I709572

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I709572 B

(45)公告日： 中華民國 109 (2020) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：108117705 (22)申請日： 中華民國 103 (2014) 年 03 月 14 日

(51)Int. Cl.： *C07K14/55 (2006.01)* *C07K19/00 (2006.01)* *A61K38/20 (2006.01)* *A61P37/02 (2006.01)*

(30)優先權：2013/03/14 美國 61/784,669

(71)申請人：美商安美基公司 (美國) AMGEN INC. (US)
美國

(72)發明人：葛文 馬克 A GAVIN, MARC A. (US)；柯南 古南斯卡瑞恩 KANNAN, GUNASEKARAN (US)；李麗 LI, LI (CN)；皮爾森 喬許亞 T PEARSON, JOSHUA T. (US)；卡羅 馬格瑞特 KAROW, MARGARET (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2009/061853A2 WO 2010/085495A1

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：27 項 圖式數：13 共 130 頁

(54)名稱

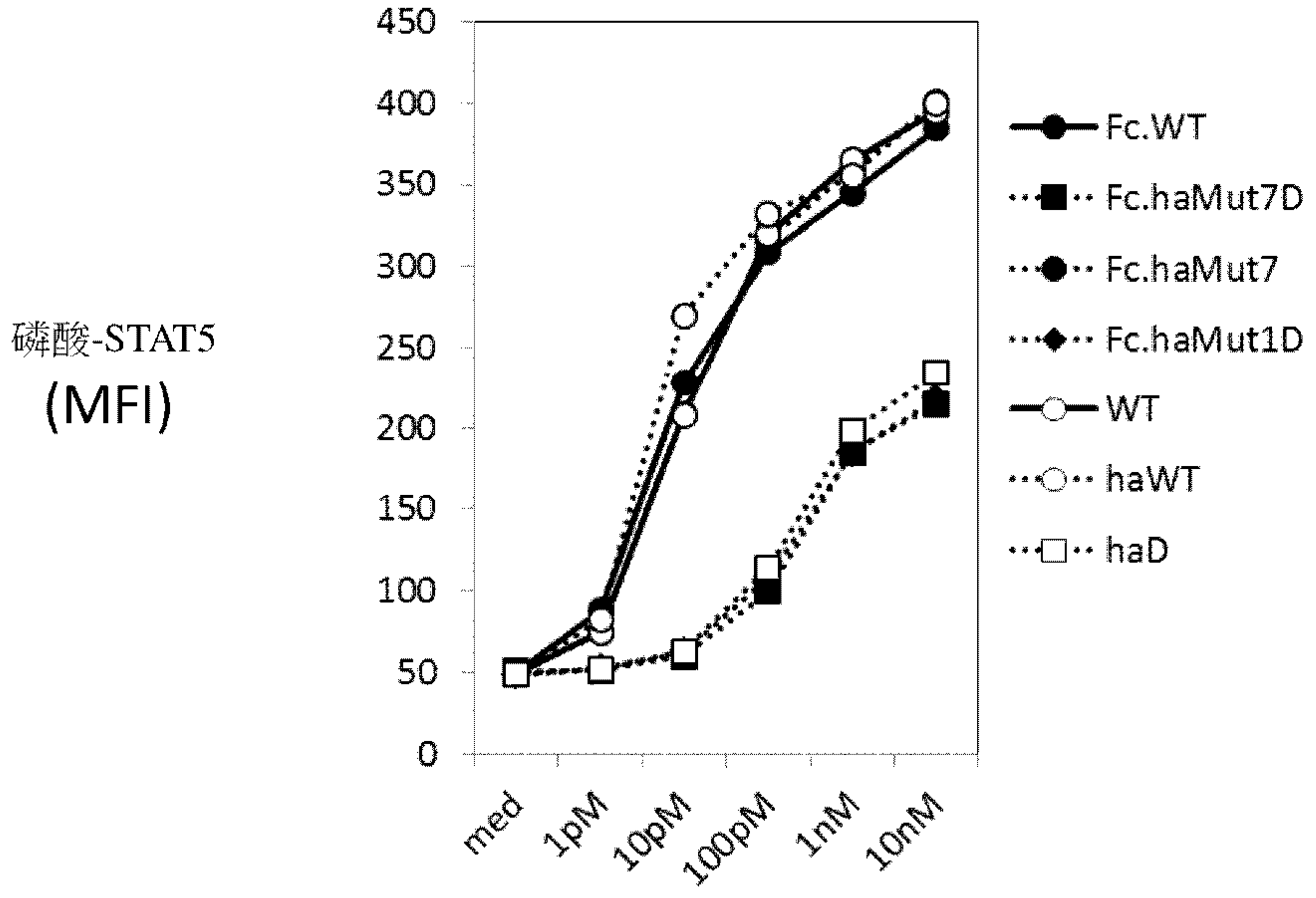
用於 T 調節細胞之擴展的介白素-2 突變蛋白

(57)摘要

本發明提供優先擴展並激活 T 調節細胞並適用於大規模生產之 IL-2 突變蛋白及 IL-2 突變蛋白 Fc 融合分子。本發明亦提供缺乏或顯著降低效應子功能且儘管缺乏 N297 處之糖基化但仍具有高穩定性之變體人類 IgG1 Fc 分子。而且，本發明提供當在哺乳動物細胞中表現時會糖基化之連接體肽。

Provided herein are IL-2 muteins and IL-2 mutein Fc-fusion molecules that preferentially expand and activate T regulatory cells and are amenable to large scale production. Also provided herein are variant human IgG1 Fc molecules lacking or with highly reduced effector function and high stability despite lacking glycosylation at N297. Also, provided herein are linker peptides that are glycosylated when expressed in mammalian cells.

指定代表圖：



磷酸-STAT5
(MFI)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
med
1pM
10pM
100pM
1nM
10nM
Fc.WT
Fc.haMut7D
Fc.haMut7
Fc.haMut1D
WT
haWT
haD

【圖 1】

專利案號：108117705
原申請案號：103109295

公告本

I709572

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於T調節細胞之擴展的介白素-2突變蛋白

【英文發明名稱】

INTERLEUKIN-2 MUTEINS FOR THE EXPANSION OF T-REGULATORY CELLS

【中文】

本發明提供優先擴展並激活T調節細胞並適用於大規模生產之IL-2突變蛋白及IL-2突變蛋白Fc融合分子。本發明亦提供缺乏或顯著降低效應子功能且儘管缺乏N297處之糖基化但仍具有高穩定性之變體人類IgG1 Fc分子。而且，本發明提供當在哺乳動物細胞中表現時會糖基化之連接體肽。

【英文】

Provided herein are IL-2 muteins and IL-2 mutein Fc-fusion molecules that preferentially expand and activate T regulatory cells and are amenable to large scale production. Also provided herein are variant human IgG1 Fc molecules lacking or with highly reduced effector function and high stability despite lacking glycosylation at N297. Also, provided herein are linker peptides that are glycosylated when expressed in mammalian cells.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於T調節細胞之擴展的介白素-2突變蛋白

【英文發明名稱】

INTERLEUKIN-2 MUTEINS FOR THE EXPANSION OF T-REGULATORY CELLS

【技術領域】

本發明係關於優先擴展並激活T調節細胞並適用於大規模生產之IL-2突變蛋白及IL-2突變蛋白Fc融合分子。

【先前技術】

IL-2結合三種跨膜受體亞單位：在IL-2結合後一起激活細胞內信號傳導事件之IL-2Rβ及IL-2Rγ，及用於穩定IL-2與IL-2Rβγ間之相互作用之CD25 (IL-2Rα)。藉由IL-2Rβγ遞送之信號包括PI3激酶、Ras-MAP激酶及STAT5路徑之彼等。

T細胞需要表現CD25以對通常存在於組織中之低濃度之IL-2起反應。表現CD25之T細胞包括對於阻抑自體免疫發炎必需之FOXP3+調節T細胞(Treg細胞)及已激活以表現CD25之FOXP3-T細胞二者。FOXP3-CD25+T效應細胞(Teff)可為CD4+或CD8+細胞，其二者均可導致發炎、自體免疫性、器官移植排斥或移植物抗宿主疾病。IL-2刺激之STAT5信號傳導對於正常T-reg細胞生長及存活且對於高FOXP3表現甚為重要。

在共有之WO 2010/085495中，闡述IL-2突變蛋白優先擴展或刺激Treg細胞之用途。當投與給個體時，對Treg細胞之效應可用於治療發炎性疾病及自體免疫疾病。儘管其中所闡述之IL-2突變蛋白可用於在活體內相比於Teff細胞優先擴展Treg，但期望產生對於人類治療劑而

言具有最佳屬性之IL-2突變蛋白。

【發明內容】

本文中闡述適用於高產率可製造性並具有最佳化藥理學活性之IL-2突變蛋白。在產生實例性基於IL-2突變蛋白之人類治療劑之努力中，出現許多意外且不可預知之觀測結果。本文中所闡述之IL-2突變蛋白為該努力之結果。

本文中所闡述之IL-2突變蛋白具有最小數量之IL-2改變，從而降低產生針對IL-2突變蛋白及/或內源性IL-2之免疫反應之可能性，但仍維持Treg優化擴展及激活。此外，在某些實施例中，當投與給個體時，IL-2突變蛋白與增加血清半衰期之分子(例如抗體Fc)融合。IL-2突變蛋白具有短血清半衰期(對於皮下注射而言為3 hr至5 hr)。本文中所闡述之實例性IL-2突變蛋白Fc融合物在人類中具有至少1天、至少3天、至少5天、至少10天、至少15天、至少20天或至少25天之半衰期。對IL-2突變蛋白之藥物動力學之此效應允許以降低或較少頻率給藥IL-2突變蛋白治療劑。

此外，當產生醫藥大分子時，必須考慮大量產生大分子之能力，同時使聚集最小化並使分子之穩定性最大化。IL-2突變蛋白Fc融合分子展示該等屬性。

另外，在某些實施例中，IL-2突變蛋白Fc融合蛋白含有IgG1 Fc區。當期望廢止IgG1之效應子功能(例如ADCC活性)時，發現297位之天冬醯胺至甘胺酸之突變(N297G；EU編碼方案)相比於導致無糖基化IgG1 Fc之其他突變提供極大改良之純化效率及生物物理性質。在較佳實施例中，將半胱胺酸改造至Fc中以允許二硫鍵，此增加無糖基化

之含Fc分子之穩定性。無糖基化Fc之有用性超過IL-2突變蛋白Fc融合背景。因此，本文中提供含Fc分子、Fc融合物及抗體，包含N297G取代及視情況一或多種額外殘基至半胱胺酸之取代。

本發明之另一態樣包括糖基化之肽連接體。適用於N-糖基化之較佳連接體肽包括GGNGT (SEQ ID NO:6)或YGNGT (SEQ ID NO:7)。

在另一態樣中，本發明提供包含V91K取代及與SEQ ID NO:1中所闡述之胺基酸序列具有至少90%一致性之胺基酸序列的人類介白素-2 (IL-2)突變蛋白，其中該IL-2突變蛋白優先刺激T調節細胞。在一實施例中，人類IL-2突變蛋白包含與SEQ ID NO:1中所闡述之胺基酸序列具有至少95%一致性之胺基酸序列。在另一實施例中，該突變蛋白包含SEQ ID NO:1中所闡述之胺基酸序列。在另一實施例中，位置125為丙胺酸。在另一實施例中，位置125為半胱胺酸。

在另一態樣中，本發明提供包含Fc及人類IL-2突變蛋白之Fc融合蛋白。在一實施例中，Fc為人類IgG1 Fc。在另一實施例中，人類IgG1 Fc包含一或多個改變該Fc之效應子功能之突變。在另一實施例中，人類IgG1包含N297處之取代。在另一實施例中，N297處之取代為N297G。在另一實施例中，Fc融合蛋白包含該人類IgG Fc之C端離胺酸之取代或缺失。在另一實施例中，該人類IgG Fc之C端離胺酸缺失。在另一實施例中，連接體連結該蛋白質之Fc及人類IL-2突變蛋白部分。在另一實施例中，連接體為GGGGS、GGNGT或YGNGT。在另一實施例中，連接體為GGGGS。在另一實施例中，IL-2突變蛋白進一步包含當在哺乳動物細胞表現中時改變該Fc融合蛋白之糖基化之胺基酸添加、取代或缺失。在另一實施例中，IL-2突變蛋白包含T3取

代。在另一實施例中，IL-2突變蛋白包含T3N或T3A取代。在另一實施例中，IL-2突變蛋白包含T3N取代。在另一實施例中，IL-2突變蛋白進一步包含S5突變。在另一實施例中，IL-2突變蛋白進一步包含S5T突變。在另一實施例中，Fc融合蛋白包含Fc二聚體。在另一實施例中，該Fc融合蛋白包含兩種IL-2突變蛋白。在另一實施例中，該Fc融合蛋白包含單一IL-2突變蛋白。

在另一態樣中，本發明提供編碼人類IL-2突變蛋白或抗體之Fc部分及人類IL-2突變蛋白之分離核酸。在一實施例中，抗體之該Fc部分及人類IL-2突變蛋白係在單一開放讀碼框中編碼。在另一實施例中，Fc為人類IgG1 Fc。在另一實施例中，人類IgG1 Fc包含一或多個改變該Fc之效應子功能之突變。在另一實施例中，人類IgG1包含N297處之取代。在另一實施例中，N297處之取代為N297G。在另一實施例中，人類IgG1 Fc包含C端離胺酸之取代或缺失。在另一實施例中，該人類IgG Fc之C端離胺酸缺失。在另一實施例中，該核酸進一步編碼連結抗體之Fc部分及人類IL-2突變蛋白之連接體。在另一實施例中，連接體為GGGGS、GGNGT或YGNGT。在另一實施例中，連接體為GGGGS。在另一實施例中，IL-2突變蛋白進一步包含當在哺乳動物細胞中表現時改變包含該IL-2突變蛋白之蛋白質之糖基化的胺基酸添加、取代或缺失。在另一實施例中，IL-2突變蛋白包含T3取代。在另一實施例中，IL-2突變蛋白包含T3N或T3A取代。在另一實施例中，IL-2突變蛋白包含T3N取代。在另一實施例中，IL-2突變蛋白進一步包含S5突變。在另一實施例中，IL-2突變蛋白進一步包含S5T突變。

在另一態樣中，本發明提供包含上文所闡述以操作方式連接至

啟動子之分離核酸之表現載體。

在另一態樣中，本發明提供包含本文所闡述之分離核酸之宿主細胞。在一實施例中，分離核酸係以操作方式連接至啟動子。在另一實施例中，該宿主細胞係原核細胞。在另一實施例中，宿主細胞係大腸桿菌(*E. coli*)。在另一實施例中，該宿主細胞係真核細胞。在另一實施例中，宿主細胞係哺乳動物細胞。在另一實施例中，宿主細胞係中國倉鼠卵巢(CHO)細胞系。

在另一態樣中，本發明提供製備人類IL-2突變蛋白之方法，其包含在其中表現該啟動子之條件下培養上文所闡述之宿主細胞及自該培養物收穫人類IL-2突變蛋白。在一實施例中，該方法包含在其中表現該啟動子之條件下培養上文所闡述之宿主細胞及自該培養物收穫Fc融合蛋白。

在另一態樣中，本發明提供增加T細胞群體內調節T細胞(Treg)對非調節T細胞之比例之方法，其包含使T細胞群體與有效量之上文所闡述之人類IL-2突變蛋白接觸。在一實施例中，CD3+FoxP3+細胞對CD3+FoxP3-之比例增加。在另一實施例中，CD3+FoxP3+細胞對CD3+FoxP3-之比例增加至少50%。

在另一態樣中，本發明提供增加T細胞群體內調節T細胞(Treg)對非調節T細胞之比例之方法，其包含使T細胞群體與有效量之上文所闡述之Fc融合蛋白接觸。在一實施例中，CD3+FoxP3+細胞對CD3+FoxP3-之比例增加。在另一實施例中，CD3+FoxP3+細胞對CD3+FoxP3-之比例增加至少50%。

在另一態樣中，本發明提供增加個體外周血液內調節T細胞

(Treg)對非調節T細胞之比例之方法，其包含投與有效量之上文所闡述之人類IL-2突變蛋白。在一實施例中，CD3+FoxP3+細胞對CD3+FoxP3-之比例增加。在另一實施例中，CD3+FoxP3+細胞對CD3+FoxP3-之比例增加至少50%。

