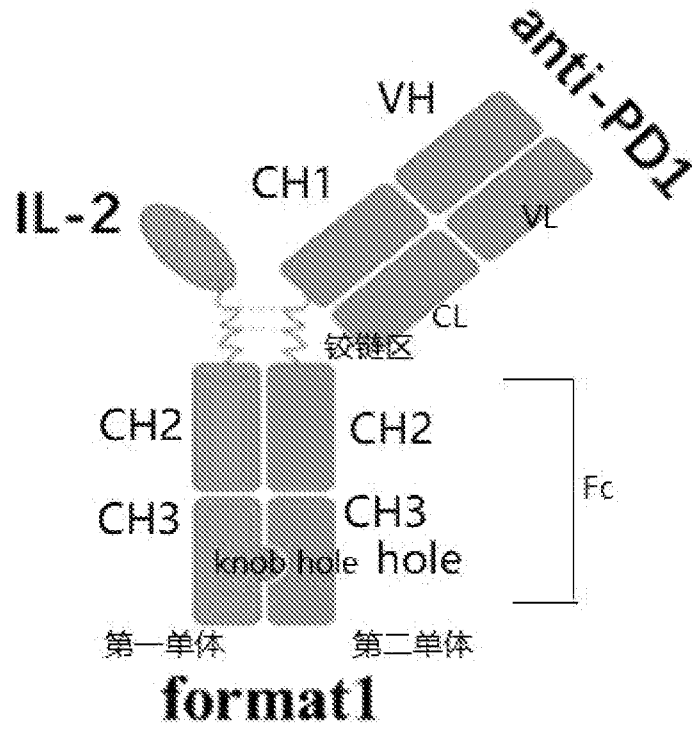


图 1A

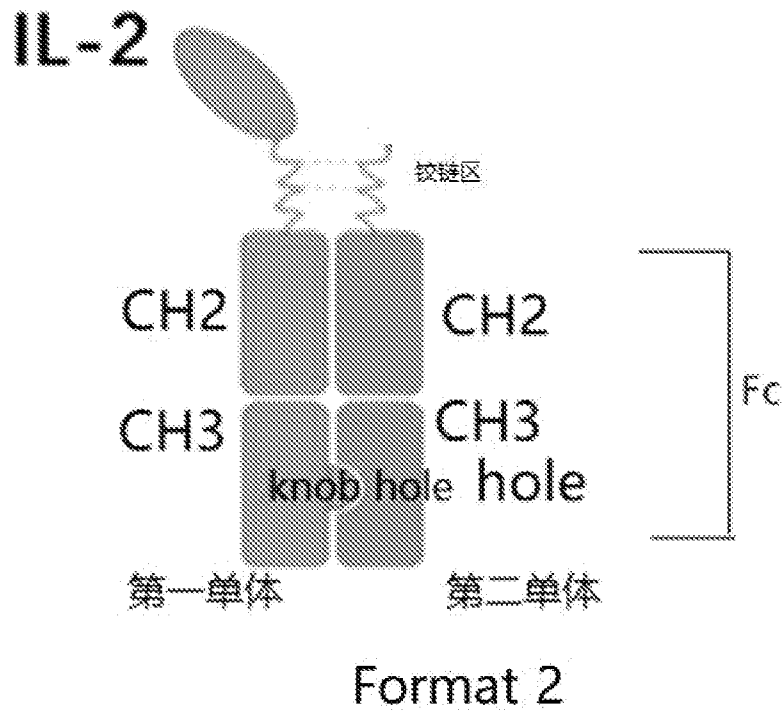


图 1B

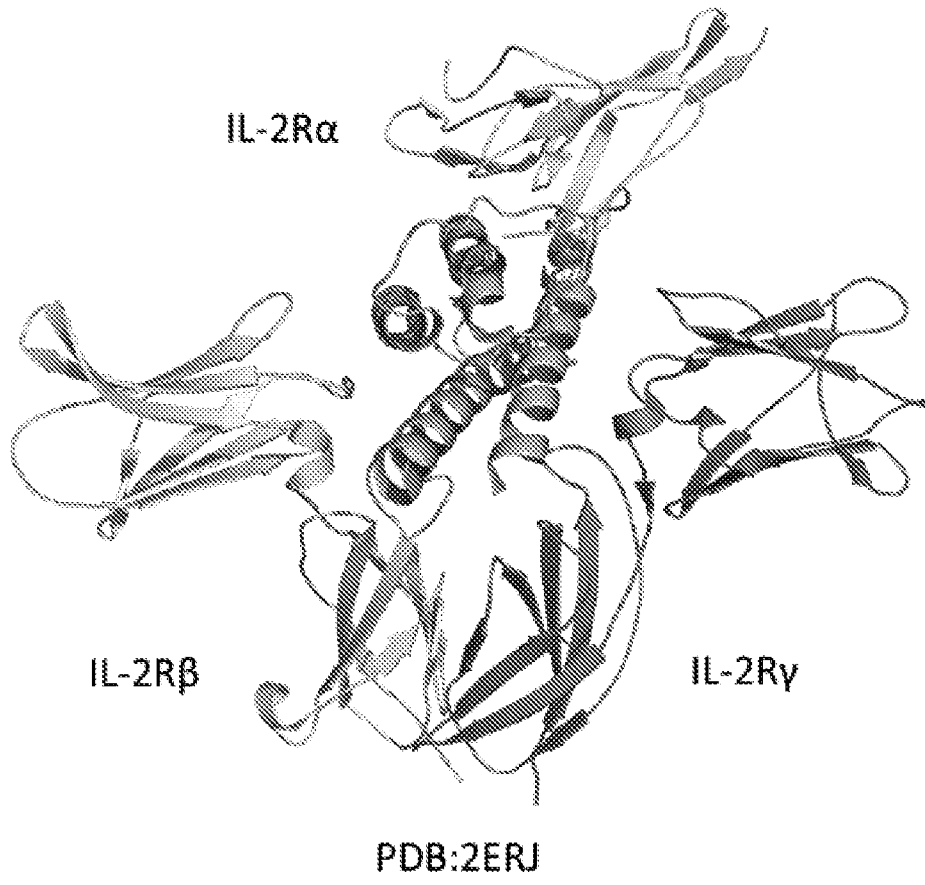


图 2

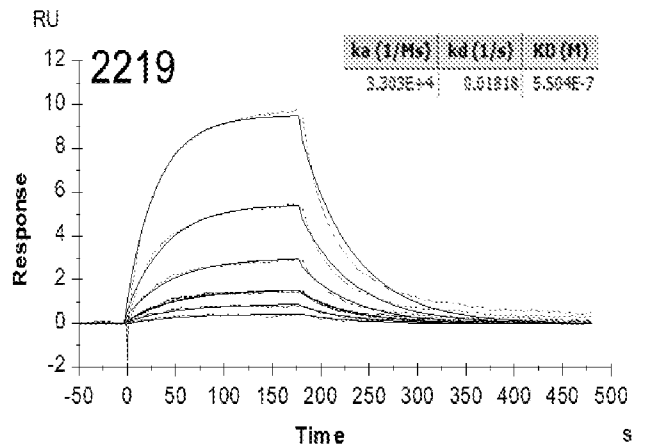
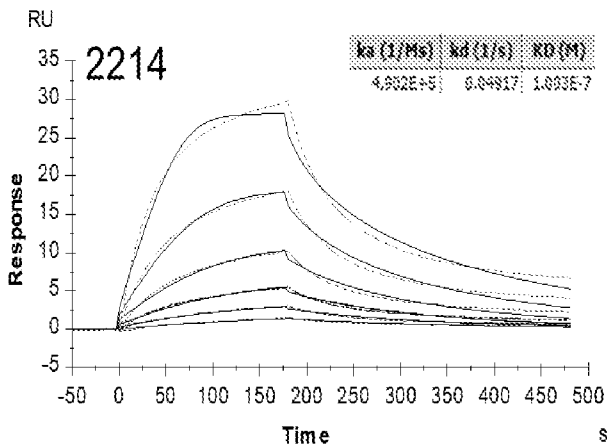
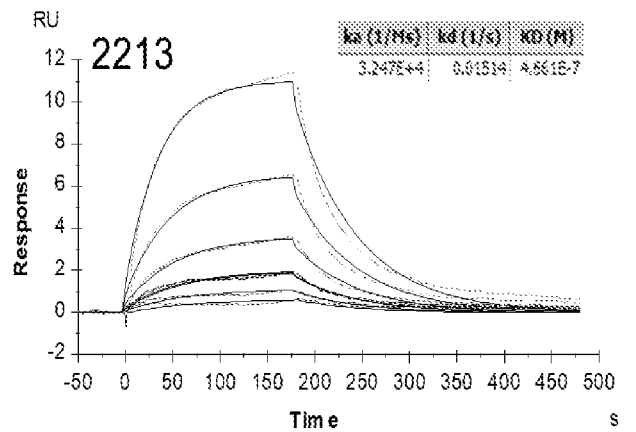
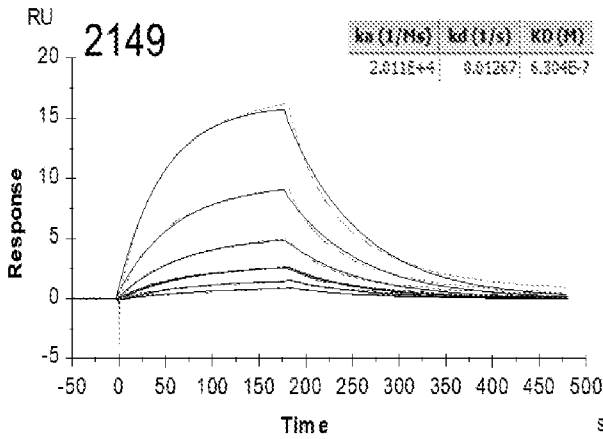
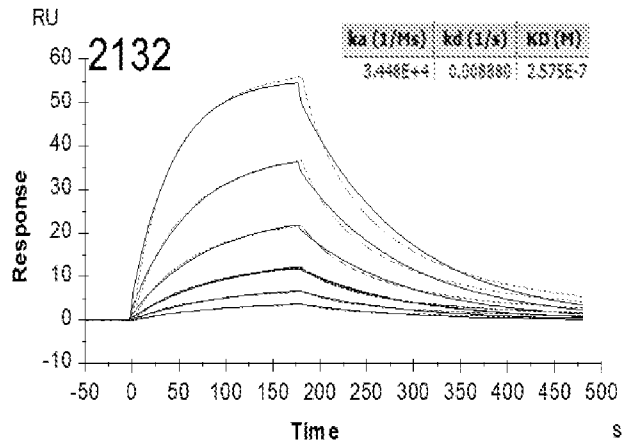
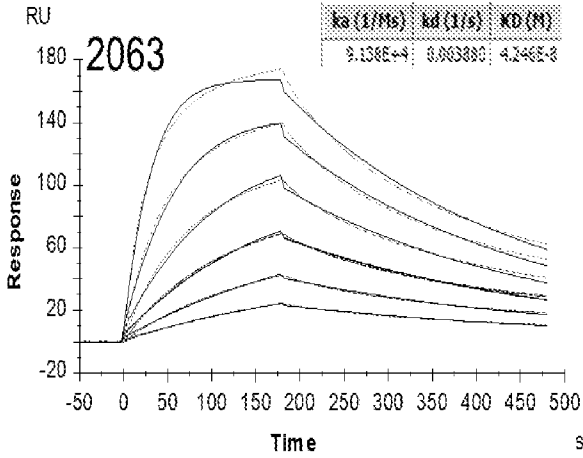
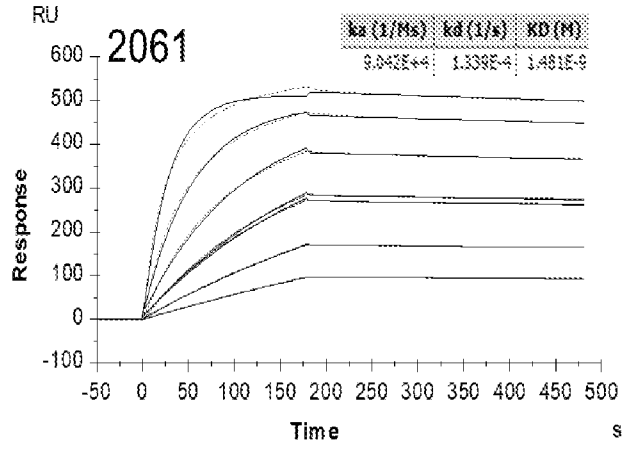
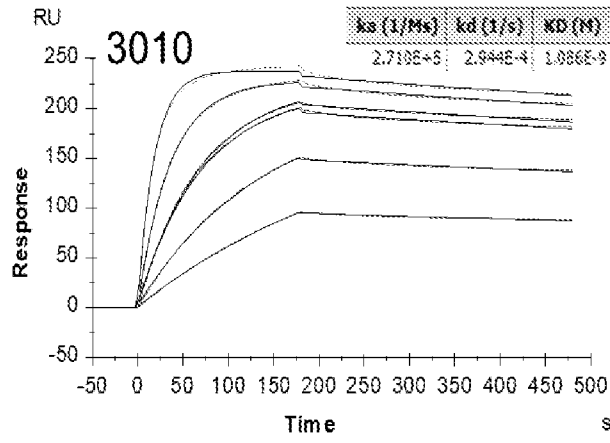