在另一態樣中，本發明提供增加個體外周血液內調節T細胞(Treg)對非調節T細胞之比例之方法，其包含投與有效量之上文所闡述之Fc融合蛋白。在一實施例中，CD3+FoxP3+細胞對CD3+FoxP3-之比例增加。在另一實施例中，CD3+FoxP3+細胞對CD3+FoxP3-之比例增加至少50%。

在另一態樣中，本發明提供增加個體外周血液內調節T細胞(Treg)對自然殺手(NK)細胞之比例之方法，其包含投與有效量之上文所闡述之人類IL-2突變蛋白。在一實施例中，CD3+FoxP3+細胞對表現CD56及/或CD16之CD3-CD19-淋巴球之比例增加。在另一實施例中，CD3+FoxP3+細胞對表現CD56及/或CD16之CD3-CD19-淋巴球之比例增加至少50%。

在另一態樣中，本發明提供增加個體外周血液內調節T細胞(Treg)對自然殺手(NK)細胞之比例之方法，其包含投與有效量之上文所闡述之Fc融合蛋白。在一實施例中，CD3+FoxP3+細胞對表現CD56及/或CD16之CD3-CD19-淋巴球之比例增加。在另一實施例中，CD3+FoxP3+細胞對表現CD56及/或CD16之CD3-CD19-淋巴球之比例增加至少50%。

在另一態樣中，本發明提供治療患有發炎性或自體免疫疾病之個體之方法，該方法包含投與給該個體治療有效量之上文所闡述之

IL-2突變蛋白。

在另一態樣中，本發明提供治療患有發炎性或自體免疫疾病之個體之方法，該方法包含投與給該個體治療有效量之上文所闡述之Fc融合蛋白。在一實施例中，該投與使得該疾病之至少一種症狀減少。在另一實施例中，個體外周血液內調節T細胞(Treg)對非調節T細胞之比例在投與後增加。在另一實施例中，個體外周血液內調節T細胞(Treg)對非調節T細胞之比例在投與後基本上保持相同。在另一實施例中，發炎性或自體免疫疾病係狼瘡、移植物抗宿主疾病、C型肝炎誘導之血管炎、I型糖尿病、多發性硬化症、自然性流產、異位性疾病或發炎性腸疾病。

在另一態樣中，本發明提供人類IgG1抗體之Fc區，其中該Fc區包含N297G突變且人類IgG1之該Fc區包含與SEQ ID NO:3中所闡述之胺基酸序列之至少90%一致性。在一實施例中，人類IgG1之Fc區包含與SEQ ID NO:3中所闡述之胺基酸序列之至少95%一致性。在另一實施例中，人類IgG1之Fc區包含SEQ ID NO:3中所闡述之胺基酸序列。在另一實施例中，人類IgG1之Fc區進一步包含一或多個穩定多肽之突變。在另一實施例中，SEQ ID NO:3中所闡述之一或多個胺基酸係經半胱胺酸取代。在另一實施例中，SEQ ID NO:3中所闡述之胺基酸序列之V259、A287、R292、V302、L306、V323或I332係經半胱胺酸取代。在另一實施例中，Fc區包含於SEQ ID NO:3中所闡述之胺基酸序列內之A287C及L306C取代。在另一實施例中，Fc區包含於SEQ ID NO:3中所闡述之胺基酸序列內之V259C及L306C取代。在另一實施例中，Fc區包含於SEQ ID NO:3中所闡述之胺基酸序列內之R292C及

V302C取代。在另一實施例中，Fc區包含於SEQ ID NO:3中所闡述之胺基酸序列內之V323C及I332C取代。

在另一態樣中，本發明提供包含上文所闡述之Fc區之抗體。

在另一態樣中，本發明提供包含上文所闡述之Fc區之Fc融合蛋白。

在另一態樣中，本發明提供包含連接體之多肽，其中連接體係GGNGT或YGNGT。在一實施例中，連接體包含N-糖基化。在另一實施例中，連接體係插入至多肽結構中之環中或置換該環。

在另一態樣中，本發明提供製備無糖基化之含IgG1 Fc分子之方法，該方法包含在哺乳動物細胞培養物中表現編碼上文所闡述之多肽之核酸及自該培養物收穫無糖基化之含IgG1 Fc分子。

在另一態樣中，本發明提供製備當在哺乳動物細胞中表現時無糖基化之含IgG1 Fc分子之方法，該方法包含使Fc區中之N297密碼子突變成甘胺酸密碼子之步驟。

在另一態樣中，本發明提供由SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20之序列組成之Fc融合蛋白。在一實施例中，本發明提供編碼Fc融合物之核酸。在另一實施例中，本發明提供包含該核酸之細胞。在另一實施例中，本發明提供製備Fc融合蛋白之方法，其包含在允許細胞表現該Fc融合蛋白之條件下培育細胞。在另一實施例中，本發明提供治療個體之發炎性或自體免疫病狀之方法，其包含投與給該個體有效量之Fc融合蛋白。在另一實施例中，發炎性或自體免疫病狀係移植物抗宿主疾病。

在另一態樣中，本發明提供監測個體對利用上文所闡述之人類

介白素-2 (IL-2)突變蛋白或上文所闡述之Fc融合蛋白之治療之反應之方法，其包含檢測該個體中之變化，該變化為體溫之增加、該個體之外周血液中之CRP之增加、該個體之外周血液中之血小板之減少、該個體之外周血液中之嗜中性球之降低或該個體之外周血液中之白蛋白之降低，其中在檢測到該變化後將該治療終止、暫停、減少其給藥頻率或減少其給藥量。在一實施例中，該變化包含體溫升高至少0.5℃、該個體之外周血液中之CRP增加至少0.2 mg/mL、該個體之外周血液中之血小板減少至少0.8倍、該個體之外周血液中之嗜中性球減少至少0.8倍或該個體之外周血液中之白蛋白減少至少0.4倍。

【圖式簡單說明】

圖1　在短期刺激分析中，藉由與IgG-Fc之C端融合之同源二聚合不以減少之效能並以對CD25之高親和力改變IL-2突變蛋白之活性。

圖2A及圖2B　測試具有所示突變並與Fc異源二聚體之一側之C端融合之IL-2突變蛋白刺激T細胞中之STAT5磷酸化之能力。該等突變蛋白亦含有三個賦予對CD25之高親和力之突變(V69A、N71R、Q74P)。將其活性與不具有Fc融合物之IL-2之三種形式(開放符號)比較：WT IL-2、HaWT (對CD25之高親和力) (N29S、Y31H、K35R、T37A、K48E、V69A、N71R、Q74P)及HaD (對CD25之高親和力及減少之信號傳導活性) (N29S、Y31H、K35R、T37A、K48E、V69A、N71R、Q74P、N88D)。顯示經選通FOXP3+CD4+及FOXP3-CD4+ T細胞之磷酸-STAT5反應。

圖3　因應與Fc異源二聚體融合之IL-2突變蛋白之調整之T細胞

亞群增殖。將融合蛋白之活性與不具有Fc融合物之IL-2之三種形式(開放符號)比較：WT IL-2、HaWT (對CD25之高親和力) (N29S、Y31H、K35R、T37A、K48E、V69A、N71R、Q74P)及HaD (對CD25之高親和力及減少之信號傳導活性) (N29S、Y31H、K35R、T37A、K48E、V69A、N71R、Q74P、N88D)。

圖4 因應與Fc異源二聚體融合之IL-2突變蛋白之調整之NK細胞增殖。將融合蛋白之活性與不具有Fc融合物之IL-2之三種形式(開放符號)比較：WT IL-2、HaWT (對CD25之高親和力) (N29S、Y31H、K35R、T37A、K48E、V69A、N71R、Q74P)及HaD (對CD25之高親和力及減少之信號傳導活性) (N29S、Y31H、K35R、T37A、K48E、V69A、N71R、Q74P、N88D)。

圖5 因應與Fc異源二聚體N297G融合之IL-2突變蛋白之調整之T細胞亞群增殖。將Fc.突變蛋白之活性與WT IL-2 (開環)及Fc.WT (閉環)比較。賦予對CD25之高親和力之突變(HaMut1)為V69A及Q74P。

圖6 因應與Fc異源二聚體N297G融合之IL-2突變蛋白之調整之NK細胞增殖。將Fc.突變蛋白之活性與WT IL-2 (開環)及Fc.WT (閉環)比較。

圖7A及圖7B 不具有賦予對CD25之高親和力之突變之Fc.IL-2突變蛋白促進人類化小鼠中之Treg擴展及FOXP3上調。

圖8 較低之每週劑量(0.5 μg/動物)之Fc.IL-2突變蛋白促進人類化小鼠中之Treg擴展及FOXP3上調，其中針對Fc.V91K所觀測到之活性相對於Fc.N88D及Fc.WT較好。

圖9A Fc.V91K及Fc.N88D藉助與CD25聯結來存留於經激活T細

胞之表面上。

圖9B　利用Fc.V91K及Fc.N88D相對於Fc.WT之IL-2R信號傳導之持久性。

圖10A及B　食蟹猴中Fc.V91K之兩週及四週給藥間隔之比較及IV及SC給藥途徑之比較。

圖11A-F　利用PROLEUKIN®、Fc.V91K及Fc.N88D之不同給藥方案治療之食蟹猴中之細胞反應、體溫及血清CRP之動力學。

圖12A　PROLEUKIN®、Fc.V91K或Fc.N88D之漸增劑量對食蟹猴中之Treg細胞、NK細胞、$CD4^{+}FOXP3^{-}$ T細胞及$CD8^{+}FOXP3^{-}$ T細胞之含量之效應。每一數據點代表四種動物之平均峰值反應。

圖12B　PROLEUKIN®、Fc.V91K或Fc.N88D之漸增劑量對食蟹猴中之Treg細胞及嗜酸性球之含量之效應。每一數據點代表四種動物之平均峰值反應。

圖12C　PROLEUKIN®、Fc.V91K或Fc.N88D之漸增劑量對食蟹猴中之Treg細胞及CRP之含量及體溫之效應。每一數據點代表四種動物之平均峰值反應。

圖12D　PROLEUKIN®、Fc.V91K或Fc.N88D之漸增劑量對食蟹猴中之Treg細胞、血小板、嗜中性球及白蛋白之含量之效應。每一數據點代表四種動物之平均峰值反應。將右邊y軸反轉以表達血小板、嗜中性球或白蛋白相對於給藥前樣品之倍數變化減少。

圖13　抗藥物抗體(ADA)在利用Fc.V91K治療之食蟹猴中之發展之動力學。

【實施方式】

相關申請案之交叉參照

本申請案主張於2013年3月14日申請之美國臨時申請案第61/784,669號之權益。上述申請案係以引用方式併入本文中。

本文中所用之各部分標題僅出於組織目的，而不能理解為限制所述標的物。此說明書主體中所引用之所有參考文獻以引用方式明確全文併入本文中。

重組DNA、寡核苷酸合成、組織培養及轉型、蛋白質純化等可使用標準技術。酶促反應及純化技術可根據製造商說明書來實施，或以本技術領域內習用方法來實施，或如本文所述來實施。通常可根據本技術領域內熟知之習用方法且如各種一般且更具體參考文獻中所述實施以上程序及技術，遍及本說明書引用且論述該等參考文獻。例如參見Sambrook等人，2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manuel*, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, cold Spring Harbor, N.Y.，其出於任何目的以引用方式併入本文中。除非提供具體定義，否則結合本文所述分析化學、有機化學及醫學及醫藥化學使用之術語及其實驗室程序以及技術使用之術語係本技術領域內熟知且常用之術語。化學合成、化學分析、醫藥製備、調配及遞送以及患者之治療可使用標準技術。

IL-2

本文中所闡述之IL-2突變蛋白係野生型人類IL-2之變體。本文中所闡述之「野生型人類IL-2」、「野生型IL-2」或「WT IL-2」應意指具有以下胺基酸序列之多肽：

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF

YMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT

其中X係C、S、V或A (SEQ ID NO:2)。

變體可在野生型IL-2胺基酸序列內含有一或多個取代、缺失或插入。殘基在本文中係藉由一個字母胺基酸代碼接著IL-2胺基酸位置來指定，例如K35係於SEQ ID NO: 2之35位處之離胺酸殘基。取代在本文中係由一個字母胺基酸代碼接著IL-2胺基酸位置接著取代用一個字母胺基酸代碼來指定，例如K35A係SEQ ID NO:2之35位處之離胺酸殘基經丙胺酸殘基之取代。

IL-2突變蛋白

本文中提供優先刺激T調節(Treg)細胞之人類IL-2突變蛋白。本文中所闡述之「優先刺激T調節細胞」意指相比於CD3+FoxP3- T細胞，突變蛋白優先促進CD3+FoxP3+ T細胞之增殖、存活、激活及/或起作用。量測優先刺激Treg之能力之方法可藉由外周血液白血球之流式細胞術來量測，其中觀測FOXP3+CD4+ T細胞在總CD4+ T細胞中之百分比之增加、FOXP3+CD8+ T細胞在總CD8+ T細胞中之百分比之增加、FOXP3+ T細胞相對於NK細胞之百分比之增加及/或相對於在其他T細胞上之CD25表現增加在FOXP3+ T細胞表面上之CD25表現含量增加更大。Treg細胞之優化生長亦可根據去甲基化FOXP3啟動子DNA (即Treg特異性去甲基化區域或TSDR)相對於自全血提取之DNA中之去甲基化CD3基因之增加表現來檢測，如藉由對來自亞硫酸氫鹽處理之基因組DNA之聚合酶鏈反應(PCR)產物測序來檢測(J. Sehouli等人，2011. Epigenetics 6:2, 236-246)。

優先刺激Treg細胞之IL-2突變蛋白使個體或外周血液樣品中CD3+FoxP3+ T細胞相比於CD3+FoxP3- T細胞之比例增加至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少150%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%、至少600%、至少700%、至少800%、至少900%或至少1000%。

較佳IL-2突變蛋白包括(但不限於)包含於SEQ ID NO:2中所闡述之胺基酸序列中之V91K或N88D取代之IL-2突變蛋白。實例性IL-2突變蛋白闡述於SEQ ID NO:1中。尤佳者係包含C125A取代之於SEQ ID NO:1中所闡述之胺基酸序列。儘管可有利地減少野生型IL-2序列之其他突變之數量，但本發明包括除V91K或N88D取代以外亦具有截短或額外插入、缺失或取代之IL-2突變蛋白，前提條件係該等突變蛋白維持優先刺激Treg之活性。因此，實施例包括如下IL-2突變蛋白：其優先刺激Treg細胞並包含與SEQ ID NO:2中所闡述之胺基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性之具有V91K或N88D之胺基酸序列。在尤佳實施例中，該等IL-2突變蛋白包含與SEQ ID NO:2中所闡述之胺基酸序列具有至少90%, 至少91%, 至少92%, 至少93%, 至少94%, 至少95%, 至少96%, 至少97%, 至少98%或至少99%一致性之胺基酸序列。

對於胺基酸序列，序列一致性及/或類似性係藉由使用本技術領域內已知之標準技術來測定，包括(但不限於) Smith及Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482之局部序列一致性演算法、Needleman及

Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443之序列一致性比對演算法、Pearson及Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444之類似性方法之研究、該等演算法之電腦化實施方案(Wisconsin Genetics軟體包, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.中之GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA)、由Devereux等人，1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395闡述之最佳擬合序列程式(較佳使用缺省設定)或藉由檢查。較佳地，藉由FastDB基於以下參數計算一致性百分數： 1之不匹配罰分；1之間隔罰分；0.33之間隔大小罰分；及30之聯接罰分，「Current Methods in Sequence Comparison and Analysis,」 Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications，第127頁至第149頁(1988), Alan R. Liss公司。

有用演算法之實例係PILEUP。PILEUP使用漸進式成對比對自一組相關序列建立多個序列比對。其亦可繪製用於建立該比對之顯示叢集關係之樹。PILEUP使用Feng及Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360之漸進式比對方法之簡化；該方法與Higgins及Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153所闡述之方法類似。有用PILEUP參數包括3.00之缺省間隔權重、0.10之缺省間隔長度權重及加權末端間隔。

有用演算法之另一實例係BLAST演算法，闡述於：Altschul等人，1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410；Altschul等人，1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402；及Karin等人，1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787。尤其有用之BLAST程式係自Altschul等人，1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480獲得之WU-BLAST-2 程式。WU-BLAST-2使用若干研究參數，其大部分設定為缺省值。以以下值

設定可調整參數：重疊跨度=1，重疊分數=0.125，代碼臨限值(T)=II。HSP S及HSP S2參數係動態值，且藉由該程式自身視特定序列之組成及研究所關注序列所針對之特定數據庫之組成而確定；然而，可調整該等值以提高敏感性。

另一有用演算法係由Altschul等人，1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402報導之間隔BLAST。間隔BLAST使用BLOSUM-62取代分值；設定為9之臨限T參數；誘發非間隔延伸之兩命中點法(two-hit method)，間隔長度k要求支付10+k之代價；設定為16之X_u，及對於該演算法之數據庫搜索階段設定為40且對於輸出階段設定為67之X_g。間隔比對係由相當於約22位元之分值誘發。

雖然引入胺基酸序列變化之位點或區域可係預定的，但突變本身不需係預定的。例如，為使給定位點處之突變之性能最佳化，可在標靶密碼子或區域處實施隨機誘變且針對期望活性之最佳組合篩選所表現IL-2突變蛋白。在具有已知序列之DNA中之預定位點處進行取代突變之技術為眾所周知，例如M13引物誘變及PCR誘變。突變體之篩選可使用(例如)本文中所闡述之分析來進行。

胺基酸取代通常具有單一殘基；插入通常將為約一(1)個至約二十(20)個胺基酸殘基，但可容忍大得多之插入。缺失係在約一(1)個至約二十(20)個胺基酸殘基之範圍內，但在一些情形下缺失可大得多。

取代、缺失、插入或其任何組合可用於達成最終衍生物或變體。通常，對少許胺基酸進行該等變化以使分子之改變最小化，特定而言抗原結合蛋白之免疫原性及特異性。然而，在某些情況下可容忍較大變化。概言之，依照表1所繪示之以下圖表進行保守取代。

表1

原始殘基	例示性取代
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln、His
Asp	Glu
Cys	Ser、Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn、Gln
Ile	Leu、Val
Leu	Ile、Val
Lys	Arg、Gln、Glu
Met	Leu、Ile
Phe	Met、Leu、Tyr、Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr、Phe
Tyr	Trp、Phe
Val	Ile、Leu

藉由選擇比表1中所顯示之取代較不保守之取代來進行功能或免疫學一致性之實質變化。例如，可進行更顯著影響以下性質之取代：改變區域中之多肽骨架之結構，例如α-螺旋或β褶板結構；標靶位點處分子之電荷或疏水性；或側鏈之容積。通常預期產生多肽性質之最大變化之取代係彼等，其中(a) 親水殘基(例如絲胺醯基或蘇胺醯基)係取代為疏水殘基(例如白胺醯基、異白胺醯基、苯基丙胺醯基、纈胺醯基或丙胺醯基) (或經其取代)；(b) 半胱胺酸或脯胺酸係取代為任

何其他殘基(或經其取代)；(c) 具有正電性側鏈之殘基(例如離胺醯基、精胺醯基或組胺醯基)係取代為負電性殘基(例如麩胺醯基或天冬胺醯基) (或經其取代)；或(d) 具有龐大側鏈之殘基(例如苯基丙胺酸)係取代為不具有側鏈之殘基(例如甘胺酸) (或經其取代)。

變體通常呈現與天然類似物相同之定性生物活性並將引發相同之免疫反應，但變體亦經選擇以根據需要改質IL-2突變蛋白之特徵。另一選擇為，變體可經設計以使得IL-2突變蛋白之生物活性得到改變。例如，糖基化位點可如本文中所論述來改變或去除。

具有經延長血清半衰期之IL-2突變蛋白

由於本文中所提供之IL-2突變蛋白相比於(例如) Teff或NK細胞優先擴展Treg，故預期當投與給患者時之安全特性將與野生型IL-2或PROLEUKIN® (阿地介白素(aldesleukin)；Novartis，Basel，Switzerland)不同。與野生型IL-2或PROLEUKIN®相關之副效應包括類似流行性感冒之症狀、受寒/僵直、關節痛、發熱、皮疹、瘙癢病、注射部位反應、低血壓、腹瀉、噁心、焦慮、混亂及抑鬱症。本文中所提供之IL-2突變蛋白可經改變以包括延長突變蛋白之血清半衰期之分子或與其融合，而不增加該半衰期延長可增加患者中副效應或不良事件之可能性或強度之風險。此一經延長血清半衰期突變蛋白之皮下給藥可允許長時間標靶覆蓋以及較低全身性最大暴露(C_{max})。經延長血清半衰期可允許突變蛋白之較低或較少頻率給藥方案。

本文中所提供之IL-2突變蛋白之血清半衰期可藉由基本上任何本技術領域內已知之方法來延長。該等方法包括改變IL-2突變蛋白之序列以包括結合至新生Fcγ受體或結合至具有經延長血清半衰期之蛋白

質(例如IgG或人類血清白蛋白)之肽。在其他實施例中，IL-2突變蛋白與賦予融合分子經延長半衰期之多肽融合。該等多肽包括IgG Fc或其他結合至新生Fcγ受體之多肽、人類血清白蛋白或結合至具有經延長血清半衰期之蛋白質之多肽。在較佳實施例中，IL-2突變蛋白與IgG Fc 分子融合。

IL-2突變蛋白可與IgG Fc區之N端或C端融合。如該等實例中所顯示，與IgG Fc區之C端之融合維持IL-2突變蛋白活性之程度大於當與IgG Fc之N端融合時。

本發明之一實施例係關於藉由使IL-2突變蛋白與抗體之Fc區融合所產生之包含兩個Fc融合多肽之二聚體。二聚體可藉由(例如)以下方式來製備：將編碼融合蛋白之融合基因插入適當表現載體中，在經重組表現載體轉型之宿主細胞中表現該融合基因，並使得可以非常類似抗體分子之方式裝配所表現融合蛋白，隨後在Fc部分之間形成鏈間鍵以產生二聚體。

本文所用術語「Fc多肽」或「Fc區」包括衍生自抗體Fc區之多肽的天然及突變蛋白形式。亦包括該等多肽之含有鉸鏈區的截短形式，其可促進二聚作用。在某些實施例中，Fc區包含抗體CH2及CH3結構域。連同經延長半衰期，包含Fc部分(及自其形成之寡聚物)之融合蛋白提供可在蛋白質A或蛋白質G管柱上藉由親和層析容易純化的優勢。較佳Fc區係衍生自人類IgG，人類IgG包括IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。在本文中，Fc內之具體殘基係藉由位置來識別。所有Fc位置係基於EU編碼方案。

抗體之Fc部分之一功能係當該抗體結合其標靶時與免疫系統溝

通。此被視為「效應子功能」。溝通導致抗體依賴性細胞細胞毒性(ADCC)、抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)。ADCC及ADCP係藉助Fc與免疫系統之細胞表面上之Fc受體之結合來介導。CDC係藉助Fc與補體系統之蛋白質(例如C1q)之結合來介導。

IgG亞類在其介導效應子功能之能力方面有所不同。例如，在介導ADCC及CDC方面IgG1比IgG2及IgG4優越得多。因此，在其中效應子功能為不期望之實施例中，IgG2 Fc可為較佳。然而，已知與含IgG1 Fc分子相比，含IgG2 Fc分子較難以製造並具有較不具吸引力之生物物理性質(例如較短半衰期)。

抗體之效應子功能可藉由將一或多個突變引入Fc中來增加或降低。本發明之實施例包括具有經改造以增加效應子功能之Fc之IL-2突變蛋白Fc融合蛋白(U.S. 7,317,091及Strohl, *Curr. Opin. Biotech.*, 20:685-691, 2009；其二者均以引用方式全文併入本文中)。具有經增加效應子功能之實例性IgG1 Fc分子包括具有以下取代之彼等：

S239D/I332E

S239D/A330S/I332E

S239D/A330L/I332E

S298A/D333A/K334A

P247I/A339D

P247I/A339Q

D280H/K290S

D280H/K290S/S298D

D280H/K290S/S298V

F243L/R292P/Y300L

F243L/R292P/Y300L/P396L

F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L

G236A/S239D/I332E

K326A/E333A

K326W/E333S

K290E/S298G/T299A

K290N/S298G/T299A

K290E/S298G/T299A/K326E

K290N/S298G/T299A/K326E

增加含IgG Fc蛋白質之效應子功能之另一方法係藉由減少Fc之岩藻糖基化。自附接至Fc之雙天線錯合物型寡糖去除核心岩藻糖極大增加ADCC效應子功能而不改變抗原結合或CDC效應子功能。已知若干減少或廢止含Fc分子(例如抗體)之岩藻糖基化之方式。該等包括在某些哺乳動物細胞系中之重組表現，該等哺乳動物細胞系包括FUT8基因剔除細胞系、變體CHO細胞系Lec13、大鼠融合瘤細胞系YB2/0、包含特異性針對FUT8基因之小干擾RNA之細胞系及共表現β-1,4-*N*-乙醯基葡萄糖胺基轉移酶III及高爾基體α-甘露糖苷酶II (Golgi α-mannosidase II)之細胞系。另一選擇為，含Fc分子可在非哺乳動物細胞(例如植物細胞、酵母菌或原核細胞(例如大腸桿菌))中表現。

在本發明之較佳實施例中，IL-2突變蛋白Fc融合蛋白包含經改造以降低效應子功能之Fc。具有降低之效應子功能之實例性Fc分子包括

具有以下取代之彼等：

N297A或N297Q (IgG1)

L234A/L235A (IgG1)

V234A/G237A (IgG2)

L235A/G237A/E318A (IgG4)

H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)

C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)

C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)

L234F/L235E/P331S (IgG1)

S267E/L328F (IgG1)

已知人類IgG1在N297處(EU編碼系統)具有糖基化位點且糖基化有助於IgG1抗體之效應子功能。實例性IgG1序列係於SEQ ID NO:3中提供。基團具有經突變N297試圖製備無糖基化抗體。該等突變集中於用生理化學性質類似於天冬醯胺之胺基酸(例如)麩醯胺酸(N297Q)或用模擬不具有極性基團之天冬醯胺之丙胺酸(N297A)取代N297。

本文中所用「無糖基化抗體」或「糖基化fc」係指Fc之297位處殘基之糖基化狀態。抗體或其他分子在一或多個其他位置處可含有糖基化，但仍可視為無糖基化抗體或無糖基化Fc融合蛋白。

在製備無效應子功能IgG1 Fc之努力中，發現人類IgG1之胺基酸N297突變成甘胺酸(即N297G)提供相比於比殘基之其他胺基酸取代優越得多之純化效率及生物物理性質。參見實例8。因此，在較佳實施例中，IL-2突變蛋白Fc融合蛋白包含具有N297G取代之人類IgG1 Fc。包含N297G取代之Fc可用於任何其中分子包含人類IgG1 Fc之上下文

中，且不限於用於IL-2突變蛋白Fc融合物之上下文中。在某些實施例中，抗體包含具有N297G取代之Fc。

包含具有N297G突變之人類IgG1 Fc之Fc亦可包含其他插入、缺失及取代。在某些實施例中，人類IgG1 Fc包含N297G取代且與SEQ ID NO:3中所闡述之胺基酸序列具有至少90%一致性、至少91%一致性、至少92%一致性、至少93%一致性、至少94%一致性、至少95%一致性、至少96%一致性、至少97%一致性、至少98%一致性或至少99%一致性。在尤佳實施例中，C端離胺酸殘基係經取代或缺失。包含N297G取代及C端離胺酸之缺失之人類IgG1之胺基酸序列係於SEQ ID NO:4中闡述。

顯示糖基化之含IgG1 Fc分子之穩定性不如糖基化之含IgG1 Fc分子。Fc區可進一步經改造以增加無糖基化分子之穩定性。在一些實施例中，一或多個胺基酸係取代為半胱胺酸以形成二硫鍵呈二聚體狀態。SEQ ID NO:3中所闡述之胺基酸序列之殘基V259、A287、R292、V302、L306、V323或I332可經半胱胺酸取代。在較佳實施例中，具體殘基對係經取代以使得其優先彼此形成二硫鍵，從而限制或防止二硫鍵錯配(scrambling)。較佳對包括(但不限於) A287C及L306C、V259C及L306C、R292C及V302C以及V323C及I332C。

本文中提供其中殘基V259、A287、R292、V302、L306、V323或I332中之一或多者係經半胱胺酸取代之含Fc分子。較佳含Fc分子包括包含A287C及L306C、V259C及L306C、R292C及V302C或V323C及I332C取代之彼等。

可對IgG1 Fc進行之額外突變包括有助於在含Fc多肽中形成異源

二聚體之彼等。在一些實施例中，Fc區正改造以產生當在細胞中共表現時有助於兩個不同含Fc多肽鏈之異源二聚體形成之「凸起」及「孔洞」。U.S. 7,695,963。在其他實施例中，Fc區係經改變以當在細胞中共表現時使用靜電牽引促進異源二聚體形成而阻礙兩個不同含Fc多肽之同源二聚體形成。WO 09/089,004，其以引用方式全文併入本文中。較佳異源二聚體Fc包括其中Fc之一鏈包含D399K及E356K取代且Fc之另一鏈包含K409D及K392D取代之彼等。在其他實施例中，Fc之一鏈包含D399K、E356K及E357K取代且Fc之另一鏈包含K409D、K392D及K370D取代。

在某些實施例中，IL-2突變蛋白Fc融合蛋白可有利地為單體的，即僅含有單一IL-2突變蛋白分子。在該等實施例中，融合蛋白之Fc區可含有一或多個有助於異源二聚體形成之突變。融合蛋白與具有交互式突變之Fc區共表現成呈IL-2突變蛋白Fc融合多肽形式之彼等但缺乏IL-2突變蛋白。當兩個含Fc多肽形成異源二聚體時，所得蛋白質僅包含單一IL-2突變蛋白。

產生單體IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之另一方法係使IL-2突變蛋白與單體Fc (即不二聚體化之Fc區)融合。穩定單體Fc包含阻礙二聚體化並穩定單體形式之分子之突變。較佳單體Fc係揭示於WO 2011/063348中，其以引用方式全文併入本文中。在某些實施例中，IL-2突變蛋白Fc融合蛋白含有包含於392位及409位之帶負電荷之胺基酸以及於Y349、L351、L368、V397、L398、F405或Y407處之蘇胺酸取代的Fc。

在某些實施例中，IL-2突變蛋白Fc融合蛋白包含介於Fc與IL-2突

變蛋白之間之連接體。許多不同連接體多肽為本技術領域內所已知，且可用於IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之上下文中。在較佳實施例中，IL-2突變蛋白Fc融合蛋白在Fc與IL-2突變蛋白之間包含一或多個由GGGGS (SEQ ID NO:5)、GGNGT (SEQ ID NO: 6)或YGNGT (SEQ ID NO: 7)組成之肽之拷貝。在一些實施例中，介於Fc區與IL-2突變蛋白區之間之多肽區包含GGGGS (SEQ ID NO: 5)、GGNGT (SEQ ID NO: 6)或YGNGT (SEQ ID NO: 7)之單一拷貝。如本文中所顯示，連接體GGNGT (SEQ ID NO: 6)或YGNGT (SEQ ID NO: 7)當在適當細胞中表現時經糖基化且該糖基化可有助於穩定呈溶液形式及/或當活體內投與時之蛋白質。因此，在某些實施例中，IL-2突變蛋白融合蛋白包含介於Fc區與IL-2突變蛋白區之間之糖基化連接體。

預期糖基化之連接體當置於多肽之上下文中時可係有用的。本文中提供包含插入至多肽之胺基酸序列中之GGNGT (SEQ ID NO: 6)或YGNGT (SEQ ID NO: 7)或置換多肽之胺基酸序列內之一或多個胺基酸之多肽。在較佳實施例中，GGNGT (SEQ ID NO: 6)或YGNGT (SEQ ID NO: 7)係插入至多肽三級結構之環中。在其他實施例中，環之一或多個胺基酸係經GGNGT (SEQ ID NO: 6)或YGNGT (SEQ ID NO: 7)置換。