图 3

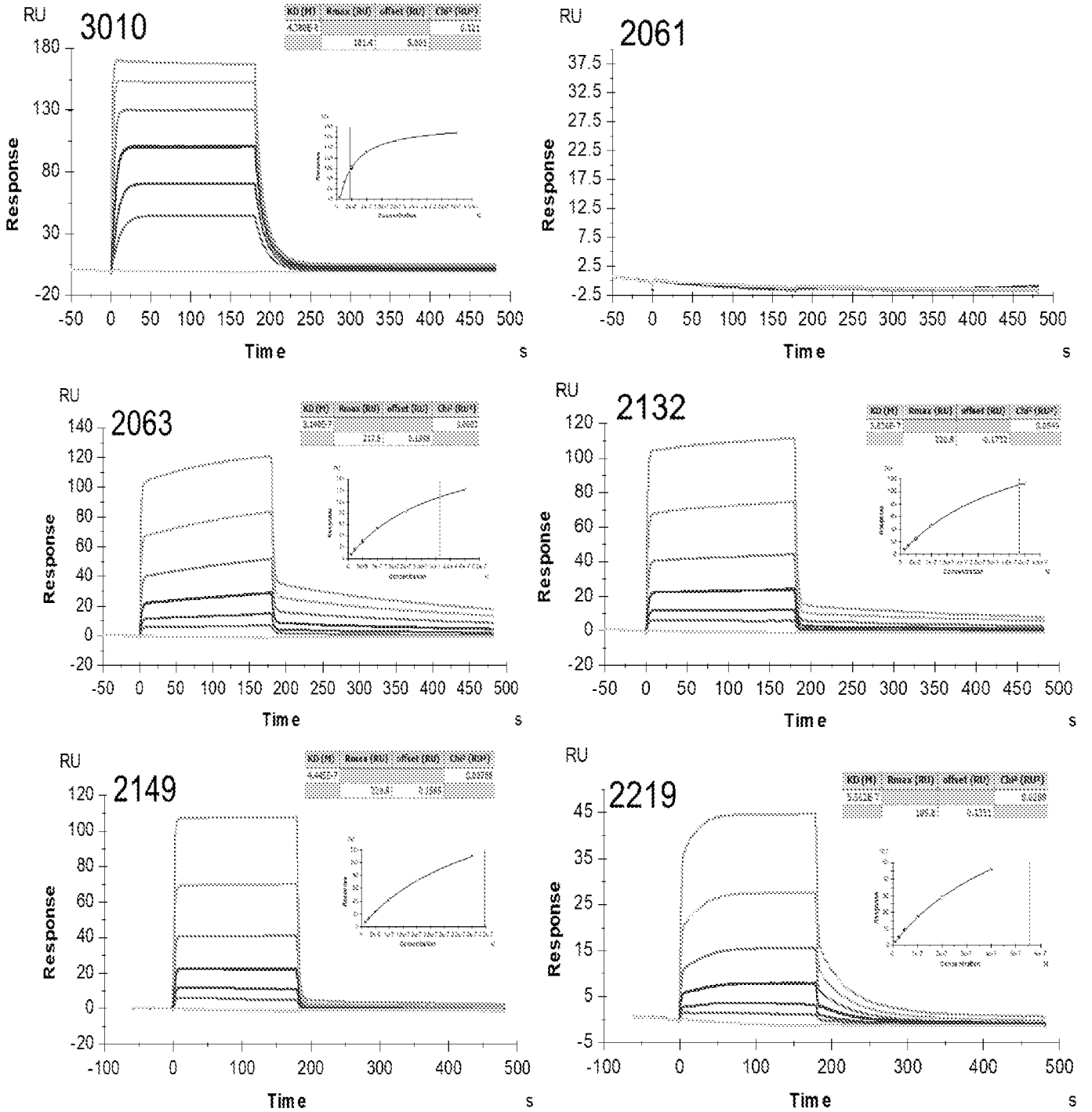


图 4

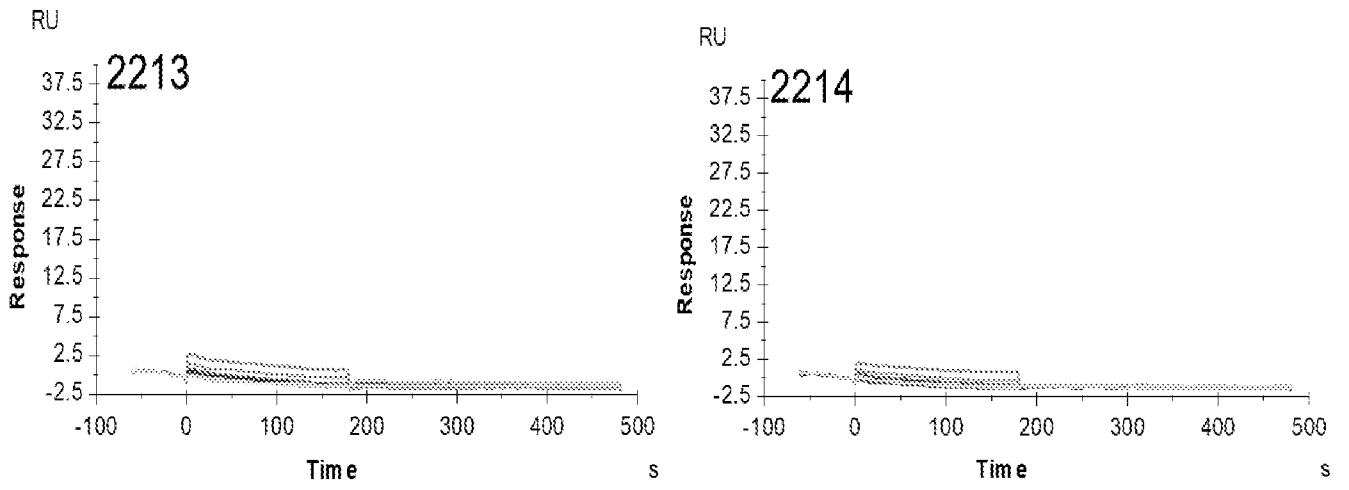


图 4 (续)