Fc之C端部分及/或IL-2突變蛋白之胺基端部分可含有一或多個當在哺乳動物細胞中表現時改變IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之糖基化特性之突變。在某些實施例中，IL-2突變蛋白進一步包含T3取代，例如T3N或T3A。IL-2突變蛋白可進一步包含S5取代，例如S5T。

IL-2突變蛋白及IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之共價修飾包括於本發

明之範圍內，且通常(但不總是)在轉譯後進行。例如，藉由使IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之特異性胺基酸殘基與能夠與選定側鏈或N-或C端殘基反應之有機衍生劑反應將IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之共價修飾之若干類型引入分子中。

使最常用半胱胺醯基殘基與α-鹵代乙酸鹽(及相應胺，例如氯乙酸或氯乙醯胺)反應，從而得到羧甲基或羧基醯胺基甲基衍生物。半胱胺醯基殘基亦係藉由與溴三氟丙酮、α-溴-β-(5-咪唑基)丙酸、磷酸氯乙醯酯、N-烷基馬來醯亞胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基2-吡啶基二硫化物、對氯汞基苯甲酸鹽、2-氯汞基-4-硝基苯酚或氯-7-硝基苯并-2-氧雜-1,3-二唑反應來衍生。

組胺醯基殘基係藉由與焦碳酸二乙酯在pH 5.5至7.0下反應來衍生，此乃因此試劑對於組胺醯基側鏈具有相對特異性。亦可用對溴苯甲醯基溴甲烷；較佳在0.1 M二甲次胂酸鈉中在pH 6.0下實施該反應。

使離胺醯基及胺基端殘基與琥珀酸或其他羧酸酸酐反應。利用該等試劑之衍生具有反轉離胺醯基殘基之電荷之效應。衍生含有α-胺基之殘基之其他適宜試劑包括亞胺酸酯，例如甲基吡啶亞胺甲酯；磷酸吡哆醛；吡哆醛；硼氫化氯；三硝基苯磺酸；O-甲基異脲；2,4-戊二酮；及利用乙醛酸鹽之轉胺酶催化反應。

精胺醯基殘基係藉由利用一或若干種習用試劑(其中苯基乙二醛、2,3-丁二酮、1,2-環己二酮及茚三酮)反應來改質。精胺酸殘基之衍生由於胍官能團之高pK_a而需要在鹼性條件下實施該反應。此外，該等試劑可與離胺酸之基團以及精胺酸ε-胺基反應。

可進行酪胺醯基殘基之特異性修飾，特別感興趣的為藉由與芳香族重氮化合物或四硝基甲烷反應來將光譜標記引入酪胺醯基殘基中。最通常地，使用N-乙醯基咪唑及四硝基甲烷分別形成O-乙醯基酪胺醯基物質及3-硝基衍生物。使用^{125}I或^{131}I使酪胺醯基殘基碘化以製備經標記蛋白質以用於放射性免疫分析，上文所闡述之氯胺T方法係適宜的。

羧基側基(天冬胺醯基或麩胺醯基)係藉由與碳化二亞胺(R'—N=C=N--R')反應來選擇性改質，其中R及R'視情況為不同烷基，例如1-環己基-3-(2-嗎啉基-4-乙基)碳化二亞胺或1-乙基-3-(4-氮鎓-4,4-二甲基戊基)碳化二亞胺。此外，藉由與銨離子反應將天冬胺醯基及麩胺醯基殘基轉化成天冬醯胺醯基及麩醯胺醯基殘基。

利用雙官能劑之衍化法可用於使抗原結合蛋白與用於各種方法之水不溶性擔體基質或表面交聯。常用交聯劑包括(例如) 1,1-雙(重氮乙醯基)-2-苯基乙烷、戊二醛、N-羥基琥珀醯亞胺酯(例如，與4-疊氮水楊酸之酯)、同雙官能亞胺酸酯(包括二琥珀醯亞胺基酯，例如3,3'-二硫雙(丙酸琥珀醯亞胺基酯))及雙官能馬來醯亞胺(例如雙-N-馬來醯亞胺基-1,8-辛烷)。諸如甲基-3-[(對疊氮基苯基)二硫]丙醯亞胺酸酯等衍生劑所產生之光可激活中間體能夠在光之存在下形成交聯。另一選擇為，採用諸如溴化氰激活之碳水化合物等反應性水不溶性基質及美國專利第3,969,287號；第3,691,016號；第4,195,128號；第4,247,642號；第4,229,537號；及第4,330,440號中所闡述之反應性受質用於固定蛋白質。

經常使麩醯胺醯基及天冬醯胺醯基殘基分別去醯胺化，形成相

應麩胺醯基及天冬胺醯基殘基。另一選擇為，在弱酸條件下使該等殘基去醯胺化。該等殘基之任一形式均屬於本發明之範圍內。

其他修飾包括脯胺酸及離胺酸之羥基化，絲胺醯基或蘇胺醯基殘基之羥基之磷酸化，離胺酸、精胺酸及組胺酸側鏈之α-胺基之甲基化(T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, 第79頁至第86頁)，N端胺之乙醯基化及任何C端羧基之醯胺化。

包括於本發明之範圍中之IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之另一種共價修飾類型包括改變蛋白質之糖基化模式。如本技術領域內所知，糖基化模式可取決於蛋白質之序列(例如，特定糖基化胺基酸殘基之存在或不存在，如下文所論述)或產生該蛋白質之宿主細胞或有機體二者。下文論述特定表現系統。

多肽之糖基化通常經N-連接或O-連接。N-連接係指碳水化合物部分與天冬醯胺殘基之側鏈附接。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中X係除脯胺酸外之任何胺基酸)係碳水化合物部分體附接天冬醯胺側鏈時之酵素識別序列。因此，多肽中任一該等三肽序列之存在均可產生潛在糖基化位點。O-連接之糖基化係指N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖或木糖中一種糖類與羥基胺基酸(最常見為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸)之附接。

宜藉由改變胺基酸序列以使IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白含有一或多個上述三肽序列(對於N-連接糖基化位點)來將糖基化位點添加至IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白中。亦可藉由向起始序列中添加或改取代為一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基(對於O-連

接糖基化位點)來達成該改變。為簡便起見，較佳藉助DNA層級改變、尤其藉由使編碼標靶多肽之DNA在預選鹼基處突變以使得生成將轉譯成期望胺基酸之密碼子來改變IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白胺基酸序列。

增加IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白上之碳水化合物部分數量之另一方式係藉由糖苷與蛋白質之化學或酶促偶合。該等程序之優勢在於其不需在宿主細胞中產生對於N-及O-連接之糖基化具有糖基化能力的蛋白質。視所用偶合方式而定，可使糖附接至以下各項：(a) 精胺酸及組胺酸；(b) 游離羧基；(c) 游離巰基，例如半胱胺酸之游離巰基；(d) 游離羥基，例如絲胺酸、蘇胺酸或羥基脯胺酸之游離羥基；(e) 芳香族殘基，例如苯基丙胺酸、酪胺酸或色胺酸之芳香族殘基；或(f) 麩醯胺酸之醯胺基團。該等方法係闡述於1987年9月11日公開之WO 87/05330及Aplin及Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 第259頁至第306頁中。

起始IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白上存在之碳水化合物部分之去除可以化學方式或以酶促方式完成。化學去糖基化需要將蛋白質暴露於化合物三氟甲磺酸或等效化合物。此處理可使大部分或所有糖裂解，同時使得多肽完整，連接糖(N-乙醯基葡萄糖胺或N-乙醯基半乳糖胺)除外。化學去糖基化係闡述於Hakimuddin等人，1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52及Edge等人，1981, *Anal. Biochem.* 118:131中。可藉由使用多種內切糖苷酶及外切糖苷酶達成多肽上之碳水化合物部分的酶裂解，如由Thotakura等人，1987, *Meth. Enzymol.* 138:350所述。可藉由使用化合物衣黴素(tunicamycin)防止潛在糖基化

位點處之糖基化，如由Duskin等人，1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105所述。衣黴素阻斷蛋白質-N-糖苷連接之形成。

IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之另一共價修飾類型包含以美國專利第4,640,835號；第4,496,689號；第4,301,144號；第4,670,417號；第4,791,192號或第4,179,337號中所闡述之方式將IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白與各種非蛋白質性聚合物(包括(但不限於)各種多元醇，例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚環氧烷)連接。另外，可在IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白內之各種位置處進行胺基酸取代以有助於添加聚合物(例如PEG)。因此，本發明之實施例包括PEG化之IL-2突變蛋白及IL-2突變蛋白Fc融合蛋白。相比於非PEG化之蛋白質，該等PEG化之蛋白質可具有延長之半衰期及/或減少免疫原性。

編碼IL-2突變蛋白及IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之多核苷酸

本發明涵蓋編碼IL-2突變蛋白及IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之核酸。本發明之態樣包括編碼本文中所闡述胺基酸序列之多核苷酸變體(例如由於簡併性)。在較佳實施例中，由分離核酸編碼之多肽係IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之組份。

與本文中所闡述胺基酸序列相應之欲用作用於核酸分離之探針或引物或用於數據庫搜索之詢問序列之核苷酸序列可藉由自胺基酸序列「回譯」來獲得。可採用熟知聚合酶鏈反應(PCR)程序來分離並擴增編碼IL-2突變蛋白及IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之DNA序列。採用界定DNA片段之組合之末端之寡核苷酸作為5’及3’引物。寡核苷酸可另外含有限制性內切酶之識別位點，以有助於將所擴增之DNA片段組合

插入至表現載體中。PCR技術係闡述於Saiki等人，*Science* 239:487 (1988)；*Recombinant DNA Methodology*, Wu等人編輯，Academic Press公司，San Diego (1989), 第189頁至第196頁；及*PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis等人編輯，Academic Press公司(1990)中。

本發明之核酸分子包括呈單鏈及雙鏈形式之DNA及RNA以及相應互補序列。在自天然來源分離核酸之情形下，「分離核酸」係已與自其分離核酸之有機體之基因組中存在之毗鄰遺傳序列分離之核酸。在以酶促方式自模板或以化學方式合成之核酸(例如PCR產物、cDNA分子或寡核苷酸)之情形下，例如，應理解自該等製程得到之核酸為分離核酸。分離核酸分子係指呈單獨片段形式或作為較大核酸構築體之組份之核酸分子。在一較佳實施例中，核酸實質上不含污染性內源物質。核酸分子較佳衍生自至少分離一次之呈實質上純之形式之DNA或RNA，該DNA或RNA之數量或濃度使得能藉由標準生物化學方法(例如Sambrook等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版，Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)中所概述之彼等)鑑別、操縱及回收其組成核苷酸序列。該等序列較佳以未經通常存在於真核基因中之內部非轉譯序列或內含子間斷之開放讀碼框形式提供及/或構築。非轉譯DNA之序列可存在於開放讀碼框之5’或3’處，其中其不干擾編碼區之操縱或表現。

本發明之變體通常係藉由使用盒式或PCR誘變或其他本技術領域內所熟知之技術進行編碼IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之DNA中之核苷酸之位點特異性誘變以產生編碼該變體之DNA、且其

後在本文中所概述之細胞培養物中表現重組DNA來製備。然而，IL-2突變蛋白及IL-2突變蛋白Fc融合物可藉由使用已確定技術進行活體外合成來製備。該等變體通常呈現與天然類似物相同之定性生物活性，例如Treg擴展，但亦可選擇具有如將在下文中更充分概述之經改質特徵之變體。

如熟習此項技術者應瞭解，由於遺傳密碼之簡併性，可製得非常大量之核酸，其全部編碼本發明之IL-2突變蛋白及IL-2突變蛋白Fc融合蛋白。因此，已鑑別特定胺基酸序列，熟習此項技術者可藉由簡單地以不改變所編碼蛋白質之胺基酸序列之方式修改一或多個密碼子之序列製得任何數量之不同核酸。

本發明亦提供包含至少一個上述多核苷酸之呈質粒、表現載體、轉錄或表現盒之形式之表現系統及構築體。另外，本發明提供包含該等表現系統或構築體之宿主細胞。

通常，任一宿主細胞中所用之表現載體將含有用於質粒維護及外源核苷酸序列選殖及表現之序列。該等序列(統稱為「側接序列」)在某些實施例中通常將包括以下核苷酸序列中之一或多者：啟動子、一個或多個增強子序列、複製起始點、轉錄終止序列、含有供體及受體剪接位點之完整內含子序列、編碼用於多肽分泌之前導序列的序列、核糖體結合位點、聚腺苷酸化序列、用於插入編碼多肽之核酸以進行表現之多連接體區及選擇標記元件。下文論述該等實例中之每一者。

視情況，載體可含有「標籤」-編碼序列，即，位於IL-2突變蛋白及IL-2突變蛋白Fc融合蛋白編碼序列之5’或3’端之寡核苷酸分子；

該寡核苷酸序列編碼polyHis (例如，hexaHis (SEQ ID NO: 21))，或另一「標籤」，例如FLAG、HA (血凝素流感病毒)或*myc*，存在用於彼等之市售抗體。此標籤在多肽表現時通常與多肽融合，且可用作親和純化或檢測宿主細胞之IL-2突變蛋白的方式。例如，可藉由管柱層析使用針對作為親和性基質之標籤的抗體來完成親和純化。視情況，該標籤可隨後藉由各種方式(例如使用某些用於裂解之肽酶)自經純化之IL-2突變蛋白及IL-2突變蛋白Fc融合蛋白去除。

側接序列可為同源(即，來自與宿主細胞相同之物種及/或品系)、異源(即，來自與宿主細胞物種或品系不同之物種)、雜合(即，來自一個以上來源之側接序列的組合)、合成或天然側接序列。因此，側接序列之來源可為任一原核或真核有機體、任一脊椎動物或無脊椎動物有機體或任一植物，限制條件為該側接序列在該宿主細胞體系中起作用且可藉由該宿主細胞體系激活。

載體中有用之側接序列可藉由本技術領域內熟知之若干方法之任一者來獲得。通常，本文中有用之側接序列先前已藉由映射及/或藉由限制性內切酶消化來鑑別且因此其可使用適當限制性內切酶自適當組織來源分離。在一些情形下，可知側接序列之全核苷酸序列。在本文中，可使用用於核酸合成或選殖之本文所述方法來合成側接序列。

無論已知所有還是僅一部分側接序列，其均可使用聚合酶鏈反應(PCR)及/或藉由使用來自相同或另一物種之適宜探針(例如寡核苷酸及/或側接序列片段)篩選基因組文庫來獲得。在未知側接序列時，含有側接序列之DNA片段可自可含有(例如)編碼序列或甚至其他基因

之較大DNA片分離。可藉由限制性內切酶消化完成分離以產生適當DNA片段，之後使用瓊脂糖凝膠純化、Qiagen®管柱層析(Chatsworth, CA)或熟習此項技術者已知之其他方法實施分離。熟習此項技術者應易於瞭解用以完成此目的之適宜酶的選擇。

複製起始點通常為彼等可購得原核表現載體之一部分，且該起始點有助於載體在宿主細胞中擴增。若所選載體不含複製起始點，則其可基於已知序列以化學方式合成並接合至載體中。例如，質粒pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA)之複製起始點適於大多數革蘭氏(gram)陰性細菌且各病毒起始點(例如，SV40、多瘤病毒、腺病毒、水泡性口炎病毒(VSV)或乳頭瘤病毒，例如HPV或BPV)可用於在哺乳動物細胞中選殖載體。通常，哺乳動物表現載體不需要複製起始點組件(例如，經常使用SV40起始點，此僅因為其亦含有早期病毒啟動子之故)。

轉錄終止序列通常位於多肽編碼區之3’末端且可用於終止轉錄。通常，原核細胞之轉錄終止序列依序為富含G-C之片段及聚-T序列。儘管該序列容易地自文庫選殖或甚至作為載體之一部分購得，但其亦可使用用於核酸合成之方法(例如，本文所述之彼等)來合成。

選擇標記基因編碼在選擇性培養基中生長之宿主細胞存活及生長所需的蛋白質。典型選擇標記基因編碼如下蛋白質：(a) 賦予原核宿主細胞抗生素或其他毒素(例如，胺苄青黴素(ampicillin)、四環素或康黴素(kanamycin))抗性；(b) 補足細胞之營養缺陷型不足；或(c)供給自複合培養基或界定培養基無法獲得之關鍵營養素。特異性選擇標記係康黴素抗性基因、胺苄青黴素抗性基因及四環素抗性基因。有

利地，新黴素抗性基因亦可用於原核及真核宿主細胞中之選擇。

其他選擇基因可用於擴增欲表現之基因。擴增係產生對生長或細胞存活至關重要之蛋白質所需的基因在連續世代重組細胞之染色體內串聯重複之過程。適於哺乳動物細胞之選擇標記之實例包括二氫葉酸還原酶(DHFR)及無啟動子之胸苷激酶基因。在選擇壓力下放置哺乳動物細胞轉型體，其中僅該等轉型體藉助存於載體中之選擇基因獨特地適合於存活。藉由在其中相繼增加培養基中之選擇劑濃度之條件下培養轉型細胞來施加選擇壓力，從而導致擴增選擇基因及編碼另一基因之DNA (例如IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白)。因此，自所擴增DNA合成增加量之多肽(例如IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白)。

核糖體結合位點通常為mRNA之轉譯起始所需且其特徵為Shine-Dalgarno序列(原核生物)或Kozak序列(真核生物)。該元件通常位於啟動子之3'及欲表現之多肽之編碼序列的5'。在某些實施例中，一或多個編碼區以操作方式連接至內部核糖體結合位點(IRES)，從而允許自單一RNA轉錄物轉譯兩個開放讀碼框。

在一些情形下，例如若期望在真核宿主細胞表現系統中糖基化，則可操縱各種前序列或前導序列以改良糖基化或產率。例如，可改變特定信號肽之肽酶裂解位點，或增加前導序列，此亦可影響糖基化。最終蛋白質產物可在-1位(相對於成熟蛋白質之第一胺基酸)中具有一或多個易於表現之其他胺基酸，其可尚未經完全去除。例如，最終蛋白質產物可具有一或兩個在肽酶裂解位點中發現且附接至胺基末端之胺基酸殘基。另一選擇為，使用一些酶裂解位點可產生期望多肽

之稍微截短形式，條件係酶在成熟多肽內之該區域處切割。

本發明之表現及選殖載體通常將含有由宿主有機體識別並以操作方式連接至編碼IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之分子之啟動子。啟動子係位於控制結構基因之轉錄之結構基因起始密碼子(通常在約100 bp至1000 bp內)上游(即，5')的未轉錄序列。習慣上，將啟動子歸為如下兩類中之一類：可誘導型啟動子及組成型啟動子。可誘導型啟動子在其控制下因應培養條件之一些變化(例如，營養素存在或不存在或溫度變化)引起自DNA之轉錄程度升高。另一方面，組成型啟動子一致地轉錄與其以操作方式連接之基因，亦即，幾乎未對基因表現控制或對基因表現無控制。由多種潛在宿主細胞識別之大量啟動子已眾所周知。

適於與酵母菌宿主一起使用之啟動子亦在本技術領域內眾所周知。酵母菌增強子有利地與酵母菌啟動子一起使用。適於與哺乳動物宿主細胞一起使用之啟動子已眾所周知且包括(但不限於)自諸如以下等病毒之基因組獲得之彼等：多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(例如，腺病毒2)、牛乳頭瘤病毒、禽肉瘤病毒、細胞巨大病毒、逆轉錄病毒、肝炎B病毒且最佳猿猴病毒40 (SV40)。其他適宜哺乳動物啟動子包括異源哺乳動物啟動子，例如，熱休克啟動子及肌動蛋白啟動子。

可關注之其他啟動子包括(但不限於)：SV40早期啟動子(Benoist及Chambon，1981, *Nature* 290:304-310)；CMV啟動子(Thornsen等人，1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663)；含於勞斯肉瘤(Rous sarcoma)病毒之3'長端重複序列中的啟動子(Yamamoto等人，1980, *Cell* 22:787-797)；皰疹胸苷激酶啟動子(Wagner等人，1981, *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-1445)；金屬硫蛋白基因之啟動子及調控序列(Prinster等人，1982, *Nature* 296:39-42)；及諸如β-內醯胺酶啟動子等原核啟動子(Villa-Kamaroff等人，1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731)；或tac啟動子(DeBoer等人，1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25)。亦關注以下動物轉錄控制區，其呈現組織特異性且已用於轉基因動物中：在胰腺腺泡細胞中具有活性之彈性蛋白酶I基因控制區(Swift等人，1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz等人，, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409；MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515)；在胰腺β細胞中具有活性之胰島素基因控制區(Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122)；在淋巴細胞中具有活性之免疫球蛋白基因控制區(Grosschedl等人，1984, *Cell* 38:647-658；Adames等人，1985, *Nature* 318:533-538；Alexander等人，1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444)；在睪丸、乳房、淋巴及肥胖細胞中具有活性之小鼠乳房腫瘤病毒控制區(Leder等人，1986, *Cell* 45:485-495)；在肝中具有活性之白蛋白基因控制區(Pinkert等人，1987, *Genes and Devel.*1 :268-276)；在肝中具有活性之α-胎蛋白基因控制區(Krumlauf等人，1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648；Hammer等人，1987, *Science* 253:53-58)；在肝中具有活性之α 1-抗胰蛋白酶基因控制區(Kelsey等人，1987, *Genes and Devel.*1:161-171)；在骨髓細胞中具有活性之β-珠蛋白基因控制區(Mogram等人，1985, *Nature* 315:338-340；Kollias等人，1986, *Cell* 46:89-94)；在腦中之少突膠質細胞中具有活性之髓鞘鹼性蛋白基因控制區(Readhead等人，1987, *Cell* 48:703-712)；在骨骼肌中具有活性之肌球蛋白輕鏈-2基因控制區(Sani, 1985,

Nature 314:283-286)；及在下丘腦中具有活性之促性腺釋放激素基因控制區(Mason等人，1986, *Science* 234:1372-1378)。

可將增強子序列插入載體中以提高高等真核生物之轉錄。增強子係作用於啟動子以增加轉錄之DNA的順式作用元件，其長度通常為約10 bp至300 bp。增強子係相對不依賴定向及位置的，已發現於轉錄單元之5'及3'兩個位置處。已知可自哺乳動物基因獲得之若干增強子序列(例如，珠蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、α-胎蛋白及胰島素)。然而，通常使用來自病毒之增強子。本技術領域內已知之SV40增強子、細胞巨大病毒早期啟動子增強子、多瘤病毒增強子及腺病毒增強子係用於激活真核啟動子之實例性增強元件。儘管可將增強子定位於載體中編碼序列之5'或3'，但其通常定位於啟動子之5'位點。可將編碼適當天然或異源信號序列之序列(前導序列或信號肽)納入表現載體中以促進IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之細胞外分泌。信號肽或前導序列之選擇取決於欲產生該蛋白之宿主細胞的類型，且異源信號序列可置換天然信號序列。在哺乳動物宿主細胞中起作用之信號肽之實例包括以下：介白素-7 (IL-7)之信號序列，闡述於美國專利第4,965,195號中；介白素-2受體之信號序列，闡述於Cosman等人，1984, *Nature* 312:768中；介白素-4受體信號肽，闡述於歐洲專利第0367 566號中；I型介白素-1受體信號肽，闡述於美國專利第4,968,607號中；II型介白素-1受體信號肽，闡述於歐洲專利第0 460 846號中。

當將該載體整合至宿主細胞基因組中時，該載體可含有一或多個有助於表現之元件。實例包括EASE元件(Aldrich等人，2003 *Biotechnol Prog.* 19:1433-38)及基質結合區(matrix attachment region，

MAR)。MAR介導染色質之結構組織且可使經整合載體免於「位置」效應之影響。因此，當使用該載體產生穩定轉染子時，MAR特別有用。許多天然及合成之含有MAR之核酸為本技術領域內所知，例如美國專利第6,239,328號；第7,326,567號；第6,177,612號；第6,388,066號；第6,245,974號；第7,259,010號；第6,037,525號；第7,422,874號；第7,129,062號。

可自諸如市售載體等起始載體構築本發明之表現載體。該等載體可含有或可不含所有期望側接序列。當一或多個本文所述側接序列尚未存於載體中時，可個別地獲得側接序列並將其接合至該載體中。用於獲得每一側接序列之方法已為熟習此項技術者所熟知。

在已構築該載體且已將編碼IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之核酸分子插入該載體之適當位點中後，可將所完成載體插入適宜宿主細胞中用於擴增及/或多肽表現。可藉由熟知方法完成表現載體至選定宿主細胞中之轉型，該等方法包括轉染、感染、磷酸鈣共沈澱、電穿孔、微注射、脂轉染、DEAE-葡聚糖介導之轉染或其他已知技術。所選方法將部分地隨欲使用之宿主細胞類型變化。該等方法及其他適宜方法已為熟習此項技術者所熟知且闡述於(例如) Sambrook等人，2001 (參見上文)中。

當在適當條件下培養時，宿主細胞合成IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白，隨後可自培養基收集(若宿主細胞將其分泌至培養基中)或直接自產生其之宿主細胞收集(若不分泌其)。適當宿主細胞之選擇將取決於多種因素，例如期望表現含量、活性所期望或所需要之多肽修飾(例如糖基化或磷酸化)及摺疊成生物活性分子之容易性。宿

主細胞可為真核或原核的。

可用作用於表現之宿主之哺乳動物細胞系為本技術領域內所熟知且包括(但不限於)自美國菌種保存中心(ATCC)獲得之永生細胞系，且本技術領域內已知之表現系統中所用之任何細胞系可用於製備本發明之重組多肽。通常，利用包含編碼期望IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合物之DNA之重組表現載體使宿主細胞轉型。可採用之宿主細胞尤其為原核生物、酵母菌或高等真核細胞。原核生物包括革蘭氏陰性或革蘭氏陽性有機體，例如大腸桿菌或桿菌屬(bacilli)。高等真核細胞包括昆蟲細胞及哺乳動物來源之確定細胞系。適宜哺乳動物宿主細胞系之實例包括猴腎細胞COS-7細胞系(ATCC CRL 1651) (Gluzman等人，1981, Cell 23:175)、L細胞、293細胞、C127細胞、3T3細胞(ATCC CCL 163)、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或其衍生物(例如Veggie CHO及生長於無血清培養基中之相關細胞系) (Rasmussen等人，1998, *Cytotechnology* 28: 31)、HeLa細胞、BHK (ATCC CRL 10)細胞系及衍生自非洲綠猴腎細胞系CVI之CVI/EBNA細胞系(ATCC CCL 70) (如McMahan等人，1991, EMBO J. 10: 2821所闡述)、人類胎腎細胞(例如293、293 EBNA或MSR 293)、人類表皮A431細胞、人類Colo205細胞、其他轉型靈長類細胞系、正常二倍體細胞、衍生自原代組織之活體外培養之細胞品系、原代外植體、HL-60、U937、HaK或Jurkat細胞。視情況，當期望在各種信號轉導或報告因子分析中使用多肽時，可使用諸如 (例如) HepG2/3B、KB、NIH 3T3或S49等哺乳動物細胞系用於多肽表現。

另一選擇為，可在諸如酵母菌等低等真核生物中或在諸如細菌

等原核生物中產生多肽。適宜酵母菌包括釀酒酵母菌(Saccharomyces cerevisiae)、粟酒裂殖酵母菌(Schizosaccharomyces pombe)、克魯維酵母菌株(Kluyveromyces strains)、假絲酵母菌屬(Candida)或任何能夠表現異源多肽之酵母菌株。適宜細菌菌株包括大腸桿菌、枯草芽孢桿菌(Bacillus subtilis)、鼠傷寒沙門氏菌(Salmonella typhimurium)或任何能夠表現異源多肽之細菌菌株。若在酵母菌或細菌中製備該多肽，則可期望藉由(例如)適當位點之磷酸化或糖基化改質其中所產生之多肽，以獲得功能性多肽。該等共價附接可使用已知化學或酶促方法來完成。

該多肽亦可將本發明之分離核酸與一或多個昆蟲表現載體中之適宜控制序列以操作方式連接並採用昆蟲表現系統來產生。用於桿狀病毒/昆蟲細胞表現系統之材料及方法係以套組形式自(例如) Invitrogen, San Diego, Calif., U.S.A. (MaxBac®套組)購得，且該等方法為本技術領域內所熟知，如Summers及Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin第1555號(1987)及Luckow及Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988)中所闡述。亦可採用無細胞轉譯系統並使用衍生自本文所揭示核酸構築體之RNA產生多肽。與細菌、真菌、酵母菌及哺乳動物細胞宿主一起使用之適當選殖及表現載體係由Pouwels等人，(*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985)闡述。包含較佳以操作方式連接至至少一個表現控制序列之本發明分離核酸之宿主細胞係「重組宿主細胞」。

在某些態樣中，本發明包括編碼如下人類IL-2突變蛋白之分離核酸：其優先刺激T調節細胞，並包含V91K取代及與SEQ ID NO:1中所

闡述之胺基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%一致性之胺基酸序列。分離核酸可編碼本文所提供之任何實例性IL-2突變蛋白。

亦包括編碼本文所述之任何實例性IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之分離核酸。在較佳實施例中，抗體之Fc部分及人類IL-2突變蛋白係在單一開放讀碼框中編碼，視情況在Fc區與IL-2突變蛋白之間編碼連接體。

在另一態樣中，本文中提供包含以操作方式連接至啟動子之以上IL-2突變蛋白-或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白-編碼核酸之表現載體。

在另一態樣中，本文中提供包含編碼以上IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之分離核酸之宿主細胞。該宿主細胞可為原核細胞(例如大腸桿菌)，或可為真核細胞(例如哺乳動物細胞)。在某些實施例中，該宿主細胞為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞系。

在另一態樣中，本文中提供製備人類IL-2突變蛋白之方法。該等方法包含在其中表現以操作方式連接至人類IL-2突變蛋白之啟動子之條件下培養宿主細胞。隨後，自該培養物收穫人類IL-2突變蛋白。可自培養基及/或宿主細胞溶解物收穫IL-2突變蛋白。

在另一態樣中，本文中提供製備人類IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之方法。該等方法包含在其中表現以操作方式連接至人類IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之啟動子之條件下培養宿主細胞。隨後，自該培養物收穫人類IL-2突變蛋白Fc融合蛋白。可自培養基及/或宿主細胞溶解物收穫人類IL-2突變蛋白Fc融合蛋白。

醫藥組合物

在一些實施例中，本發明提供包含治療有效量之IL-2突變蛋白以及醫藥上有效之稀釋劑、載劑、增溶劑、乳化劑、防腐劑及/或佐劑之醫藥組合物。在某些實施例中，IL-2突變蛋白屬於IL-2突變蛋白Fc融合蛋白之上下文中。本發明之醫藥組合物包括(但不限於)液體、冷凍及凍乾組合物。

較佳地，調配材料在所用劑量及濃度下對接受者無毒性。在具體實施例中，提供包含治療有效量之含有IL-2突變蛋白之治療分子(例如IL-2突變蛋白Fc融合物)之醫藥組合物。

在某些實施例中，醫藥組合物可含有用於改變、維持或保留(例如)組合物之pH、滲透性、黏度、澄清度、顏色、等滲性、氣味、無菌性、穩定性、溶解或釋放速率、吸收或滲透速率之調配材料。在該等實施例中，適宜調配材料包括(但不限於)胺基酸(例如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、精胺酸、脯胺酸或離胺酸)；抗微生物劑；抗氧化劑(例如抗壞血酸、亞硫酸鈉或亞硫酸氫鈉)；緩衝液(例如硼酸鹽、碳酸氫鹽、Tris-HCl、檸檬酸鹽、磷酸鹽或其他有機酸)；增積劑(例如甘露醇或甘胺酸)；螯合劑(例如乙二胺四乙酸(EDTA))；錯合劑(例如咖啡因(caffeine)、聚乙烯吡咯啶酮、β-環糊精或羥丙基-β-環糊精)；填充劑；單糖；二糖；及其他碳水化合物(例如葡萄糖、甘露糖或糊精)；蛋白質(例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白)；著色劑、矯味劑及稀釋劑；乳化劑；親水聚合物(例如聚乙烯吡咯啶酮)；低分子量多肽；鹽形成抗衡離子(例如鈉)；防腐劑(例如氯化苄烷銨、苯甲酸、水楊酸、硫柳汞(thimerosal)、苯乙醇、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲