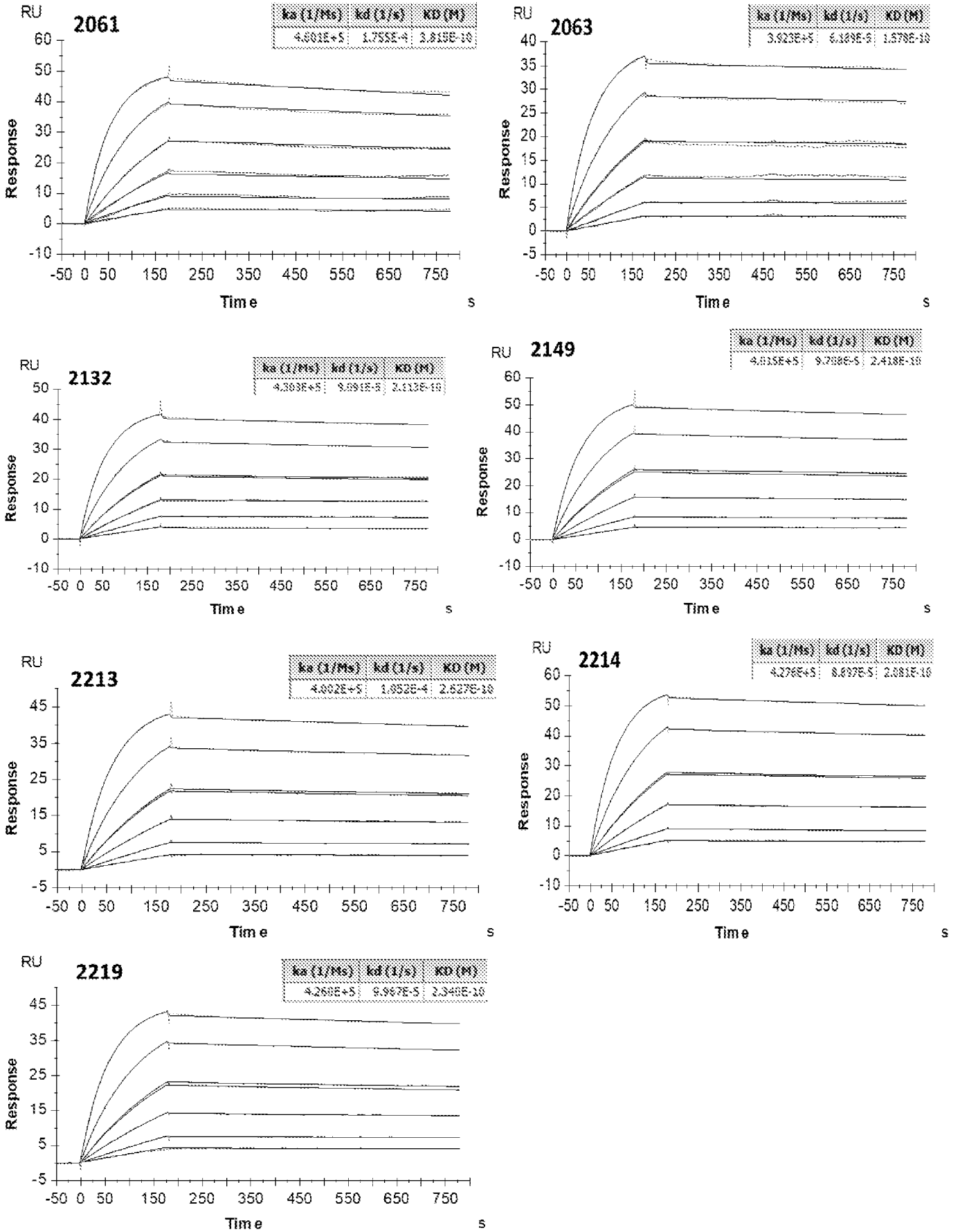


图 5

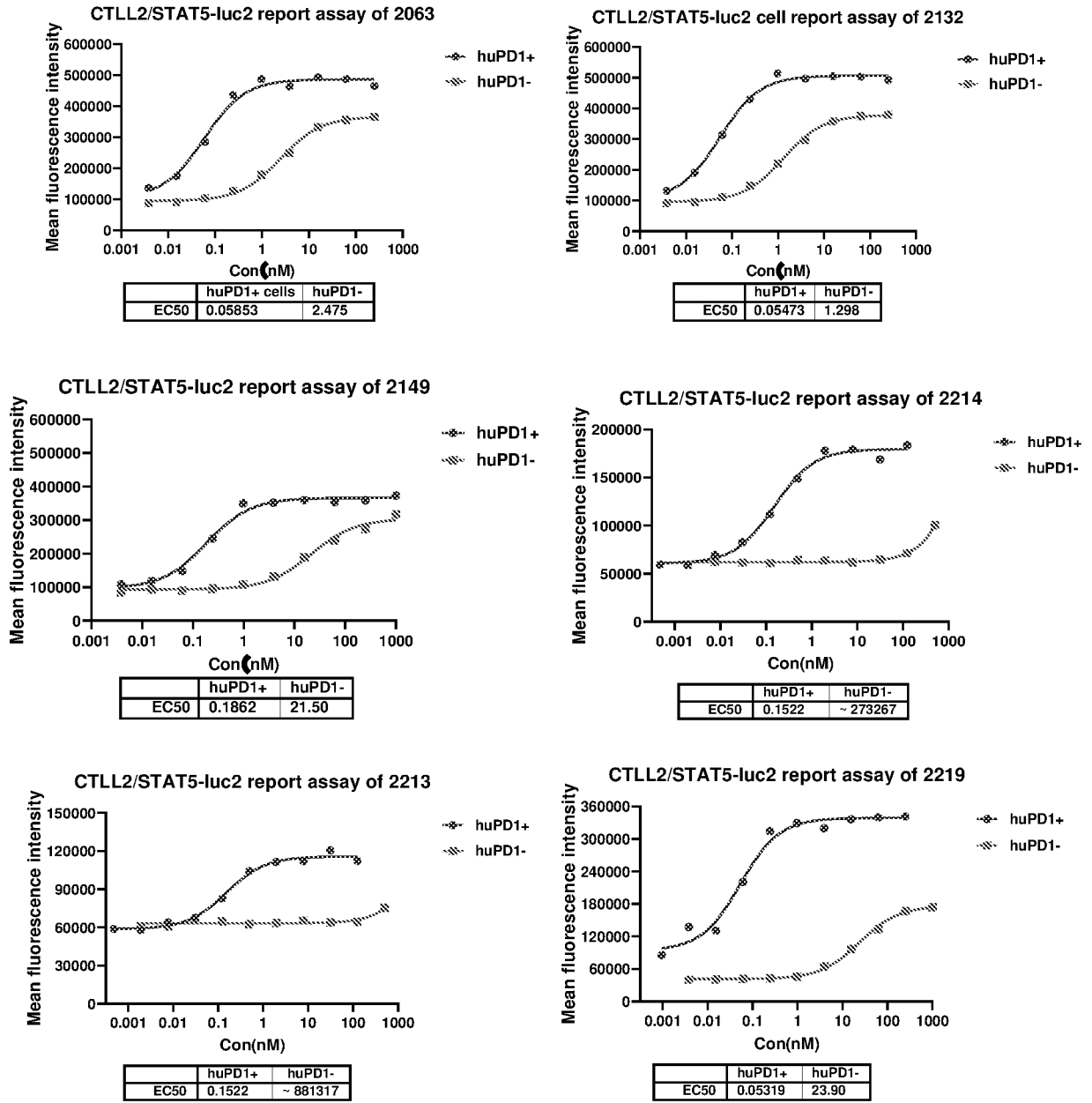


图 6

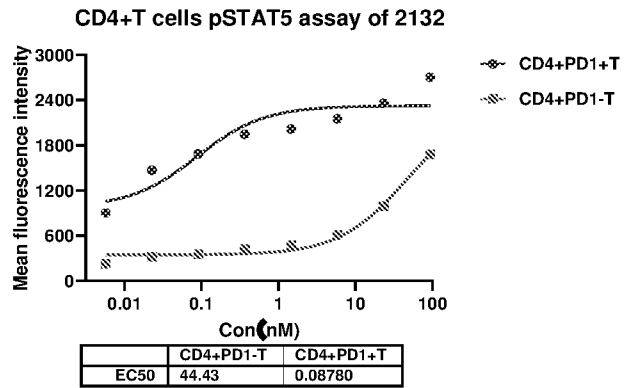
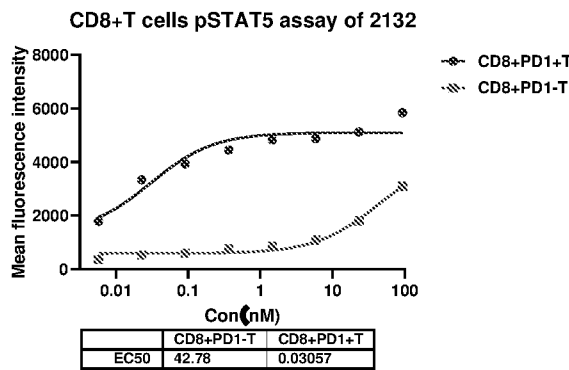
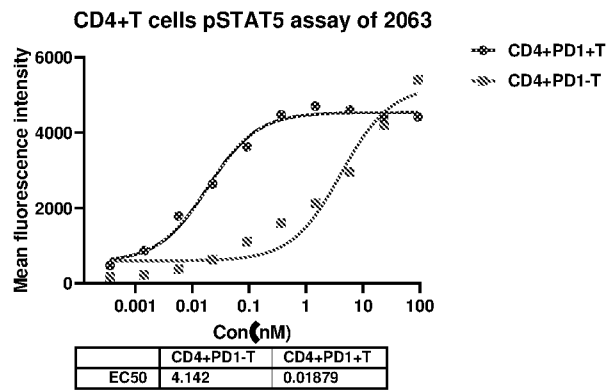
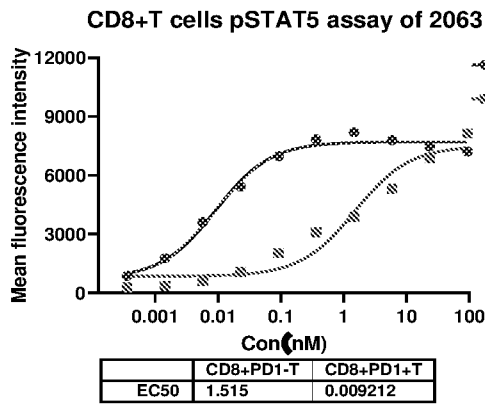
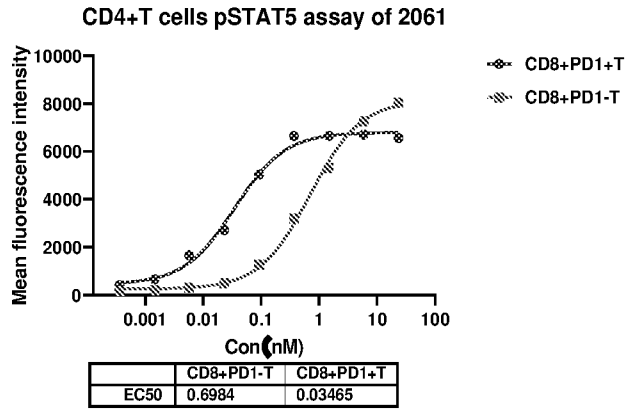
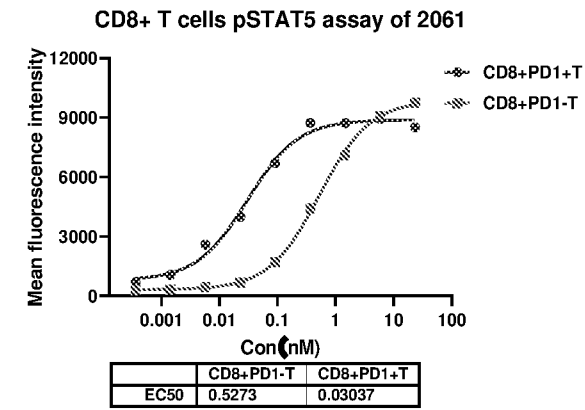


图 7

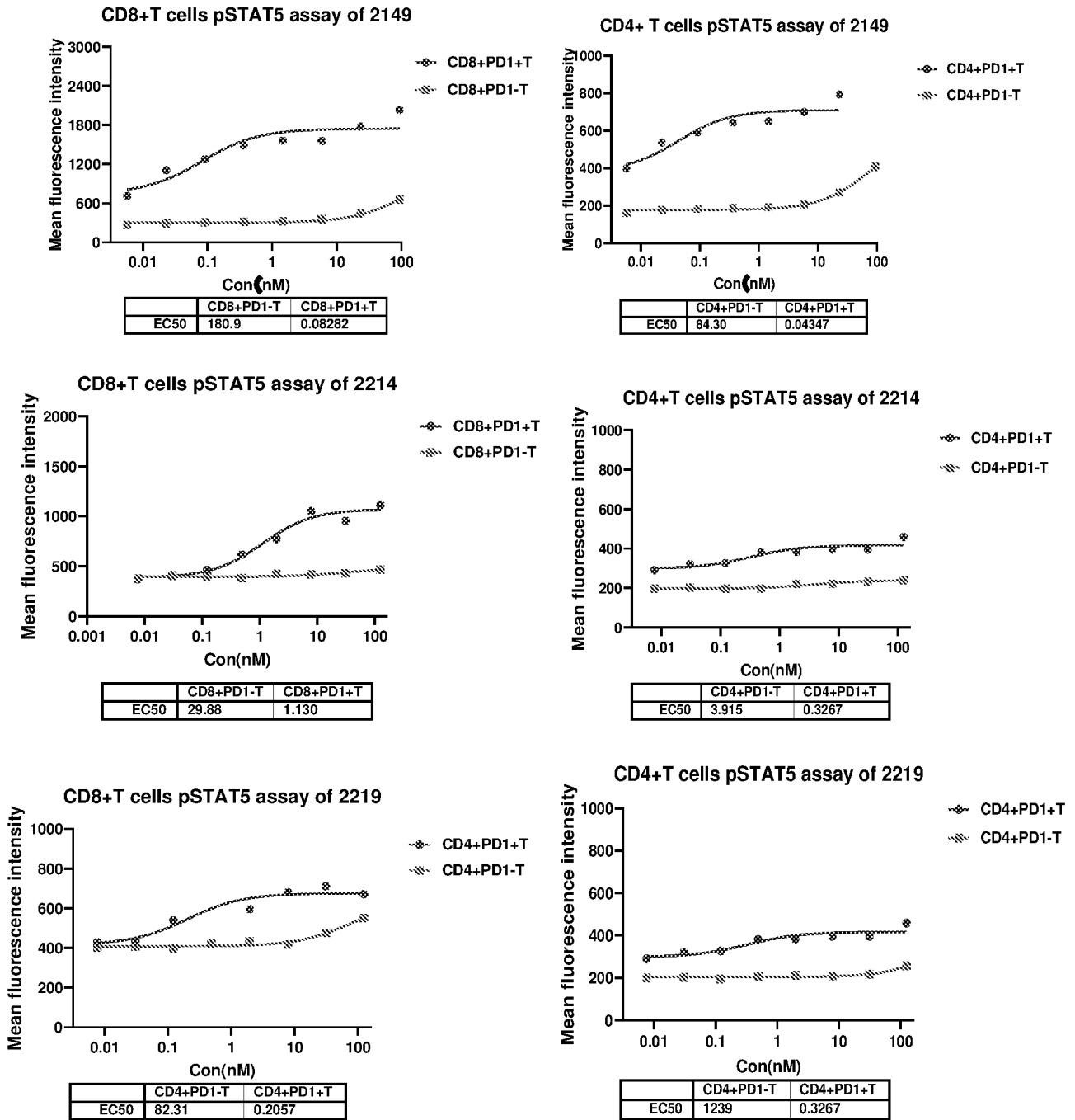
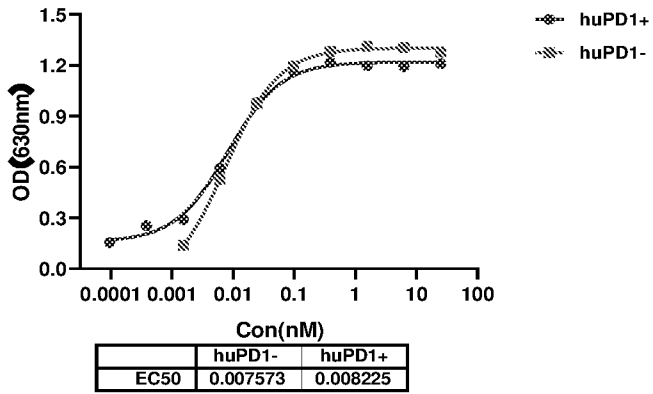
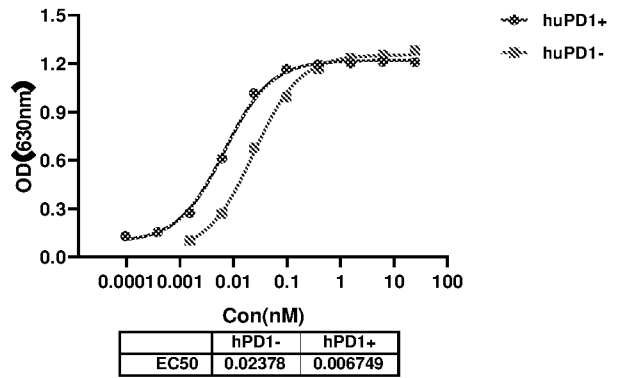


图 7 (续)

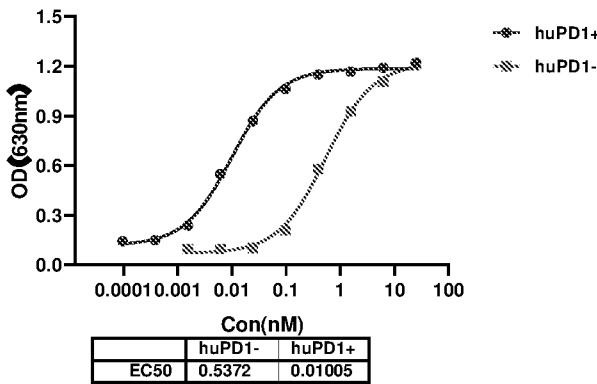
HEK-Blue™ IL-2 reporter cell assay of 2061



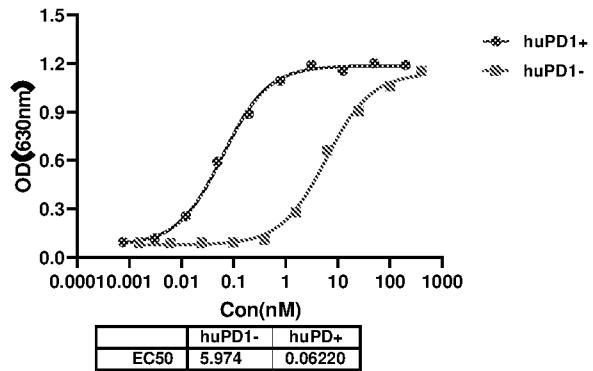
HEK-Blue™ IL-2 reporter cell assay of 2063



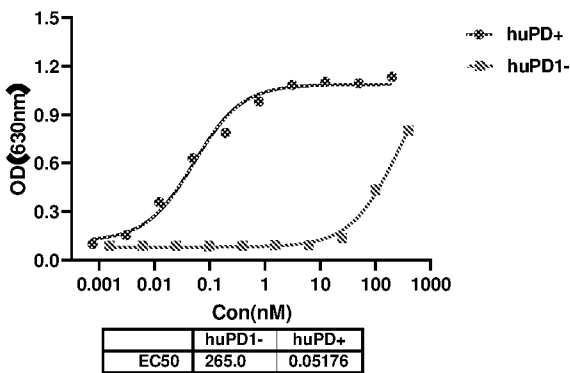
HEK-Blue™ IL-2 reporter cell assay of 2132



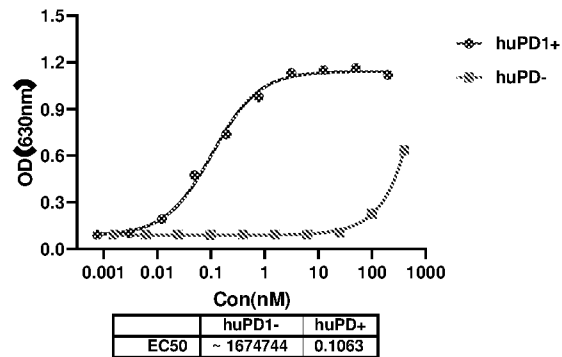
HEK-Blue™ IL-2 reporter cell assay of 2149



HEK-Blue™ IL-2 reporter cell assay of 2214



HEK-Blue™ IL-2 reporter cell assay of 2213



HEK-Blue™ IL-2 reporter cell assay of 2219

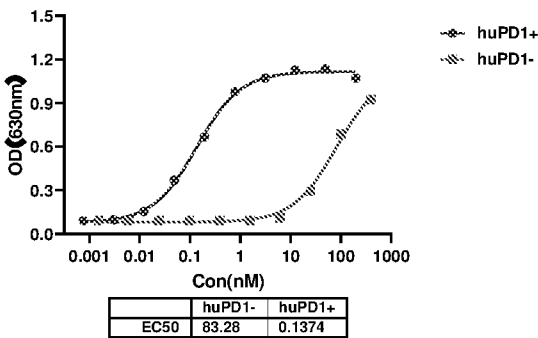


图 8.