酸丙酯、二葡萄糖氯己定(chlorhexidine)、山梨酸或過氧化氫)；溶劑(例如甘油、丙二醇或聚乙二醇)；糖醇(例如甘露醇或山梨醇)；懸浮劑；表面活性劑或潤濕劑(例如普朗尼克(pluronic)、PEG、山梨醇酐酯、聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯)、triton、胺丁三醇、卵磷脂、膽固醇、泰洛沙泊(tyloxapol))；穩定性增強劑(例如蔗糖或山梨醇)；張力增強劑(例如鹼金屬鹵化物，較佳氯化鈉或氯化鉀、甘露醇、山梨醇)；遞送媒劑；稀釋劑；賦形劑及/或醫藥佐劑。參見REMINGTON’S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第18版, (A. R. Genrmo編輯), 1990, Mack Publishing公司。

在某些實施例中，最佳醫藥組合物可由熟習此項技術者根據(例如)預期投與途徑、遞送模式及期望劑量來確定。例如參見REMINGTON’S PHARMACEUTICAL SCIENCES (參見上文)。在某些實施例中，該等組合物可影響本發明抗原結合蛋白之物理狀態、穩定性、活體內釋放速率及活體內清除速率。在某些實施例中，醫藥組合物中之主要媒劑或載劑可在性質上為水性或非水性。例如，適宜媒劑或載劑可為注射用水、生理鹽水溶液或人工腦脊髓液，其可能補充有非經腸投與用組合物中常見之其他材料。中性緩衝鹽水或與血清白蛋白混合之鹽水係其他實例性媒劑。在具體實施例中，醫藥組合物包含pH為約7.0至8.5之Tris緩衝液、或pH為約4.0至5.5之乙酸鹽緩衝液，且可進一步包括山梨醇或其適宜取代物。在本發明之某些實施例中，Il-2突變蛋白組合物可藉由將具有期望純度之所選組合物與可選調配劑(REMINGTON’S PHARMACEUTICAL SCIENCES，參見上文)混合呈凍乾餅或水溶液之形式來製備以供儲存。此外，在某些實施例中，

IL-2突變蛋白產物可使用適當賦形劑(例如蔗糖)調配為凍乾產物。

本發明之醫藥組合物可經選擇用於非經腸遞送。另一選擇為，該等組合物可經選擇用於吸入或用於藉助消化道遞送，例如經口遞送。該等醫藥上可接受之組合物之製備為熟習此項技術者所熟知。調配物組份較佳以投與部位可接受之濃度存在。在某些實施例中，緩衝液係用於將組合物維持於生理pH或稍微較低pH下，通常維持在約5至約8之pH範圍內。

當預期非經腸投與時，可以無致熱原之非經腸可接受之水溶液形式提供用於本發明之治療組合物，其包含存於醫藥上可接受媒劑中之期望IL-2突變蛋白。尤其適宜之非經腸注射用媒劑係無菌蒸餾水，其中將IL-2突變蛋白組合物調配為無菌等滲溶液，並適當保存。在某些實施例中，製備可涉及調配期望分子與可使產物受控釋放或持續釋放之試劑，例如可注射微球體、生物蝕解粒子、聚合化合物(例如聚乳酸或聚乙醇酸)、珠粒或脂質體，該產物可經由儲積注射來遞送。在某些實施例中，亦可使用透明質酸，其可具有延長在循環中之持續時間的效應。在某些實施例中，可使用可植入藥物遞送裝置引入IL-2突變蛋白組合物。

熟悉此項技術者將明瞭額外醫藥組合物，包括涉及IL-2突變蛋白組合物之呈持續遞送或受控遞送調配物之調配物。調配多種其他持續遞送或受控遞送形式(例如脂質體載劑、生物蝕解微粒或多孔珠粒及儲積注射劑)之技術亦為熟習此項技術者所知。例如，參見國際專利申請案第PCT/US93/00829號，其以引用方式併入本文中並闡述用於遞送醫藥組合物之多孔聚合物微粒之受控釋放。持續釋放製劑可包括

半滲透性聚合物基質，其呈成形物件形式，例如膜或微膠囊。持續釋放基質可包括聚酯、水凝膠、聚交酯(如美國專利第3,773,919號及歐洲專利申請公開案第EP 058481號所揭示，其各自以引用方式併入本文中)、L-麩胺酸與γ-L-麩胺酸乙酯之共聚物(Sidman等人，1983, Biopolymers 2:547-556)、聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯) (Langer等人，1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277及Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105)、乙烯乙酸乙烯酯(Langer等人，1981，參見上文)或聚-D(-)-3-羥丁酸(歐洲專利申請公開案第EP 133,988號)。持續釋放組合物亦可包括可藉由本技術領域內已知若干種方法中之任一者製備之脂質體。例如，參見Eppstein等人，1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692；歐洲專利申請公開案第EP 036,676號；第EP 088,046號及第EP 143,949號，其以引用方式併入本文中。

用於活體內投與之醫藥組合物通常係以無菌製劑形式來提供。可藉由經無菌濾膜過濾來實施滅菌。當組合物經凍乾時，使用此方法之滅菌可在凍乾及重構之前或之後實施。非經腸投與用組合物可以凍乾形式或溶液形式儲存。通常將非經腸組合物置入具有無菌存取埠之容器中，例如靜脈注射溶液袋或具有可藉由皮下注射針頭刺入之塞子之小瓶。

本發明之態樣包括自緩衝IL-2突變蛋白調配物，其可用作醫藥組合物，如國際專利申請案WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599)中所闡述，其以引用方式全文併入本文中。

如上文所論述，某些實施例提供IL-2突變蛋白組合物、特定而言醫藥IL-2突變蛋白Fc融合蛋白，其除IL-2突變蛋白組合物以外包含一

或多種賦形劑(例如此部分及本文其他地方說明性闡述之彼等)。就此而言，賦形劑可用於本發明中用於多種目的，例如調整調配物之物理、化學或生物性質(例如調整黏度)及/或本發明製程，以改良有效性，及/或穩定該等調配物及製程，以抵抗因(例如)在製造、輸送、儲存、使用前之準備、投與期間及其後存在之應力而發生之降解及腐敗。

可獲得多種關於就此而言有用之蛋白質穩定及調配材料及方法之說明，例如Arakawa等人，「Solvent interactions in pharmaceutical formulations,」Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick等人，「Physical stabilization of proteins in aqueous solution,」於：RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter及Manning編輯，Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002)及Randolph等人，「Surfactant-protein interactions,」 Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002)，其各自以引用方式全文併入本文中，以特定而言與本發明之自緩衝蛋白質調配物之賦形劑及其製程有關之部分、尤其關於用於獸醫及/或人類醫學用途之蛋白質醫藥產物及製程之部分併入本文中。

可依照本發明之某些實施例使用鹽以(例如)調整調配物之離子強度及/或等滲性及/或改良蛋白質或本發明組合物之其他成份之溶解性及/或物理穩定性。

眾所周知，離子可藉由結合至蛋白質表面上之帶電荷殘基並藉由屏蔽蛋白質中之帶電荷且具極性基團並減小其靜電相互作用、吸引及排斥相互作用之強度來穩定蛋白質之自然狀態。離子亦可藉由結合

至(特定而言)蛋白質之變性肽連接(--CONH)來穩定蛋白質之變性狀態。此外，與蛋白質中之帶電荷且具極性基團之離子相互作用亦可減小分子間靜電相互作用且從而防止或減少蛋白質聚集及不溶性。

離子物質對蛋白質之效應顯著不同。已研發可用於調配本發明之醫藥組合物之許多分類等級之離子及其對蛋白質之效應。一實例係Hofmeister系列，其依據離子溶質及極性非離子溶質對蛋白質在溶液中之構象穩定性之效應將其分級。穩定性溶質係稱為「親液的(kosmotropic)」。去穩定性溶質係稱為「離液的(chaotropic)」。親液劑(Kosmotrope)常以高濃度(例如>1莫耳濃度硫酸銨)用於以使蛋白質自溶液沈澱(「鹽析」)。離液劑(Chaotrope)常用於使蛋白質變形及/或溶解(「鹽溶」)。離子「鹽溶」及「鹽析」之之相對有效性界定其在Hofmeister系列中之位置。

游離胺基酸可依照本發明之各種實施例用於IL-2突變蛋白調配物中作為增積劑、穩定劑及抗氧化劑以及其他標準用途。離胺酸、脯胺酸、絲胺酸及丙胺酸可用於穩定調配物中之蛋白質。甘胺酸可用於凍乾以確保正確餅結構及性質。精胺酸可用於抑制在液體及凍乾調配物二者中之蛋白質聚集。甲硫胺酸可用作抗氧化劑。

多元醇包括糖(例如甘露醇、蔗糖及山梨醇)及多羥基醇(例如甘油及丙二醇)及出於本文論述之目的聚乙二醇(PEG)及相關物質。多元醇係親液的。其為在液體及凍乾調配物二者中用於保護蛋白質免於物理及化學降解製程之穩定劑。多元醇亦可用於調整調配物之張力。

本發明之選擇實施例中有用之多元醇尤其為甘露醇，其常用於確保呈凍乾調配物之餅之結構穩定性。其確保餅之結構穩定性。其通

常與凍乾保護劑(例如蔗糖)一起使用。山梨醇及蔗糖係用於調整張力及用作穩定劑以在運輸期間抵抗冷凍-解凍應力或在製程期間製備散料之較佳試劑。還原糖(其含有游離醛或酮基團，例如葡萄糖及乳糖)可糖化表面離胺酸及精胺酸殘基。因此，其通常不屬於一塊找本發明使用之較佳多元醇。另外，就此而言在酸性條件下水解成果糖及葡萄糖且由此導致附糖化之形成該等反應性物質之糖(例如蔗糖)亦不屬於本發明之較佳多元醇。PEG可用於穩定蛋白質並用作低溫保護劑且就此而言可用於本發明。

IL-2突變蛋白調配物之實施例進一步包含表面活性劑。蛋白質分子可易於吸附於表面上並易於變性及由此在氣體-液體、固體-液體及液體-液體界面處聚集。該等效應通常與蛋白質濃度成反比。該等有害相互作用通常與蛋白質濃度成反比且通常因物理攪動(例如在產物輸送及處置期間所產生之攪動)而加劇。

表面活性劑常規地用於防止、最小化或減少表面吸附。就此而言本發明之有用表面活性劑包括聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、山梨醇酐聚乙氧基化物之其他脂肪酸酯及泊洛沙姆188 (poloxamer 188)。

表面活性劑亦常用於控制蛋白質構象穩定性。就此而言表面活性劑之用途具有蛋白質特異性，此乃因任何給定表面活性劑通常將穩定一些蛋白質並使其他蛋白質去穩定。

聚山梨醇酯易於氧化降解且經常以供應狀態含有足以使蛋白質殘基側鏈(尤其甲硫胺酸)氧化之量之過氧化物。因此，聚山梨醇酯應小心使用，且當使用時應以其最低有效濃度使用。就此而言，聚山梨醇酯例示賦形劑應以其最低有效濃度使用之一般規則。

IL-2突變蛋白調配物之實施例進一步包含一或多種抗氧化劑。在一定程度上，可藉由維持適當程度之環境氧氣及溫度並藉由避免暴露於光下來防止醫藥調配物中蛋白質之有害氧化。抗氧化劑賦形劑亦可用於防止蛋白質氧化降解。就此而言有用抗氧化劑尤其為還原劑、氧/自由基捕獲劑及螯合劑。用於本發明之治療蛋白質調配物之抗氧化劑較佳為水溶性的並在產品之整個存架壽命期間維持其活性。就此而言EDTA係本發明之較佳抗氧化劑。

抗氧化劑可損害蛋白質。例如，諸如谷胱甘肽等還原劑尤其可破壞分子內二硫化物鏈接。因此，用於本發明之抗氧化劑係經選擇以尤其消除或充分降低自身損害調配物中之蛋白質之可能性。

本發明之調配物可包括為蛋白質輔助因子且為形成蛋白質配位錯合物所必需之金屬離子，例如形成某些胰島素懸浮液所必需之鋅。金屬離子亦可抑制一些降解蛋白質之製程。然而，金屬離子亦催化降解蛋白質之物理及化學製程。

鎂離子(10 mM至120 mM)可用於抑制天冬胺酸至異天冬胺酸之異構化。Ca^{+2}離子(最多100 mM)可增加人類去氧核糖核酸酶之穩定性。然而，Mg^{+2}、Mn^{+2}及Zn^{+2}可使rhDNA酶去穩定。類似地，Ca^{+2}及Sr^{+2}可穩定因子VIII，其可因Mg^{+2}、Mn^{+2}及Zn^{+2}、Cu^{+2}及Fe^{+2}而去穩定，且其聚集可因Al^{+3}離子而增加。

IL-2突變蛋白調配物之實施例進一步包含一或多種防腐劑。當研發涉及自同一容器提取一次以上之多劑量非經腸調配物時，防腐劑係必需的。其主要作用係抑制微生物生長並在藥物產物之存架壽命或使用期限期間確保產物無菌性。常用防腐劑包括苯甲醇、苯酚及間甲

酚。儘管防腐劑具有較長之與小分子非經腸劑一起使用之歷史，但包括防腐劑之蛋白質調配物之研發可具挑戰性。防腐劑對蛋白質幾乎總是具有去穩定效應(聚集)，且此已變成限制其在多劑量蛋白質調配物中之使用之主要因素。迄今，大多數蛋白質藥物已經調配僅用於一次性使用。然而，當多劑量調配物成為可能時，其具有方便患者及提高可銷售性之額外優勢。良好實例係人類生長激素(hGH)之多劑量調配物，其中保存調配物之研發已導致更便利之多次使用注射筆呈遞之商業化。目前市場上可獲得至少四種含有hGH之保存調配物之此種筆裝置。Norditropin (液體，Novo Nordisk)、Nutropin AQ (液體，Genentech)及Genotropin (凍乾--雙室筒，Pharmacia & Upjohn)含有苯酚，而Somatrope (Eli Lilly)係利用間甲酚調配。

在一實施例中，IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白之Fc融合物(例如，Fc.IL-2(V91K)或Fc.IL-2(N88D))係在10 mM L-麩胺酸、3.0% (w/v) L-脯胺酸中調配至10 mg/mL達pH 5.2。在另一實施例中，IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白之Fc融合物(例如，Fc.IL-2(V91K)或Fc.IL-2(N88D))係在10 mM KPi、161 mM L-精胺酸中調配達pH 7.6。

在保存劑型之調配及研發期間需要考慮若干態樣。藥物產物中之有效防腐劑濃度必須最佳化。此需要在該劑型中以賦予抗微生物有效性而不會使蛋白質穩定性受損之濃度範圍測試給定防腐劑。

在另一態樣中，本發明提供呈凍乾調配物之IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白之Fc融合物。冷凍乾燥產物可在不存在防腐劑之情況下凍乾並在使用時利用含有稀釋劑之防腐劑重構。此縮短防腐劑與蛋白質接觸之時間，從而使相關穩定性風險顯著最小化。在液體調配物情況

下，應在整個產品存架壽命(約18個月至24個月)內維持防腐劑有效性及穩定性。需要注意之很重要的一點係應在含有活性藥物及所有賦形劑組份之最終調配物中展示防腐劑有效性。

IL-2突變蛋白調配物通常將針對(尤其)具體投與途徑及方法、具體投與劑量及投與頻率、具體疾病之具體治療、利用生物可用度及持久性之範圍來設計。從而可依照本發明設計調配物用於藉由任何適宜途徑(包括(但不限於)經口、經耳、經眼部、經直腸及經陰道及藉由非經腸途徑(包括靜脈內及動脈內注射，肌內注射及皮下注射))遞送。

在已調配醫藥組合物後，可將其以溶液、懸浮液、凝膠、乳液、固體、晶體形式或以脫水或凍乾粉末形式儲存於無菌小瓶中。可將該等調配物以即用形式或以在投與之前重構之形式(例如，凍乾)儲存。本發明亦提供產生單一劑量投與單位之套組。本發明之套組可各自含有具有乾燥蛋白質之第一容器及具有水性調配物之第二容器二者。在本發明之某些實施例中，提供含有單室及多室預填充注射器(例如，液體注射器及凍乾劑注射器(lyosyringe))之套組。

欲採用之含有IL-2突變蛋白之醫藥組合物的治療有效量將取決於(例如)治療背景及目標。熟習此項技術者應瞭解，治療之適當劑量值將部分視以下因素而變：所遞送分子、使用IL-2突變蛋白之適應症、投與途徑及患者之尺寸(體重、身體表面或器官尺寸)及/或情況(年齡及總體健康情況)。在某些實施例中，臨床醫師可確定劑量並改變投與途徑以獲得最佳治療效應。視上述因素而定，典型劑量可在約0.1 μg/kg至最高約1 mg/kg或更高之範圍內。在具體實施例中，劑量可在0.5 μg /kg至最高約100 μg /kg、視情況2.5 μg /kg至最高約50 μg /kg之

範圍內。

治療有效量之IL-2突變蛋白較佳降低疾病症狀之嚴重性，增加無疾病症狀期之頻率及持續時間，或預防因感病性所致之損傷或殘疾。

可使用醫學裝置投與醫藥組合物。用於投與醫藥組合物之醫學裝置之實例係闡述於美國專利第4,475,196號；第4,439,196號；第4,447,224號；第4,447,233號；第4,486,194號；第4,487,603號；第4,596,556號；第4,790,824號；第4,941,880號；第5,064,413號；第5,312,335號；第5,312,335號；第5,383,851號；及第5,399,163號中，其全部以引用方式併入本文中。

治療自體免疫或發炎性病症之方法

在某些實施例中，本發明之IL-2突變蛋白係用於治療自體免疫或發炎性病症。在較佳實施例中，使用IL-2突變蛋白Fc融合蛋白。

尤其適用於利用本文所揭示IL-2突變蛋白治療之病症包括(但不限於)發炎、自體免疫疾病、異位性疾病、伴腫瘤性自體免疫疾病、軟骨炎、關節炎、類風濕性關節炎、幼年型關節炎、幼年型類風濕性關節炎、少關節性幼年型類風濕性關節炎、多關節性幼年型類風濕性關節炎、全身性幼年型類風濕性關節炎、幼年型關節黏連性脊椎炎、幼年型腸病性關節炎、幼年型反應性關節炎、幼年型Reiter氏症候群、SEA症候群(血清陰性、肌腱端病、關節病症候群)、幼年型皮肌炎、幼年型牛皮癬性關節炎、幼年型硬皮病、幼年型全身性紅斑狼瘡、幼年型血管炎、少關節性類風濕性關節炎、多關節性類風濕性關節炎、全身性類風濕性關節炎、關節黏連性脊椎炎、腸病性關節炎、反應性關節炎、Reiter氏症候群、SEA症候群(血清陰性、肌腱端病、

關節病症候群)、皮肌炎、牛皮癬性關節炎、硬皮病、血管炎、肌炎、多發性肌炎、皮肌炎、結節性多動脈炎、華格納氏肉芽病(Wegener’s granulomatosis)、動脈炎、風濕性多發性肌痛、類肉瘤病、硬化症、原發性膽汁性硬化症、硬化性膽管炎、休格倫氏症候群(Sjogren’s syndrome)、牛皮癬、斑塊狀牛皮癬、滴狀牛皮癬、反轉型牛皮癬、膿皰型牛皮癬、紅皮性牛皮癬、皮膚炎、異位性皮膚炎、動脈粥樣硬化、狼瘡、史迪爾氏疾病(Still’s disease)、全身性紅斑狼瘡(SLE)、重症肌無力、發炎性腸疾病(IBD)、克隆氏病(Crohn’s disease)、潰瘍性結腸炎、腹腔疾病、多發性硬化症(MS)、氣喘、COPD、鼻竇炎、鼻竇炎伴息肉、嗜酸性食道炎、嗜酸性枝氣管炎、格巴二氏疾病(Guillain-Barre disease)、I型糖尿病、甲狀腺炎(例如格雷氏病(Graves’ disease))、艾迪森氏病(Addison’s disease)、雷諾氏現象(Raynaud’s phenomenon)、自體免疫肝炎、GVHD、移植排斥、腎損害、C型肝炎誘導之血管炎、自然性流產及諸如此類。

在較佳實施例中，自體免疫或發炎性病症係狼瘡、移植物抗宿主疾病、C型肝炎誘導之血管炎、I型糖尿病、多發性硬化症、自然性流產、異位性疾病及發炎性腸疾病。

在另一實施例中，患有自體免疫或發炎性病症或具有患上該病症之風險之患者係利用IL-2突變蛋白(例如，本文中所揭示之IL-2突變蛋白(例如本文中所揭示之IL-2突變蛋白Fc融合)或本技術領域內已知之另一IL-2突變蛋白或野生型IL-2，視情況作為本文中所闡述類型之Fc融合分子之一部分)來治療且監測患者對該治療之反應。所監測之患者反應可為患者對治療之任何可檢測或可量測反應或該等反應之任

何組合。例如，該反應可為患者生理狀態之變化(例如體溫或發熱、嗜好、出汗、頭痛、噁心、疲勞、饑餓、口渴、精神敏銳度或諸如此類)。另一選擇為，該反應可為(例如)自患者獲取之外周血液樣品中之細胞類型或基因產物(例如，蛋白質、肽或核酸)之變化。在一實施例中，若患者對該治療具有可檢測或可量測之反應或若該反應超過特定臨限值，則改變患者之治療方案。該改變可為減少或增加投藥頻率、或減少或增加每劑量之IL-2突變蛋白投藥量、或投藥「假期」 (亦即短暫停止治療一段指定時間、或直至治療醫師確定應繼續治療為止、或直至所監測之患者反應指示應該或可重新開始治療為止)或終止治療。在一實施例中，該反應為患者之溫度或CRP量之變化。例如，該反應可為患者體溫之升高或外周血液樣品中之CRP量之增加或二者。在一特定實施例中，若患者體溫在治療過程期間升高至少0.1℃、0.2℃、0.3℃、0.4℃、0.5℃、0.7℃、1℃、1.5℃、2℃或2.5℃，則減少、暫停或終止患者之治療。在另一特定實施例中，若患者外周血液樣品中之CRP之濃度在治療過程期間升高至少0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL、0.7 mg/mL、1 mg/mL、1.5 mg/mL或2 mg/mL，則減少、暫停或終止患者之治療。可監測並用於決定是否改變、減少、暫停或終止治療之其他患者反應包括毛細血管滲漏症候群之發展或惡化(低血壓及心血管不穩定)、嗜中性球功能受損(例如，導致或檢測到感染之發展或惡化)、血小板減少症、血栓性血管病、注射部位反應、血管炎(例如C型肝炎病毒血管炎)或發炎性症狀或疾病。可監測並用於決定是否改變、減少、增加、暫停或終止治療之其他患者反應包括NK細胞、Treg細胞、

FOXP3^{-} CD4 T細胞、FOXP3^{+} CD4 T細胞、FOXP3- CD8 T細胞或嗜酸性球之數量之增加。可由(例如)每單位外周血液中該等細胞數量之增加(例如，以每毫升血液中增加之細胞數表示)或該細胞類型相對於血液樣品中其他細胞類型之增加百分比來檢測該等細胞類型之增加。可監測之另一患者反應為患者外周血液樣品中之CD25^{+}細胞上之細胞表面結合IL-2突變蛋白之量之增加。

擴展Treg細胞之方法

IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白可用於在個體或樣品內擴展Treg細胞。本文中提供增加Treg與非調節T細胞之比例之方法。該方法包含使T細胞群體與有效量之人類IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合物接觸。該比可藉由測定T細胞群體內之CD3+FOXP3+細胞與CD3+FOXP3-細胞之比例來量測。人類血液中之典型Treg頻率為總CD4+CD3+ T細胞之5%至10%，然而，在上文所列示疾病中此百分比可較低或較高。在較佳實施例中，Treg之百分比增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%、至少600%、至少700%、至少800%、至少900%或至少1000%。Treg之最大倍數增加可針對特定疾病而變；然而，可藉助IL-2突變蛋白治療獲得之最大Treg頻率為總CD4+CD3+ T細胞之50%或60%。在某些實施例中，將IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白投與給個體且個體外周血液內之調節T細胞(Treg)對非調節T細胞之比例增加。

由於IL-2突變蛋白及IL-2突變蛋白Fc融合蛋白相比於其他細胞類

型優先擴展Treg，故其亦可用於增加個體外周血液內調節T細胞(Treg)對自然殺手(NK)細胞之比例。該比可藉由測定CD3+FOXP3+細胞與CD16+及/或CD56+淋巴球(其為CD19-及CD3-)之比例來量測。

預期IL-2突變蛋白或IL-2突變蛋白Fc融合蛋白可對患者之疾病或病症具有治療效應，而不會顯著擴展患者外周血液內Treg與非調節T細胞或NK細胞之比例。該治療效應可歸因於IL-2突變蛋白或IL-2 Fc融合蛋白在發炎或自體免疫性部位之局部活性。

實例

以下實例(實際的及預示性的)係出於說明本發明之具體實施例或特性之目的來提供且並不意欲限制其範圍。

實例1 -- 減少賦予CD25高親和力之突變數

IL-2突變蛋白對CD25具有升高之親和力且具有減少之藉助IL-2Rβγ之信號傳導強度優先促進Treg生長及功能。為減少可能免疫原性，尋求達成對CD25之高親和力所需要之最小突變數。IL-2與其三種受體(PDB代碼– 2B5I)之錯合物之晶體結構顯示V69A及Q74P係定位於與CD25相互作用之螺旋結構中。此可解釋V69A及Q74P通常在兩次針對高CD25結合親和力之獨立IL-2誘變篩選中分離之原因(Rao等人，2005；Thanos等人， 2006)。此實例探究在Rao等人之篩選中所鑑別之IL-2突變蛋白「2-4」之其他突變中何者對增加上文利用單獨V69A及Q74P所觀測到之親和力最重要。藉由流式細胞術針對與激活T細胞表面上之CD25之結合篩選以下蛋白質。所有構築體亦包括用於純化及檢測之C端FLAG及poly-His標籤。特異性突變提供於括號中。

HaMut1D (V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:8)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut2D (N30S,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:9)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINSYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut3D (K35R,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:10)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPRLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut4D (T37A,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:11)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLARMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut5D (K48E,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:12)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPEKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut6D (E68D,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:13)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEDALNLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut7D (N71R,V69A,Q74P,N88D,C125A) (SEQ ID NO:14)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut8D (K35R,K48E,E68D,N88D,C125A) (SEQ ID NO:15)
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPRLTRMLTFKFYMPEKATELKHLQCLEEELKPLEDVLNLAQSKN
FHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

HaMut7D以與原始分離物「2-4」 (約200 pM)幾乎相同之親和力結合CD25，此指示突變N71R能夠極大增加上文利用單獨V69A、Q74P所觀測到之親和力(HaMut1D，約2 nM)。其他構築體具有與HaMut1D類似或略高於其之親和力，親和力僅略高於WT IL-2之HaMut8D除外。

實例2 -- 與IgG1-Fc結構域融合用於經改良之半衰期之IL-2突變蛋白

為減少利用IL-2突變蛋白達成Treg富集所需要之給藥頻率，評價IL-2與IgG1-Fc結構域之間之各種融合物。Fc結構域含有點突變以廢止藉由IgG1介導之效應子功能(例如標靶細胞溶解)。所利用之Fc效應子功能突變為A327Q、Ala Ala (L234A+L235A)或N297G。由於Treg選擇性IL-2突變蛋白之IL-2效能具有部分降低，故以不會顯著影響IL-2R

信號傳導之方式使IL-2與Fc融合甚為重要。因此，測試IL-2突變蛋白之利用及不利用Fc融合物之IL-2R激活。

為確定藉由Fc融合物之IL-2二聚體化是否將因對IL-2R之增加之親合力而提高IL-2R信號傳導強度，使較弱IL-2突變蛋白(haD5) (US20110274650)與Fc之胺基端融合，藉由GGGGS (SEQ ID NO: 5)連接體序列分開。此突變蛋白具有3種影響IL-2R 信號傳導(E15Q、H16N、N88D)之突變、8種賦予對CD25之高親和力(N29S、Y31H、K35R、T37A、K48E、V69A、N71R、Q74P)之突變(Rao等人，2005)及防止半胱胺酸誤配及聚集之C125S。以類似方式與融合Fc完全廢除haD5之生物活性，而增強其與細胞表面CD25之高親和力結合，很可能係由於因二聚體化而增加之親合力。

亦使IL-2突變蛋白與Fc異源二聚體之N-或C端融合，從而使得Fc二聚體之僅一個鏈具有IL-2結構域。兩個不對稱Fc鏈之間之異源二聚體配對係藉由一個Fc鏈上所引入之離胺酸與另一Fc鏈上所引入之天冬胺酸之間之靜電相互作用來促進。在一種組態較佳之情況下使IL-2突變蛋白haD6與一個Fc鏈或另一鏈之N端融合，從而得到兩種稱為haD6.FcDD及haD6.FcKK之蛋白質構築體。亦利用一或兩個GGGGS (SEQ ID NO: 5)連接體使突變蛋白haMut7D與Fc異源二聚體之C端融合(FcKK(G4S)haMut7D、FcKK(G4S)2haMut7D)。在pSTAT5及T細胞增殖實驗二者中IL-2突變蛋白haD6與Fc異源二聚體之N端之融合導致相對於游離haD6損失部分活性。相比之下，haMut7D與Fc異源二聚體之C端利用一或兩個GGGGS (SEQ ID NO: 5)連接體之融合不會改變haMut7D之效能。

亦調查IL-2突變蛋白與Fc同源二聚體之C端之融合。在T75組織培養燒瓶中利用100 ng/ml抗CD3 (OKT3)以3億個細胞/100 ml激活總PBMC。在培養第3天，將細胞洗滌3次並在新鮮培養基中靜置3天。然後利用IL-2變體以在1 pM至10 nM之間之10×劑量調整刺激細胞達50 μl之最終體積。使用BD phosflow緩衝液套組量測STAT5磷酸化之程度。簡言之，添加1 ml之BD溶解/固定phosflow緩衝液以停止刺激。在37℃下將細胞固定20 min並在冰上利用1× BD phosflow perm緩衝液透化，然後針對CD4、CD25、FOXP3及pSTAT5進行染色。

如圖1中可見，突變蛋白haMut1D及haMut7D之生物活性不會因與Fc同源二聚體之C端融合而改變。因此，IL-2之N端與Fc之C端之間之融合不會使IL-2突變蛋白之激動劑活性受損，甚至在Fc.IL-2同源二聚體之上下文中亦如此。在該等構築體中，使用C125A突變代替C125S用於經改良之製造。

實例3 -- 調整IL-2突變蛋白效能以達成優化Treg生長

初始IL-2突變蛋白組含有單獨N88D或N88D以及1種或2種影響IL-2R信號傳導之額外突變。設計第二組突變蛋白，全部具有單一點突變，目的係鑑別具有與N88D系列類似或略較強效之致效作用之突變蛋白。基於所預測IL-2Rβ相互作用胺基酸(晶體結構，PDB代碼–2B5I)來鑑別一組24種信號傳導突變。基於所預測之在突變蛋白與IL-2Rβ之間之結合自由能之降低選擇特定取代。使用EGAD計算演算法(Handel’s Laboratory, University of California at San Diego, USA)計算結合自由能。突變體之結合自由能係定義為$\Delta\Delta G_{mut} = \mu\ (\Delta G_{mut} - \Delta G_{wt})$。其中，μ (=0.1，通常)係用於使結合親和力之預測變化正規化

以當與實驗能相比時具有1之斜率之比例因數(Pokala及Handel 2005)。解離自由能(ΔG)係定義為錯合物(ΔG_{bound})與自由態(ΔG_{free})之間之能量差。針對每一取代計算解離能ΔGmut。