anti-tumor efficacy of 2132 2063 in MC38 model

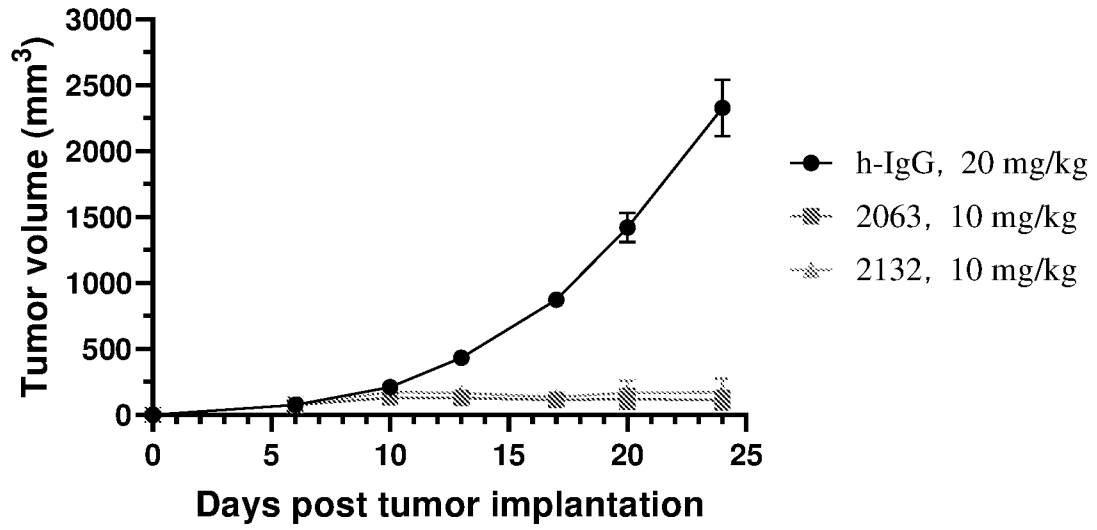


图 9A.

body weight change

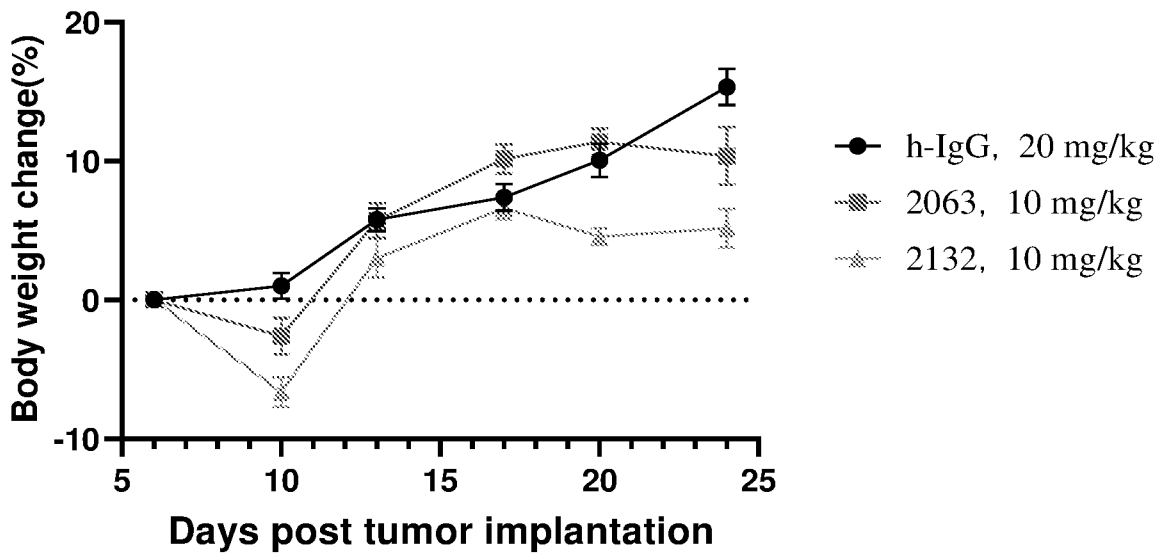


图 9B.

anti-tumor efficacy of 2063 in large established MC38 tumor

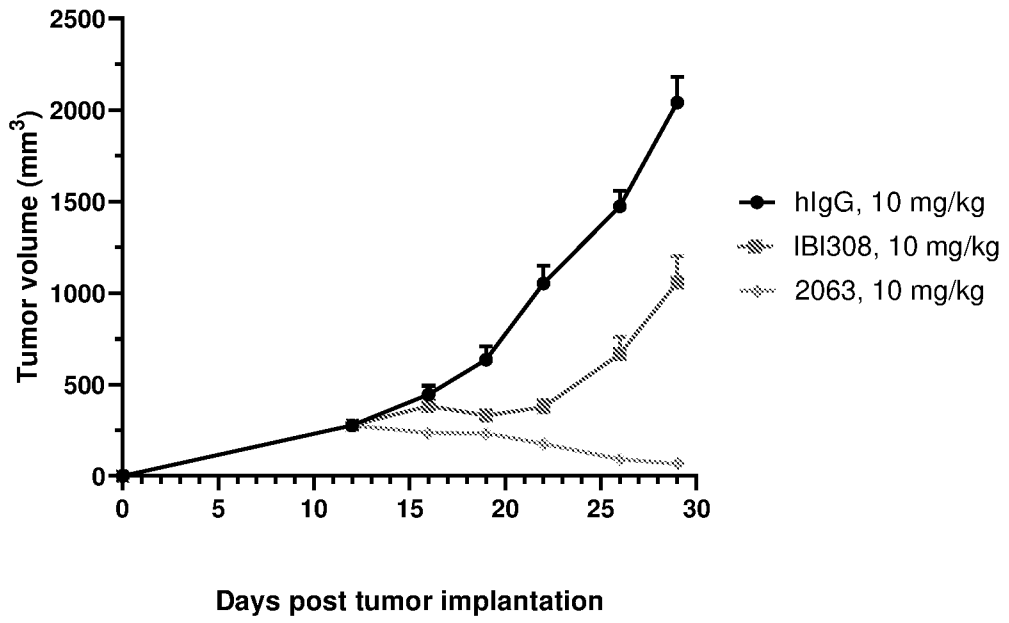


图 10A.

body weight change

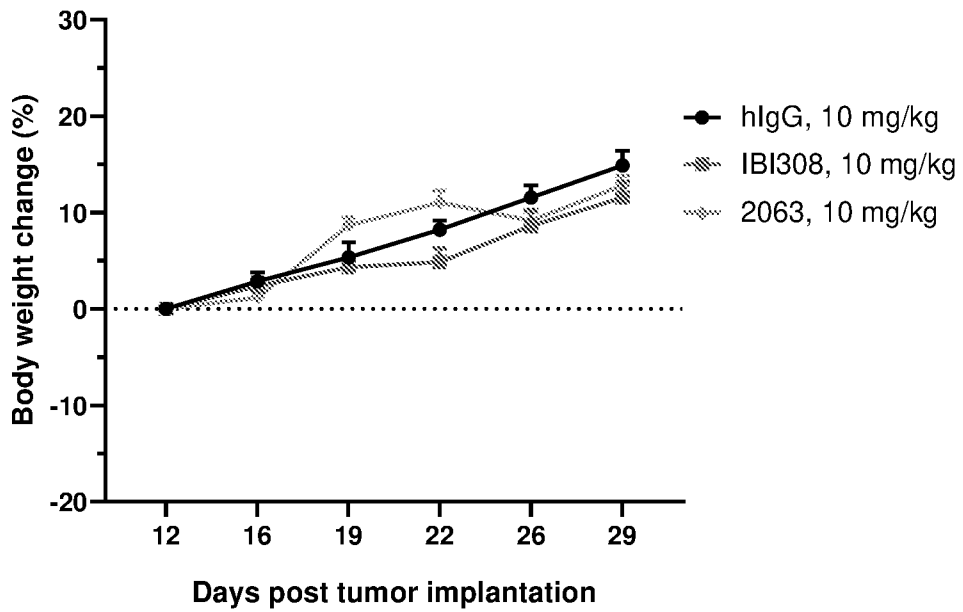


图 10B.

2063 efficacy in B16F10 model

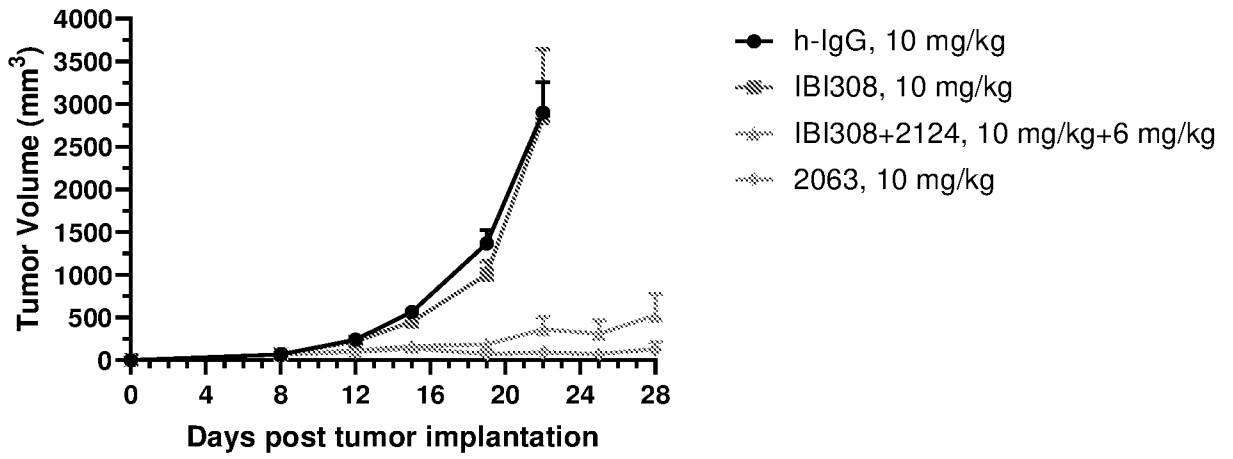


图 11A.

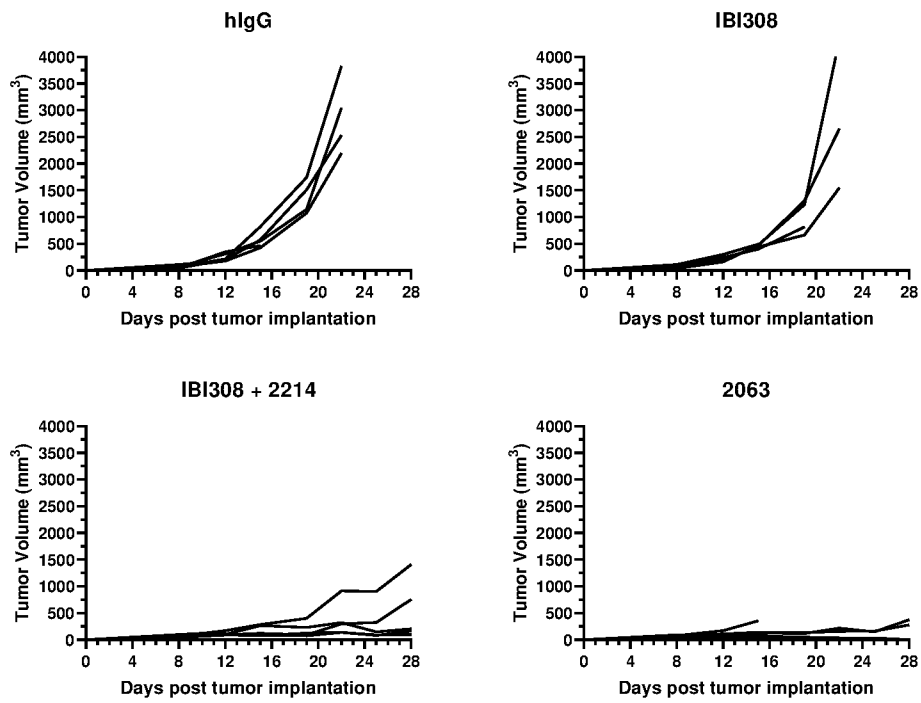


图 11B.

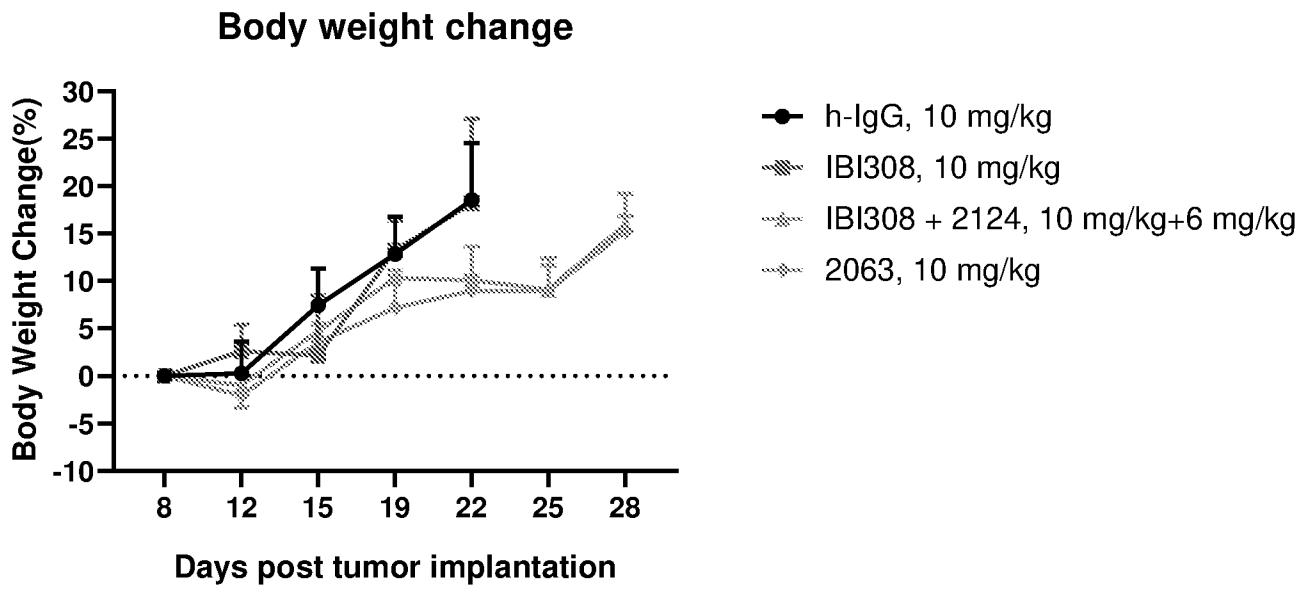


图 11C.

2149 efficacy in MC38 model

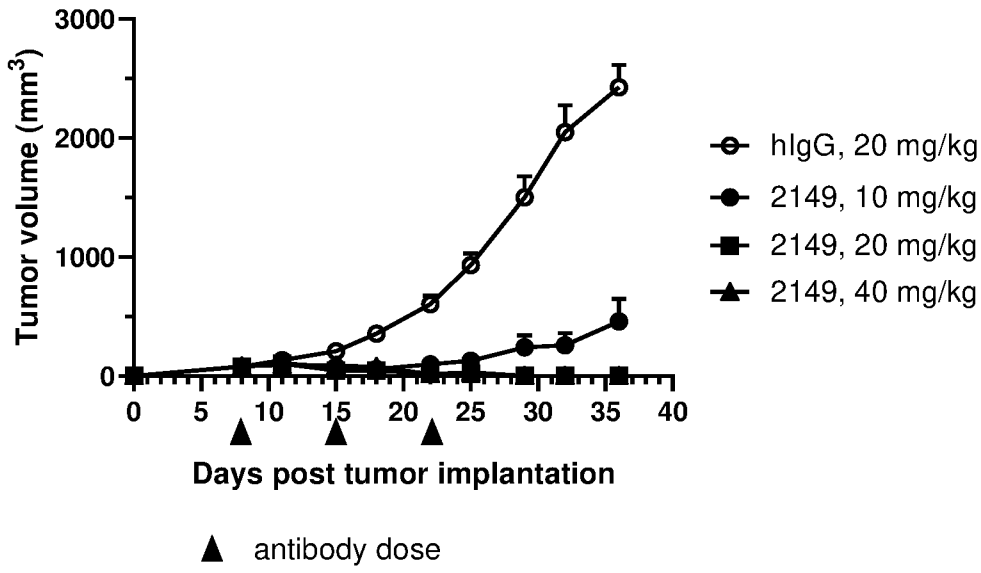


图 12A.

Survival curve

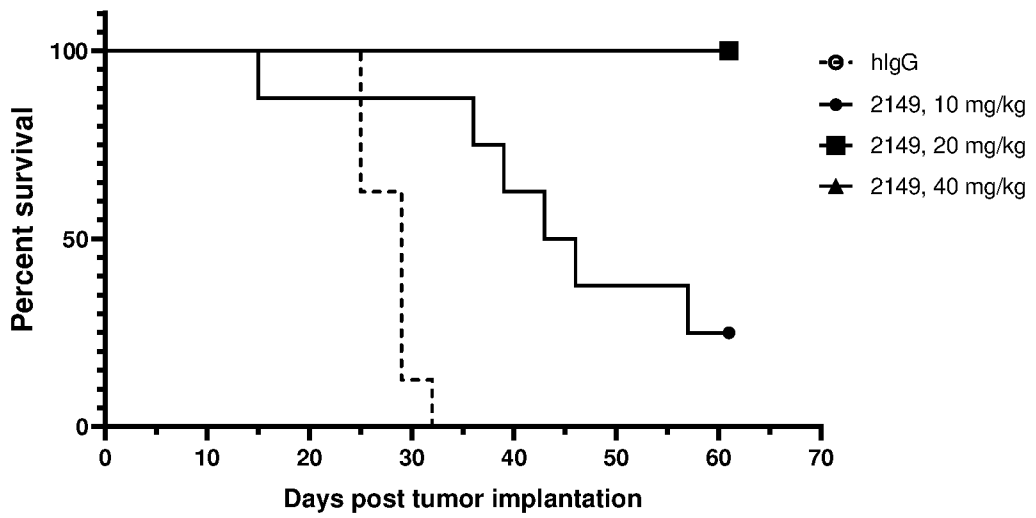


图 12B.

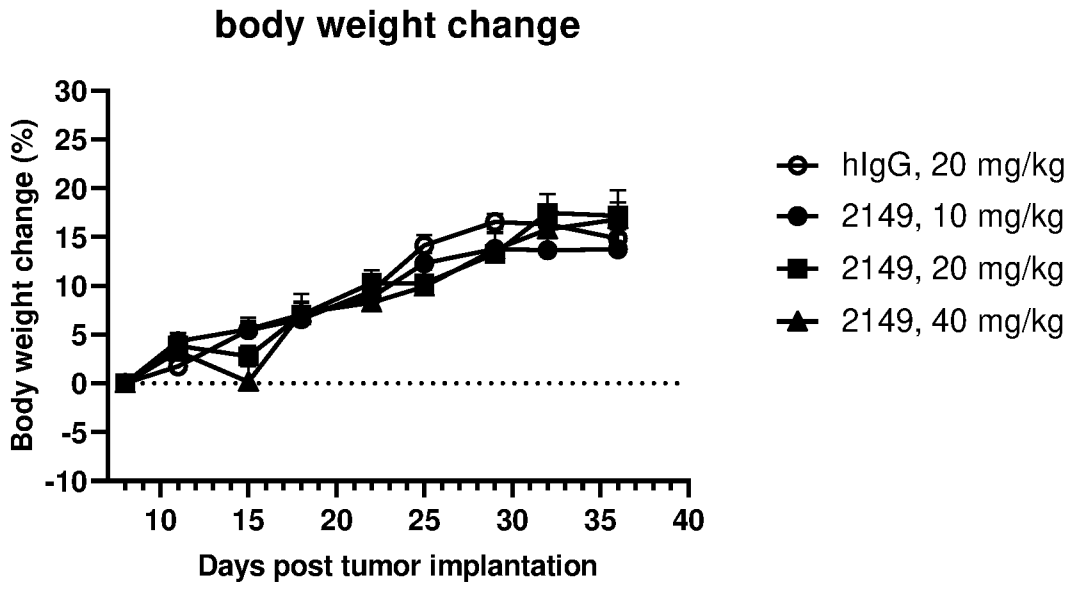


图 12C.

2149 efficacy in B16F10 model

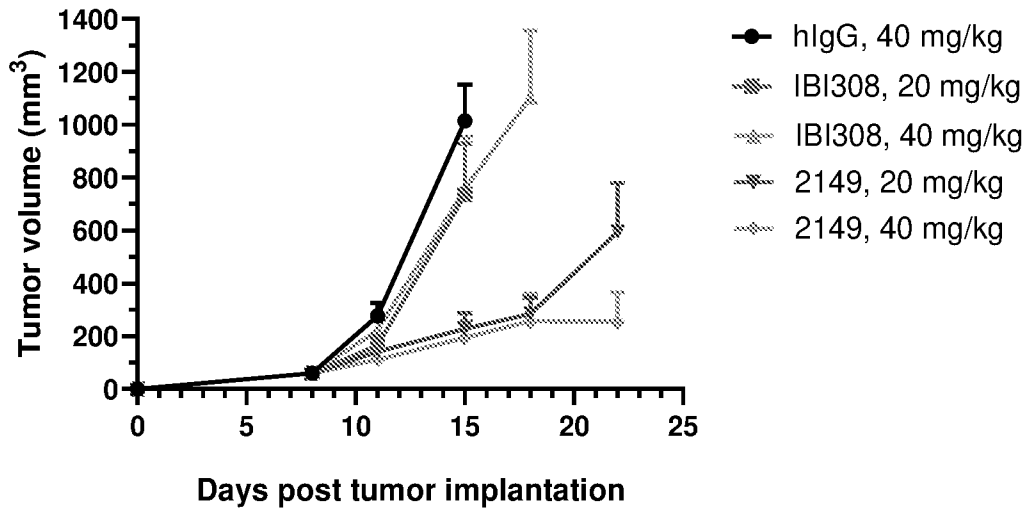


图 13A.

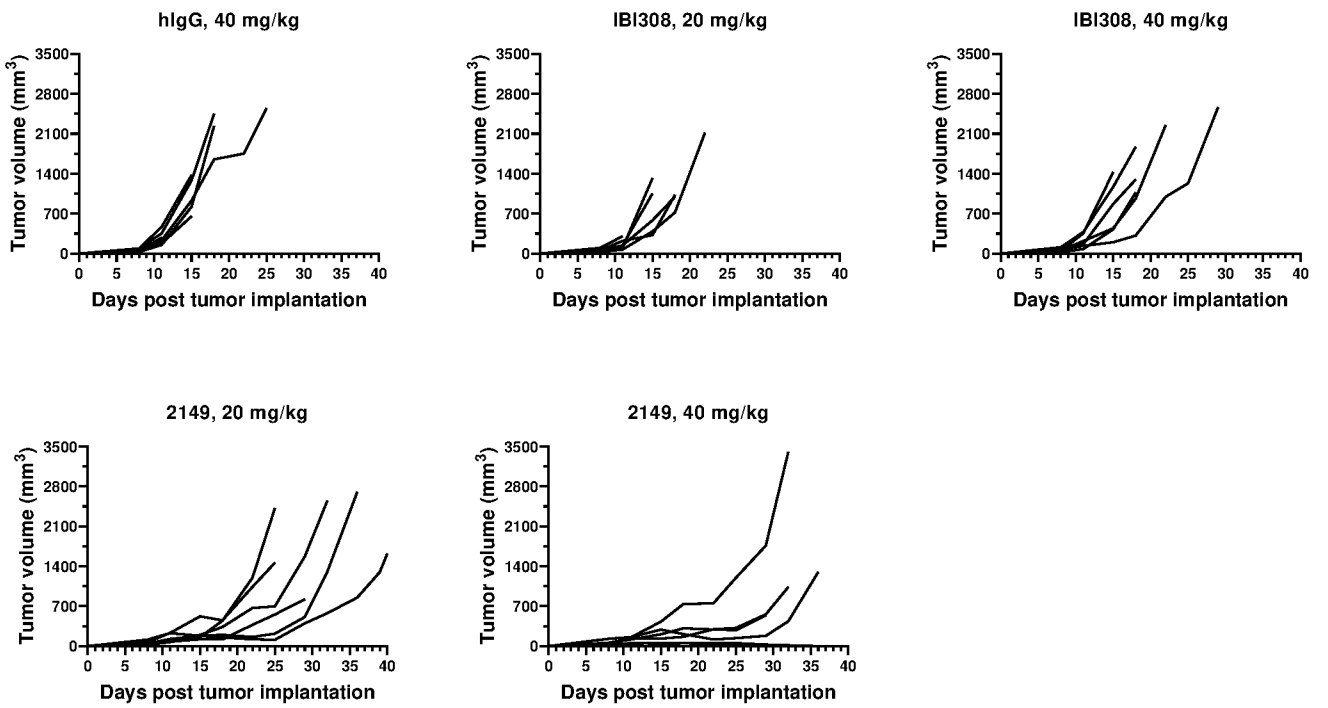


图 13B.

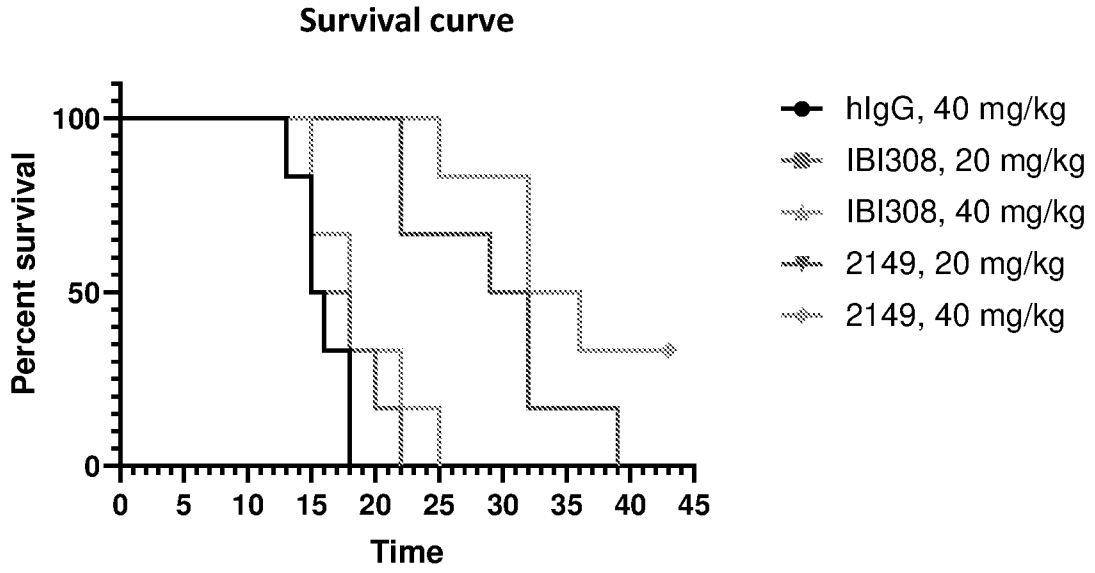


图 13C.

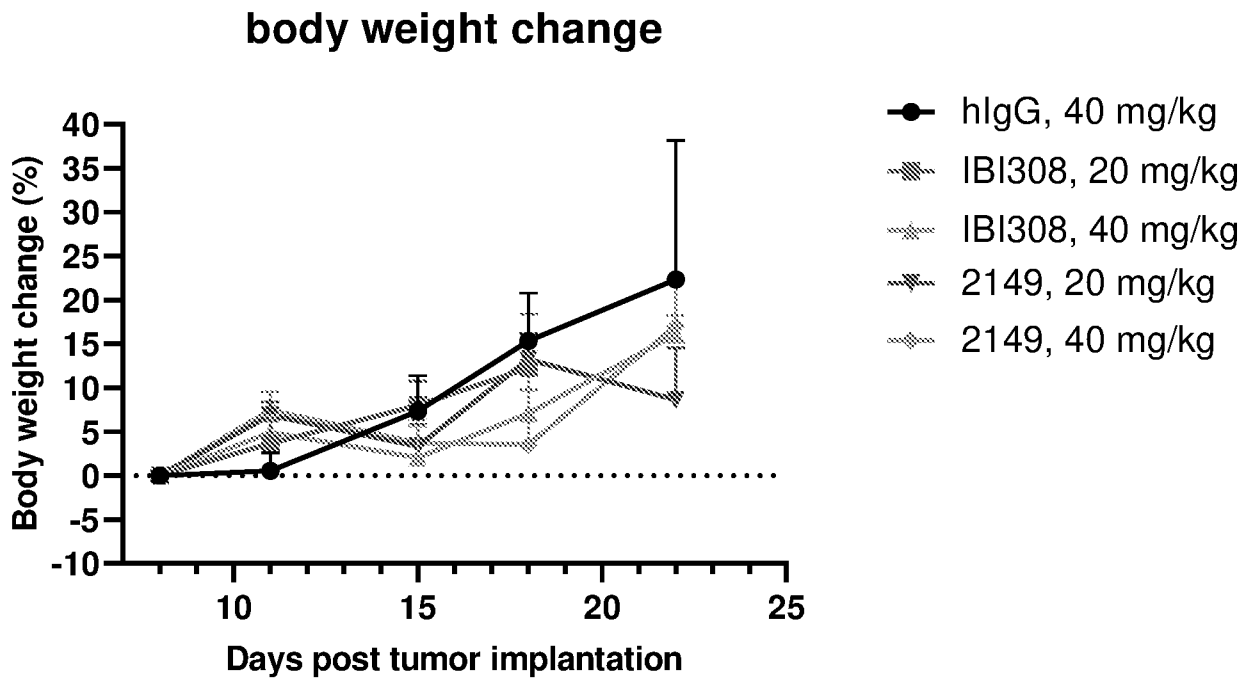


图 13D

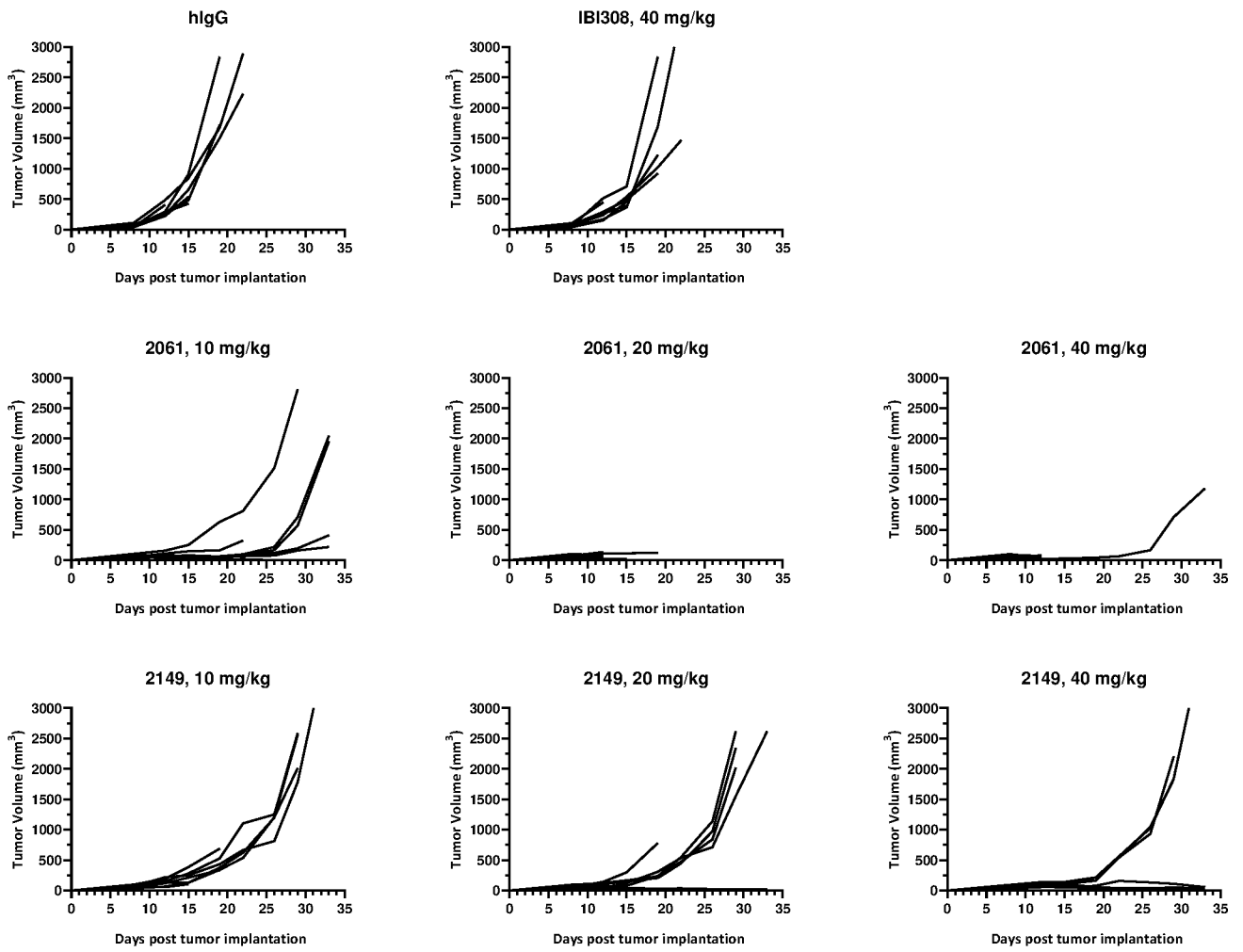


图 14A.

Survival curve

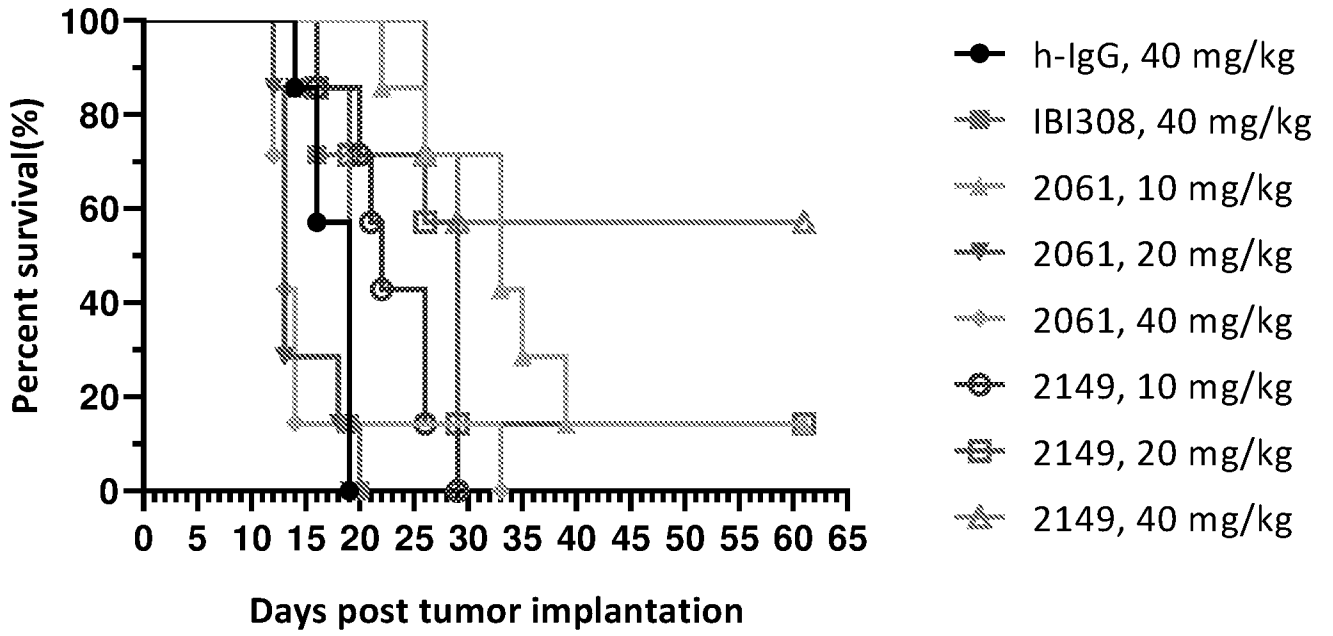


图 14B.

body weight change

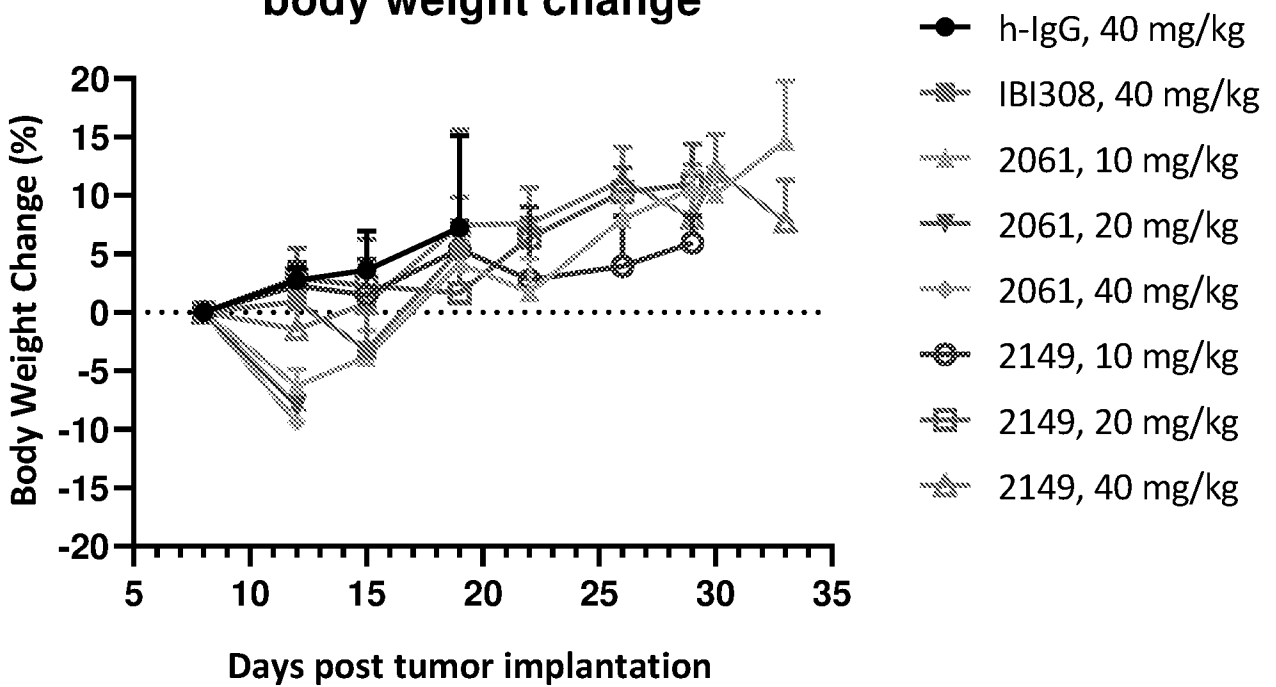


图 14C.

anti-tumor efficacy of 2214 in MC38 model

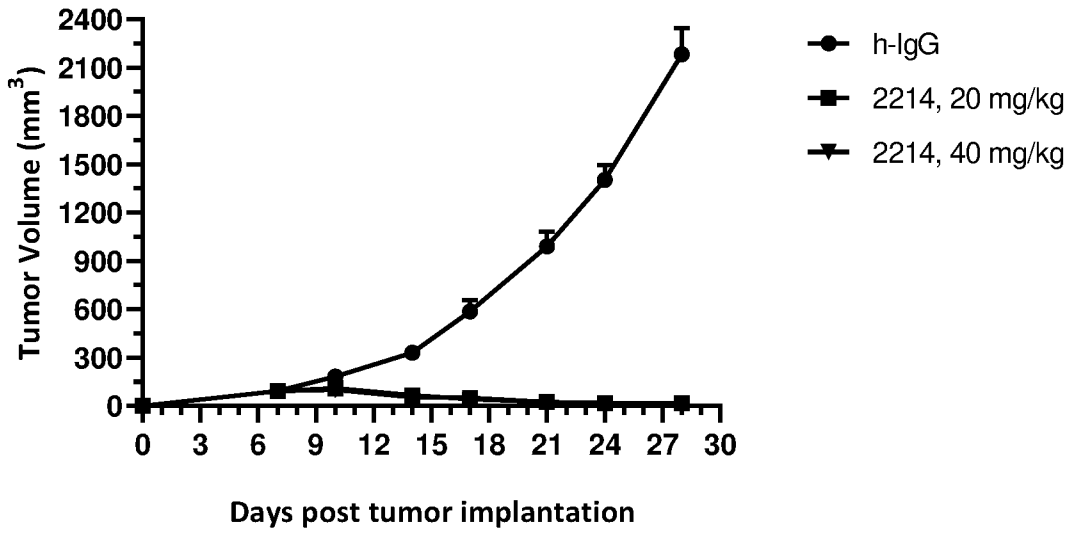


图 15A.

Survival curve

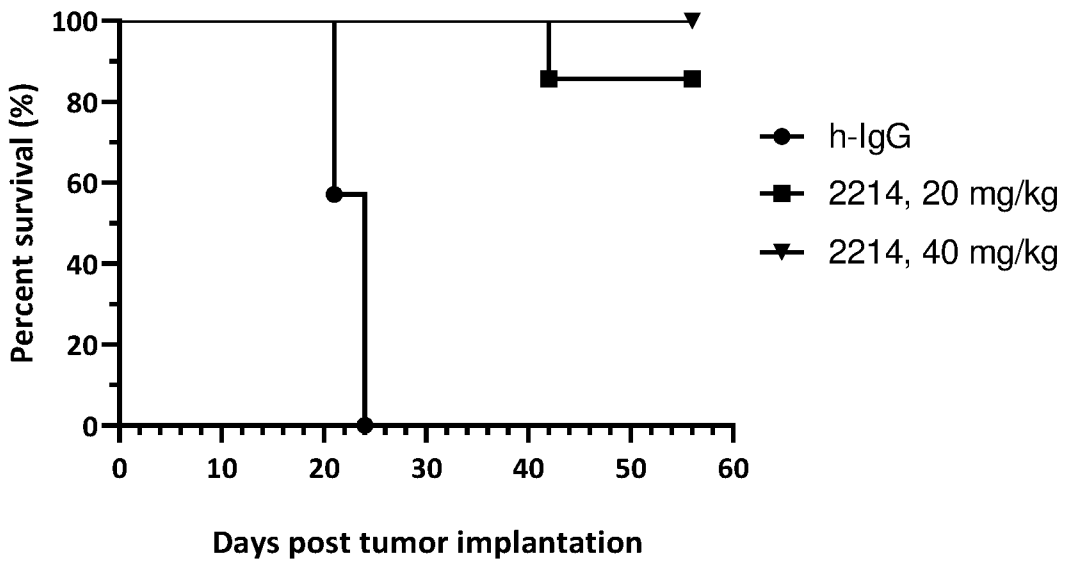


图 15B.

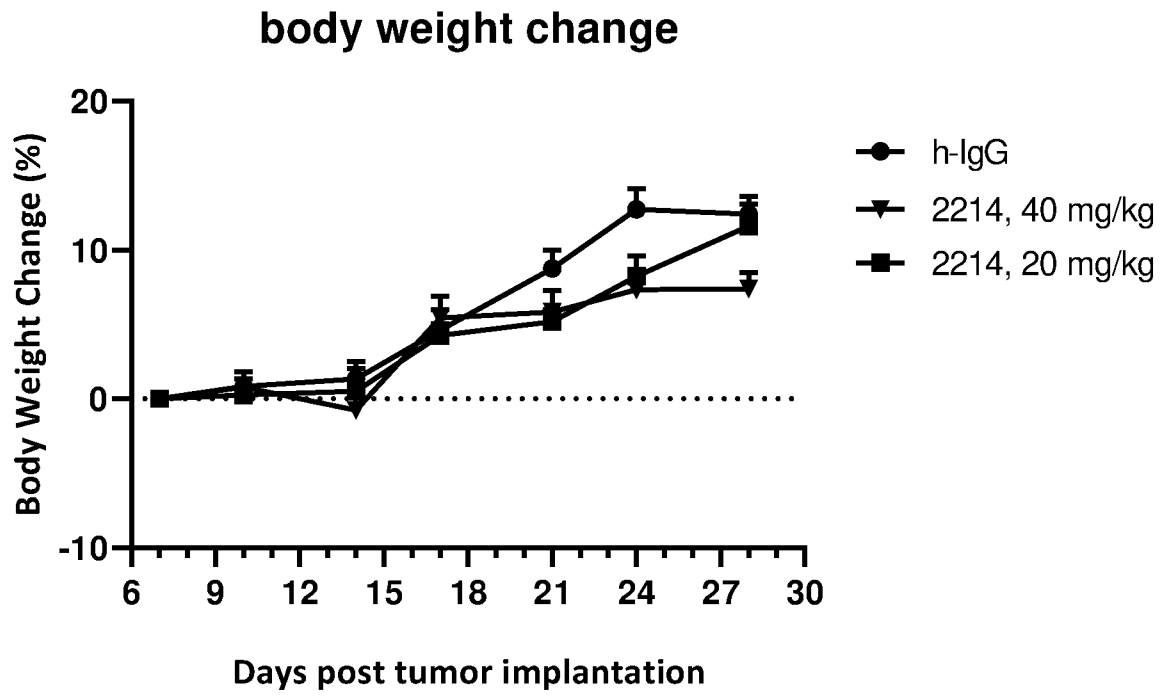


图 15C.

Survival curve

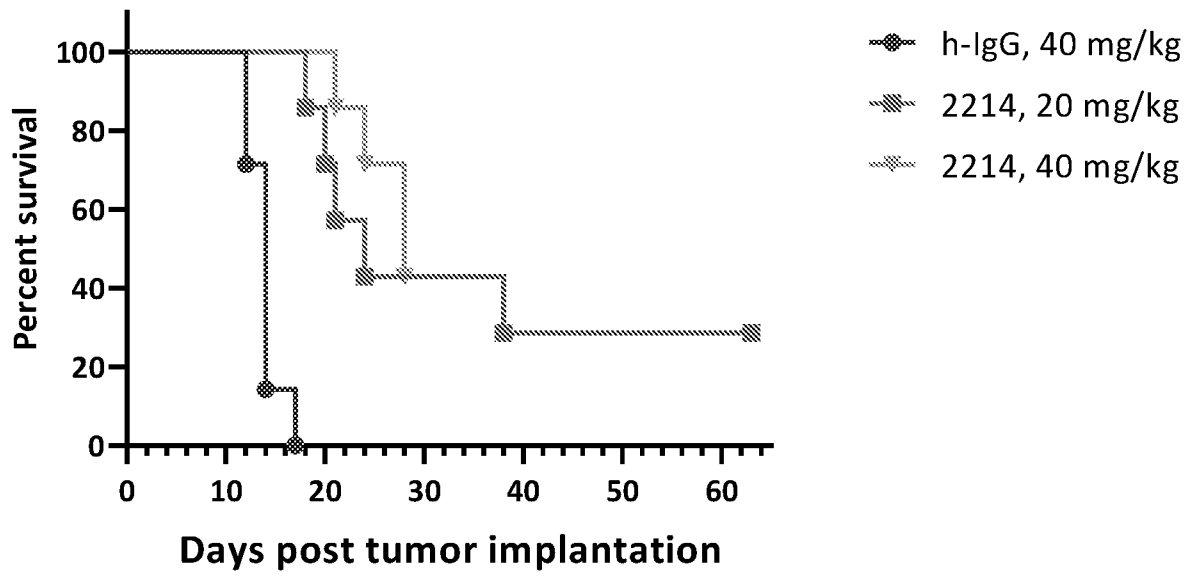


图 16A.

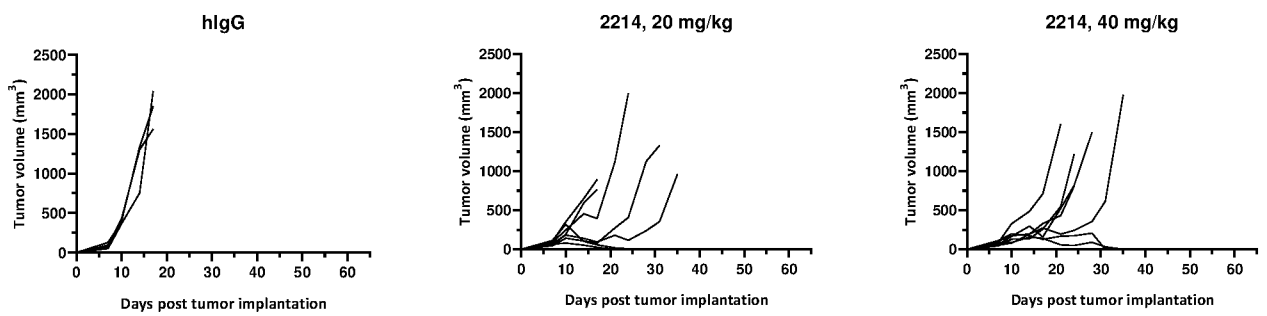


图 16B.

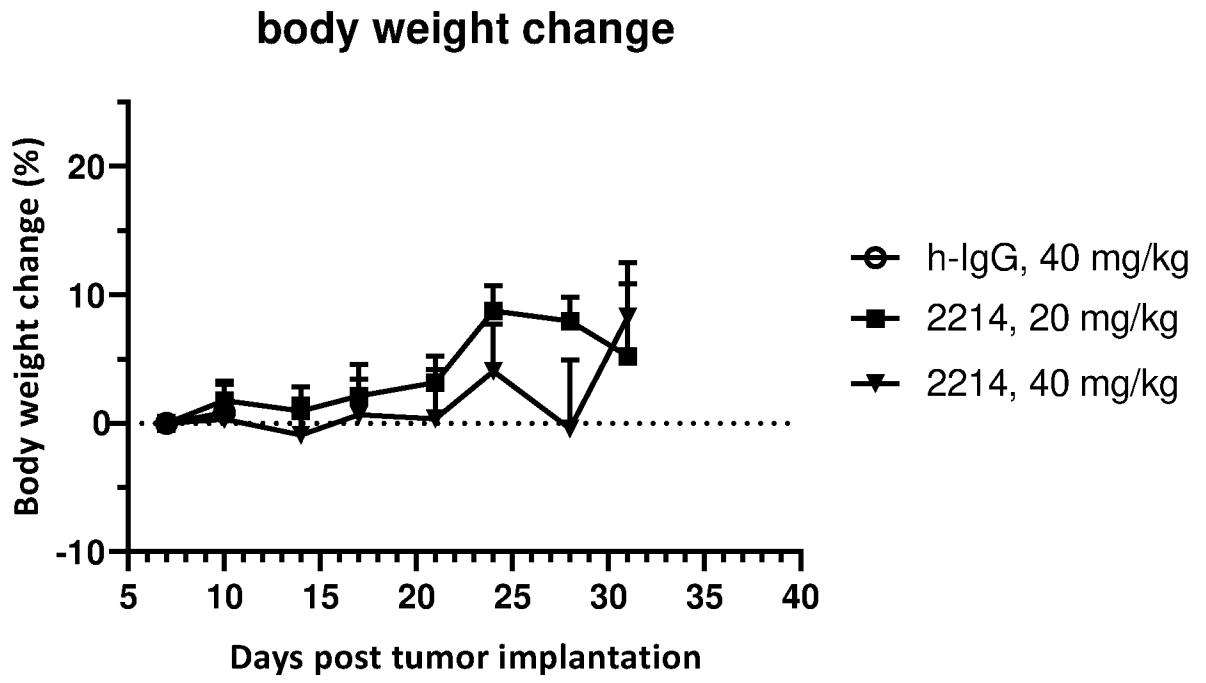


图 16C.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/120265

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/55(2006.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT; WPABS; ENTXT; DWPI; VEN; CJFD; CNKI; 万方, WANFANG; 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System; Genbank; ISI web of Science: 白介素-2, 白细胞介素-2, 缀合物, PD-1抗体, 突变, IL-2受体, 癌症, 申请人/发明人, IL-2, conjugate, PD-1 antibody, mutation, IL-2R?, cancer, 35, 42, 88, 127, 130, BC环, SEQ ID NOs: 1, 4, 8, 15, 14, 22, 20		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PY	WO 2021185362 A1 (INNOVENT BIOLOGICS INC.) 23 September 2021 (2021-09-23) claims 1-22	1-21
Y	CN 110392692 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 29 October 2019 (2019-10-29) claims 1-37, and description, embodiment 1	1-21
Y	WO 2020057645 A1 (INNOVENT BIOLOGICS INC.) 26 March 2020 (2020-03-26) claims 1-29, and description, pages 11-13, and embodiments 1-2	1-21
Y	CN 111655718 A (XENCOR INC.) 11 September 2020 (2020-09-11) description, paragraphs 9-18, 153-154, and 165-166	1-21
Y	CN 110003339 A (INNOVENT BIOLOGICS INC.) 12 July 2019 (2019-07-12) claims 4-7 and 11-18, and description, embodiment 1	8-21
Y	WO 2020252421 A2 (CUGENE, INC.) 17 December 2020 (2020-12-17) claims 1-4, 7-15, and 17-23	1-21
A	CN 110382525 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 25 October 2019 (2019-10-25) entire document	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 November 2022		Date of mailing of the international search report 25 November 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/120265

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020252418 A2 (CUGENE, INC.) 17 December 2020 (2020-12-17) entire document	1-21
A	CN 111868079 A (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) 30 October 2020 (2020-10-30) entire document	1-21
PY	REN, Zhenhua et al. "Selective delivery of low-affinity IL-2 to PD-1+T cells rejuvenates antitumor immunity with reduced toxicity" <i>THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION</i> , Vol. 132, No. 3, 01 February 2022 (2022-02-01), document no. e153604	1-21

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
 - [1] The actually submitted sequence table is an XML file of the standard ST.26.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **20-21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 20-21 relate to a method for treating cancer, falling within the scope defined by PCT Rule 39.1(iv) in which no search is performed. However, a search was performed on the basis of a use of an immunoconjugate in the preparation of a drug for cancer.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/120265

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021185362	A1	23 September 2021	CA	3175728	A1	23 September 2021
				TW	202144391	A	01 December 2021
				AU	2021237518	A1	13 October 2022
				CN	115315437	A	08 November 2022
CN	110392692	A	29 October 2019	TW	201900220	A	01 January 2019
				DK	3606946	T3	24 October 2022
				MA	49033	A	12 February 2020
				LT	3606946	T	25 October 2022
				CA	3053357	A1	11 October 2018
				CL	2019002346	A1	10 January 2020
				JP	2020515275	A	28 May 2020
				JP	2022062001	A	19 April 2022
				EP	3606946	A1	12 February 2020
				AU	2018247765	A1	22 August 2019
				PH	12019502273	A1	07 December 2020
				KR	20210124518	A	14 October 2021
				US	2018326010	A1	15 November 2018
				AR	111400	A1	10 July 2019
				KR	20190121816	A	28 October 2019
				ZA	201905517	B	26 May 2021
				UA	125700	C2	18 May 2022
				RU	2019134338	A	05 May 2021
				CO	2019009354	A2	09 September 2019
				BR	112019017329	A2	14 April 2020
SG	11201909205 Y	A	28 November 2019				
IL	269395	A	28 November 2019				
MX	2019011770	A	09 January 2020				
WO	2018184964	A1	11 October 2018				
CR	20190426	A	01 November 2019				
PE	20191494	A1	21 October 2019				
WO	2020057645	A1	26 March 2020	EP	3854805	A1	28 July 2021
				CA	3098765	A1	26 March 2020
				US	2021213102	A1	15 July 2021
				TW	202014432	A	16 April 2020
				CN	112105634	A	18 December 2020
				JP	2022501009	A	06 January 2022
				AU	2019344875	A1	21 January 2021
CN	111655718	A	11 September 2020	KR	20200100098	A	25 August 2020
				US	2019241638	A1	08 August 2019
				CA	3086199	A1	27 June 2019
				EP	3728302	A1	28 October 2020
				MA	51291	A	28 October 2020
				AU	2018390418	A1	09 July 2020
				US	2022213162	A1	07 July 2022
				SG	11202005732 X	A	29 July 2020
				WO	2019125732	A1	27 June 2019
				JP	2021506291	A	22 February 2021
				RU	2020123788	A	20 January 2022
IL	275426	A	31 August 2020				
CN	110003339	A	12 July 2019	RU	2686612	C1	29 April 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/120265

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 2018531986 A	01 November 2018
		AR 105489 A1	11 October 2017
		KR 20180030580 A	23 March 2018
		TW 201713698 A	16 April 2017
		CA 2990492 A1	16 February 2017
		PL 3334824 T3	28 March 2022
		DK 3334824 T3	07 February 2022
		AU 2016307002 A1	01 February 2018
		NZ 738979 A	25 October 2019
		US 2017044260 A1	16 February 2017
		SI 3334824 T1	29 April 2022
		HK 1255195 B	09 April 2020
		PT 3334824 T	08 February 2022
		WO 2017024465 A1	16 February 2017
		HR P20220111 T1	15 April 2022
		RS 62897 B1	31 March 2022
		MX 2018001671 A	26 September 2018
		IL 256844 A	29 March 2018
		CN 108473977 A	31 August 2018
		BR 112018002274 A2	11 December 2018
		HU E058273 T2	28 July 2022
		LT 3334824 T	25 February 2022
		ES 2904586 T3	05 April 2022
		EP 3334824 A1	20 June 2018
		WO 2017025016 A1	16 February 2017
WO 2020252421 A2	17 December 2020	JP 2022536347 A	15 August 2022
		US 2022170028 A1	02 June 2022
		AU 2020292421 A1	27 January 2022
		CN 114728040 A	08 July 2022
		KR 20220035122 A	21 March 2022
		CA 3143038 A1	17 December 2020
		EP 3983001 A2	20 April 2022
CN 110382525 A	25 October 2019	TW 201842937 A	16 December 2018
		WO 2018184965 A1	11 October 2018
		US 2018326011 A1	15 November 2018
		AR 111203 A1	12 June 2019
		EP 3606947 A1	12 February 2020
		JP 2020512814 A	30 April 2020
WO 2020252418 A2	17 December 2020	EP 3983433 A2	20 April 2022
		AU 2020291942 A1	27 January 2022
		US 2022235109 A1	28 July 2022
		KR 20220034115 A	17 March 2022
		CN 114651004 A	21 June 2022
		JP 2022536345 A	15 August 2022
		CA 3143034 A1	17 December 2020
CN 111868079 A	30 October 2020	EP 3733693 A1	04 November 2020
		US 2021060169 A1	04 March 2021
		AU 2018394189 A1	16 July 2020
		WO 2019131964 A1	04 July 2019
		TW 201930345 A	01 August 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/120265

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP WO2019131964 A1	10 December 2020
		KR 20200103681 A	02 September 2020
		CA 3086842 A1	04 July 2019
<hr/>			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/120265

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 14/55(2006.01)i; A61K 38/20(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNTXT;WPABS;ENTXT;DWPI;VEN;CJFD;CNKI;万方;中国专利生物序列检索系统;Genbank; ISI web of Science: 白介素-2, 白细胞介素-2, 缀合物, PD-1抗体, 突变, IL-2受体, 癌症, 申请人/发明人, IL-2, conjugate, PD-1 antibody, mutation, IL-2R?, cancer, 35, 42, 88, 127, 130, BC环, SEQ ID NOs:1, 4, 8, 15, 14, 22, 20</p>																										
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PY</td> <td>WO 2021185362 A1 (信达生物制药苏州有限公司) 2021年9月23日 (2021 - 09 - 23) 权利要求1-22</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 110392692 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2019年10月29日 (2019 - 10 - 29) 权利要求1-37, 说明书实施例1</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2020057645 A1 (信达生物制药苏州有限公司) 2020年3月26日 (2020 - 03 - 26) 权利要求1-29, 说明书第11-13页, 实施例1-2</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 111655718 A (XENCOR股份有限公司) 2020年9月11日 (2020 - 09 - 11) 说明书第9-18, 153-154, 165-166段</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 110003339 A (信达生物制药苏州有限公司) 2019年7月12日 (2019 - 07 - 12) 权利要求4-7, 11-18, 说明书实施例1</td> <td>8-21</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2020252421 A2 (CUGENE, INC.) 2020年12月17日 (2020 - 12 - 17) 权利要求1-4, 7-15, 17-23</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110382525 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2019年10月25日 (2019 - 10 - 25) 全文</td> <td>1-21</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PY	WO 2021185362 A1 (信达生物制药苏州有限公司) 2021年9月23日 (2021 - 09 - 23) 权利要求1-22	1-21	Y	CN 110392692 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2019年10月29日 (2019 - 10 - 29) 权利要求1-37, 说明书实施例1	1-21	Y	WO 2020057645 A1 (信达生物制药苏州有限公司) 2020年3月26日 (2020 - 03 - 26) 权利要求1-29, 说明书第11-13页, 实施例1-2	1-21	Y	CN 111655718 A (XENCOR股份有限公司) 2020年9月11日 (2020 - 09 - 11) 说明书第9-18, 153-154, 165-166段	1-21	Y	CN 110003339 A (信达生物制药苏州有限公司) 2019年7月12日 (2019 - 07 - 12) 权利要求4-7, 11-18, 说明书实施例1	8-21	Y	WO 2020252421 A2 (CUGENE, INC.) 2020年12月17日 (2020 - 12 - 17) 权利要求1-4, 7-15, 17-23	1-21	A	CN 110382525 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2019年10月25日 (2019 - 10 - 25) 全文	1-21
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
PY	WO 2021185362 A1 (信达生物制药苏州有限公司) 2021年9月23日 (2021 - 09 - 23) 权利要求1-22	1-21																								
Y	CN 110392692 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2019年10月29日 (2019 - 10 - 29) 权利要求1-37, 说明书实施例1	1-21																								
Y	WO 2020057645 A1 (信达生物制药苏州有限公司) 2020年3月26日 (2020 - 03 - 26) 权利要求1-29, 说明书第11-13页, 实施例1-2	1-21																								
Y	CN 111655718 A (XENCOR股份有限公司) 2020年9月11日 (2020 - 09 - 11) 说明书第9-18, 153-154, 165-166段	1-21																								
Y	CN 110003339 A (信达生物制药苏州有限公司) 2019年7月12日 (2019 - 07 - 12) 权利要求4-7, 11-18, 说明书实施例1	8-21																								
Y	WO 2020252421 A2 (CUGENE, INC.) 2020年12月17日 (2020 - 12 - 17) 权利要求1-4, 7-15, 17-23	1-21																								
A	CN 110382525 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2019年10月25日 (2019 - 10 - 25) 全文	1-21																								
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																										
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																										
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年11月18日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年11月25日</p>																								
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>毛颖</p> <p>电话号码 86-(10)-53961979</p>																								

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2020252418 A2 (CUGENE, INC.) 2020年12月17日 (2020 - 12 - 17) 全文	1-21
A	CN 111868079 A (协和麒麟株式会社) 2020年10月30日 (2020 - 10 - 30) 全文	1-21
PY	REN, Z.H. 等. "Selective delivery of low-affinity IL-2 to PD-1+T cells re-juvenates antitumor immunity with reduced toxicity" THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 第132卷, 第3期, 2022年2月1日 (2022 - 02 - 01), 文献号e153604	1-21

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a. 作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
 - 纸件或图形文件形式
- b. 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
 - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2. 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:
- [1] 实际提交的序列列表是ST. 26标准的XML文件。

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 20-21
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求20-21涉及一种治疗癌症的方法，属于PCT细则第39.1(iv)项规定的不进行检索的范围，但基于免疫缀合物的癌症药物制备用途进行了检索。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/120265

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2021185362	A1	2021年9月23日	CA	3175728	A1	2021年9月23日
				TW	202144391	A	2021年12月1日
				AU	2021237518	A1	2022年10月13日
				CN	115315437	A	2022年11月8日
CN	110392692	A	2019年10月29日	TW	201900220	A	2019年1月1日
				DK	3606946	T3	2022年10月24日
				MA	49033	A	2020年2月12日
				LT	3606946	T	2022年10月25日
				CA	3053357	A1	2018年10月11日
				CL	2019002346	A1	2020年1月10日
				JP	2020515275	A	2020年5月28日
				JP	2022062001	A	2022年4月19日
				EP	3606946	A1	2020年2月12日
				AU	2018247765	A1	2019年8月22日
				PH	12019502273	A1	2020年12月7日
				KR	20210124518	A	2021年10月14日
				US	2018326010	A1	2018年11月15日
				AR	111400	A1	2019年7月10日
				KR	20190121816	A	2019年10月28日
				ZA	201905517	B	2021年5月26日
				UA	125700	C2	2022年5月18日
				RU	2019134338	A	2021年5月5日
				CO	2019009354	A2	2019年9月9日
				BR	112019017329	A2	2020年4月14日
SG	11201909205Y	A	2019年11月28日				
IL	269395	A	2019年11月28日				
MX	2019011770	A	2020年1月9日				
WO	2018184964	A1	2018年10月11日				
CR	20190426	A	2019年11月1日				
PE	20191494	A1	2019年10月21日				
WO	2020057645	A1	2020年3月26日	EP	3854805	A1	2021年7月28日
				CA	3098765	A1	2020年3月26日
				US	2021213102	A1	2021年7月15日
				TW	202014432	A	2020年4月16日
				CN	112105634	A	2020年12月18日
				JP	2022501009	A	2022年1月6日
				AU	2019344875	A1	2021年1月21日
CN	111655718	A	2020年9月11日	KR	20200100098	A	2020年8月25日
				US	2019241638	A1	2019年8月8日
				CA	3086199	A1	2019年6月27日
				EP	3728302	A1	2020年10月28日
				MA	51291	A	2020年10月28日
				AU	2018390418	A1	2020年7月9日
				US	2022213162	A1	2022年7月7日
				SG	11202005732X	A	2020年7月29日
				WO	2019125732	A1	2019年6月27日
				JP	2021506291	A	2021年2月22日
				RU	2020123788	A	2022年1月20日
				IL	275426	A	2020年8月31日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/120265

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110003339	A	2019年7月12日	RU	2686612	C1	2019年4月29日
				JP	2018531986	A	2018年11月1日
				AR	105489	A1	2017年10月11日
				KR	20180030580	A	2018年3月23日
				TW	201713698	A	2017年4月16日
				CA	2990492	A1	2017年2月16日
				PL	3334824	T3	2022年3月28日
				DK	3334824	T3	2022年2月7日
				AU	2016307002	A1	2018年2月1日
				NZ	738979	A	2019年10月25日
				US	2017044260	A1	2017年2月16日
				SI	3334824	T1	2022年4月29日
				HK	1255195	B	2020年4月9日
				PT	3334824	T	2022年2月8日
				WO	2017024465	A1	2017年2月16日
				HR	P20220111	T1	2022年4月15日
				RS	62897	B1	2022年3月31日
				MX	2018001671	A	2018年9月26日
				IL	256844	A	2018年3月29日
				CN	108473977	A	2018年8月31日
BR	112018002274	A2	2018年12月11日				
HU	E058273	T2	2022年7月28日				
LT	3334824	T	2022年2月25日				
ES	2904586	T3	2022年4月5日				
EP	3334824	A1	2018年6月20日				
WO	2017025016	A1	2017年2月16日				
WO	2020252421	A2	2020年12月17日	JP	2022536347	A	2022年8月15日
				US	2022170028	A1	2022年6月2日
				AU	2020292421	A1	2022年1月27日
				CN	114728040	A	2022年7月8日
				KR	20220035122	A	2022年3月21日
				CA	3143038	A1	2020年12月17日
				EP	3983001	A2	2022年4月20日
CN	110382525	A	2019年10月25日	TW	201842937	A	2018年12月16日
				WO	2018184965	A1	2018年10月11日
				US	2018326011	A1	2018年11月15日
				AR	111203	A1	2019年6月12日
				EP	3606947	A1	2020年2月12日
				JP	2020512814	A	2020年4月30日
WO	2020252418	A2	2020年12月17日	EP	3983433	A2	2022年4月20日
				AU	2020291942	A1	2022年1月27日
				US	2022235109	A1	2022年7月28日
				KR	20220034115	A	2022年3月17日
				CN	114651004	A	2022年6月21日
				JP	2022536345	A	2022年8月15日
				CA	3143034	A1	2020年12月17日
CN	111868079	A	2020年10月30日	EP	3733693	A1	2020年11月4日
				US	2021060169	A1	2021年3月4日
				AU	2018394189	A1	2020年7月16日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/120265

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		WO	2019131964	A1	2019年7月4日
		TW	201930345	A	2019年8月1日
		JP	W02019131964	A1	2020年12月10日
		KR	20200103681	A	2020年9月2日
		CA	3086842	A1	2019年7月4日