一組具有以下取代(H16E、H16Q、L19K、D20R、D20K、D20H、D20Y、M23H、D84K、D84H、S87Y、N88D、N88K、N88I、N88H、N88Y、V91N、V91K、V91H、V91R、I92H、E95K、E95R或E95I)之IL-2突變蛋白係表現為與Fc異源二聚體之C端融合物形式。該等構築體亦含有用於高CD25結合親和力之haMut7突變(V69A、N71R、Q74P)及用於有效摺疊之C125A。

在實例2之T細胞STAT5磷酸化分析中針對效能篩選該組，且發現H16E、D84K、V91N、V91K及V91R具有小於野生型IL-2且超過N88D之活性(圖2)。

H16E、D84K、V91N、V91K及V91R具有小於野生型IL-2並超過N88D之活性。

亦在T細胞及NK生長分析中測試所選突變蛋白。

對於T-細胞分析，利用100 ng OKT3以3百萬個/ml激活總PBMC。在第2天，將細胞洗滌3次並在新鮮培養基中靜置5天。然後利用CFSE標記細胞並在24孔板中以50萬個/孔於含有IL-2之培養基中進一步培養7天，然後進行FACS分析。T細胞亞群之增殖以CFSE稀釋(中位數CFSE螢光)呈現於圖3中。

對於NK-細胞分析，在96孔板中以10萬個/孔於含有IL-2之培養基中將MACS分類之CD16+ NK細胞培養3天。在培育之最後18小時期間將0.5 μCi ^{3}H-胸苷添加至每一孔中。結果展示於圖4中。

突變體H16E、D84K、V91N、V91K及V91R突變體能夠以與WT IL-2類似之程度刺激Treg生長，但對其他T細胞之效力為約小10× (圖3)，且對NK細胞之效力為約小100× (圖4)。

設計單獨Fc.IL-2融合蛋白組，其中Fc異源二聚體與突變蛋白haMut7 (V69A、N71R、Q74P、C125A)之間之距離因一系列個別胺基酸截短而減少。

```
Fc.haMut7   Fc...TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7
(SEQ ID NO: 22)

Trunc1   Fc...TQKSLSLSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 23)
Trunc2   Fc...TQKSLSLS-STKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 24)
Trunc3   Fc...TQKSLSLS--TKKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 25)
Trunc4   Fc...TQKSLSLS---KKTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 26)
Trunc5   Fc...TQKSLSLS----KTQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 27)
Trunc6   Fc...TQKSLSLS-----TQLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 28)
Trunc7   Fc...TQKSLSLS------QLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 29)
Trunc8   Fc...TQKSLSL-------QLQLEHLLLDLQMILN...haMut7 (SEQ ID NO: 30)
```

Trunc1-Trunc4具有等於全長親代構築體Fc.haMut7之效能，如圖2、3及4所闡述藉由STAT5磷酸化並藉由T細胞及NK細胞增殖來量測。Trunc5及Trunc6刺激較弱反應，但相比於由N88D突變(haD及haMut7D)刺激之反應較強且與由V91K刺激之反應極為類似。Trunc7相比於N88D突變蛋白較弱，且Trunc8具有極少活性。然而，當測試對NK細胞時，Trunc5及Trunc6為強於V91K之激動劑，此指示Treg選擇性更容易利用信號傳導突變而非毗鄰Fc結構域之空間位阻來達成。

實例4 -- 在Fc同源二聚體之上下文中之高CD25親和力突變

認為賦予高CD25結合親和力之突變有利，此乃因其增加CD25-

high T細胞之趨向，且此乃因其促進長期CD25::IL-2突變蛋白締合及長時間信號傳導。然而，減少突變數可減少免疫原性潛力。N88D或V91K突變蛋白(具有及不具有haMut1高親和力突變V69A及Q74P)係表現為與Fc同源二聚體之C端之融合物形式並針對生物活性進行比較。在pSTAT5刺激分析中，相對於單體突變蛋白，同源二聚合對信號強度無效應。高親和力突變V69A及Q74P之逆轉亦不會影響pSTAT5信號傳導。在T細胞生長分析中，高親和力突變減少對習用CD4 T細胞及CD8 T細胞之活性但不減少對調節T細胞之活性(圖5)。高親和力突變亦不會改變NK細胞中之增殖性反應(圖6)。

為確定高親和力突變是否影響活體內T細胞反應，利用Fc.IL-2突變蛋白融合蛋白向人類化小鼠(利用人類CD34+ 造血幹細胞重構之NOD.SCID.Il2rg 裸小鼠)給藥並監測Treg擴展。對7週齡*NOD.SCID.Il2rg-裸*(NSG)小鼠(Jackson Labs, Bar Harbor, ME)輻照(180 rad)並利用94,000個人類胎肝$CD34^+$造血幹細胞重構。在21週，基於嵌合百分比之均等分佈(藉由PBL之流式細胞術測定)將小鼠分佈至6個群組中並在第0天及第7天給予所指示Fc.突變蛋白融合蛋白或PBS之1 μg皮下注射。在第11天，藉由流式細胞術測定血液中之T細胞亞群頻率。在每只動物1 μg之低劑量下，高親和力突變不會改良Treg擴展超過利用單獨N88D或V91K突變所觀測到者(圖7)。

Treg擴展係選擇性的，此乃因$FOXP3^-CD4^+$ T細胞不會增加相對於總外周血液白血球(PBL，包括人類B及T細胞之混合物)及小鼠髓樣細胞之豐度。此外，在較高劑量下，高親和力突變促進$CD25^+FOXP3^-$ T細胞之增加，從而減少Treg選擇性。因此，在Fc同源二聚體之上下

文中，認為高親和力突變對於促進優化Treg生長並非必需的。

Fc.WT IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(C125A) (SEQ ID NO:16)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Fc.haMut1V91K IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(V69A, Q74P, V91K, C125A) (SEQ ID NO:17)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLI
SNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Fc.V91K (or Fc.IL-2(V91K)) IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(V91K, C125A) (SEQ ID NO:18)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SNINKIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Fc.haMut1N88D IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(V69A, Q74P, N88D, C125A) (SEQ ID NO:19)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLI
SDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

Fc.N88D (or Fc.IL-2(N88D)) IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(N88D, C125A) (SEQ ID NO:20)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

GGGGS

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
SDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

實例5 -- Fc.IL-2突變蛋白之長時間細胞表面CD25締合

人類化小鼠研究之意外結果為，儘管其信號傳導能力降低，但相對於Fc.WT IL-2突變蛋白誘導更穩健Treg富集。在1 μg/小鼠之劑量下(圖7)及在0.5 μg/小鼠之較低劑量下(圖8)觀測到相對於利用Fc.WT所見者更高之Treg富集及FOXP3上調。此增加之活體內效能可由T細胞之減少之消耗造成，從而使得更多Fc.IL-2突變蛋白可用於持久信號傳導。

然而，活體外及活體內PK研究未能展示Fc.V91K或Fc.N88D相對於Fc.WT在來自經激活T細胞培養物之上清液或來自給藥小鼠之血清中之顯著增加之持久性。由於Fc融合物具有兩個IL-2突變蛋白結構域，故增加之內體循環可因對CD25之增加之親合力而導致長時間細胞表面締合。的確，發現Fc.V91K及Fc.N88D比Fc.WT在融合蛋白之簡短暴露後更有效地存留在先前激活之T細胞之表面上(圖9A及B)。

利用100 ng/ml OKT3將原代PBMC預刺激2天。收穫細胞，洗滌四次，並在培養基中靜置過夜。然後在37℃下對細胞與400 pM Fc.IL-2一起進行脈衝30 min。在脈衝後，在一次洗滌後收穫細胞用於T0，或在12 ml之溫培養基中再洗滌3次並培養4小時。為檢測細胞締合之

Fc.IL-2，利用抗人類IgG-FITC (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)及抗CD25-APC (圖9A)對細胞進行染色。.

藉由在相同時間點對磷酸-STAT5進行細胞內免疫檢測觀測到利用Fc.V91K及Fc.N88D之IL-2R信號傳導相對於Fc.WT之持久性。顯示FOXP3+CD4+ T細胞之磷酸-STAT5 MFI (圖9B)。

實例6 -- 融合序列最佳化

在小鼠中之臨床前研究中，當比較完整分子之血清濃度與僅具有人類Fc部分之血清濃度時Fc.IL-2突變蛋白顯示差示暴露，此指示循環人類Fc分解代謝物。為使Fc.IL-2突變蛋白之活體內穩定性及藥物動力學最佳化，對融合序列修飾表徵在體循環中及在穿過網狀內皮系統之循環期間其對Fc.IL-2突變蛋白之蛋白水解降解之影響。評價以下構築體之活體外及活體內蛋白水解降解。

(Ala_Ala)_G4S	...TQKSLSLSPGKGGGGSAPTSSSTKKTQLQ...	ha7N88D (SEQ ID NO: 31)
(N297G_delK)_G4S	...TQKSLSLSPG_GGGGSAPTSSSTKKTQLQ...	ha1V91K (SEQ ID NO: 32)
(N297G_KtoA)_AAPT	...TQKSLSLSPGA______APTSSSTKKTQLQ...	ha1V91K (SEQ ID NO: 33)
(N297G_KtoA)_AAPA	...TQKSLSLSPGA______APASSSTKKTQLQ...	ha1V91K (SEQ ID NO: 34)

藉由比較總人類Fc隨時間之濃度與完整Fc.IL-2突變蛋白隨時間之濃度之定量免疫分析來量測穩定性。藉由西方墨點(western blot)分析並利用抗IL-2及抗人類Fc抗體、接著免疫捕獲分解代謝物來驗證Fc.IL-2突變蛋白之蛋白水解，並藉由質譜法來表徵。來自活體外及活體內樣品之(Ala_Ala)_G4S之分解代謝物之質譜法表徵鑑別Fc結構域之C端Lys為蛋白水解裂解位點。與具有C端離胺酸之Fc構築體((Ala_Ala)_G4S)相比，Fc結構域((N297G_delK)_G4S及(N297G_KtoA)_AAPT)之C端離胺酸之缺失或突變導致在37℃下在小鼠血清中之持久活體外穩定性。此持久活體外血清穩定性轉換為在小

鼠中之較大暴露，如藉由Fc.IL-2突變蛋白血清濃度對時間曲線下之面積(AUC)量測。亦在來自食蟹猴及人類之血清中活體外觀測到缺乏C端Fc 離胺酸之Fc.IL-2突變蛋白之此持久穩定性。在37℃下IL-2之Thr-3至Ala之突變((N297G_KtoA)_AAPA)導致在小鼠血清中及在利用重組人類組織自溶酶D及L之單獨培育中之降低之活體外穩定性(與(N297G_KtoA)_AAPT相比)。此降低之活體外血清穩定性轉換為(N297G_KtoA)_AAPA在小鼠活體內之較低暴露(AUC)（與(N297G_KtoA)_AAPT相比）。來活體外及活體內樣品之(N297G_KtoA)_AAPA之分解代謝物之質譜法表徵鑑別IL-2突變蛋白結構域之Lys 8及Lys 9為易於蛋白水解之殘基，此在(N297G_KtoA)_AAPT之等效樣品中未觀測到。亦在來自食蟹猴及人類之血清中活體外觀測到(N297G_KtoA)_AAPA相對於(N297G_KtoA)_AAPT在37℃下之降低之穩定性。

由於此區域中之糖基化之重要性，且為潛在改良融合蛋白之可製造性，改變融合序列以促進N-連接而非O-連接之糖基化，如以下。

原始

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPTSSSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 32)

經改變

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(T3N,V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPNSSSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 35)

IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(T3N,S5T,V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGGGSAPNSTSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 36)

IgG1Fc(N297G_delK)::GGNGT::huIL-2(T3A,V91K,C125A) TQKSLSLSPGGGNGTAPASSSTKKTQLQ n(SEQ ID NO: 37)

IgG1Fc(N297G_delK)::YGNGT::huIL-2(T3A,V91K,C125A) TQKSLSLSPGYGNGTAPASSSTKKTQLQ (SEQ ID NO: 38)

實例7 – 食蟹猴PK/PD測定

標準IL-2免疫刺激療法需要介於給藥週期間之藥物空窗期(無暴露)以避免不期望副效應。相比之下，Treg擴展或刺激療法可需要具有對於Treg刺激足夠之持續穀值藥物含量(血清C_{min})但具有低於導致免疫激活之藥物含量之最大暴露(血清C_{max})之持久暴露。此實例展示半衰期延長之突變蛋白在食蟹猴中用於經延長標靶覆蓋(血清C_{min})同時維持最大暴露(血清C_{max})低於預期對於促發炎性免疫激活必需之藥物含量之給藥策略。

在四個群組(A至D)中利用Fc.V91K (IgG1Fc(N297G_delK)::G4S::huIL-2(V91K, C125A)向食蟹猴給藥，其中三個群組(A至C)皮下給藥且一個群組(D)靜脈內給藥。對於每一群組，根據下文所概述之給藥策略向四隻首次用於生物實驗之雄性食蟹猴給藥。延長半衰期之突變蛋白之皮下給藥可允許更大淋巴吸收，從而導致較低最大暴露(血清C_{max})及/或更穩健藥理學反應(Treg擴展)。群組A之給藥策略係三個在第1週期之第0天、第2天及第4天之連續10微克/公斤劑量及在第14天之10微克/公斤由組成，從而允許與50微克/公斤之較高初始劑量類似之持久標靶覆蓋同時維持較低最大暴露(C_{max})。群組B之給藥策略為在第0天家第14天給藥之50微克/公斤以供與群組A比較。群組C之給藥策略為在第0天及第28天給藥之50微克/公斤。允許確定持續Treg富集是否需要穀值覆蓋或介於給藥週期間之藥物空窗期是否有益。靜脈內給藥群組D之給藥策略為在第0天以50微克/公斤給藥，從而允許比較與皮下給藥之最大暴露(C_{max})及Treg富集差異。

在以下時間點針對每一指定劑量群組量測藥物動力學(完整分子及總人類Fc之定量免疫分析)、抗藥物抗體、流出可溶性CD25及血清細胞因子(IL-1β、TNF-α、IFN-γ、IL-10、IL-5、IL-4及IL-13)：

群組A：給藥前(第一週期；第1劑量)、48小時(給藥前第一週期；第2劑量)、96小時(給藥前第一週期；第3劑量)、100小時、104小時、120小時、168小時、216小時、264小時、336小時(給藥前第二週期)、340小時、344小時、360小時、408小時、456小時、504小時、576小時、672小時、744小時、840小時及1008小時。

群組B：給藥前(第一週期)、4小時、8小時、24小時、72小時、120小時、168小時、240小時、336小時(給藥前第二週期)、340小時、344小時、360小時、408小時、456小時、504小時、576小時、672小時、744小時、840小時及1008小時。

群組C：給藥前(第一週期)、4小時、8小時、24小時、72小時、120小時、168小時、240小時、336小時、408小時、504小時、672小時(給藥前第二週期)、676小時、680小時、696小時、744小時、792小時、840小時、912小時、1008小時、1080及1176小時。

群組D：給藥前(第一週期)、0.25小時、1小時、4小時、8小時、24小時、72小時、120小時、168小時、240小時、336小時、408小時、504及672小時。

在以下時間點針對每一指定劑量群組量測藥效動力學(外周血液Treg、非調節CD4及CD8 T細胞以及NK細胞之免疫表型分型及計算)：

群組A：給藥前(第一週期；第1劑量)、96小時(給藥前第一週

期；第3劑量)、168小時、336小時(給藥前第二週期)、456小時及576小時。

群組B：給藥前(第一週期)、120小時、240小時、336小時(給藥前第二週期)、456小時及576小時。

群組C：給藥前(第一週期)、120小時、240小時、672小時(給藥前第二週期)、792小時及912小時。

群組D：給藥前(第一週期)、120小時及240小時。

針對所有動物及劑量群組給藥前及每個劑量群組初始劑量後24小時評估血液學及臨床化學。評價以下參數。

血液學：

- 白血球計數(全微分及絕對微分)
- 紅血球計數
- 血紅素
- 血球比
- 平均血球血紅素、平均血球體積、平均血球血紅素濃度(計算值)
- 絕對網狀紅血球
- 血小板計數
- 血球形態
- 紅血球分佈寬度
- 平均血小板體積

臨床化學：

- 鹼性磷酸酶

- 總膽紅素(若總膽紅素超過1 mg/dL，則亦使用直接膽紅素)
- 天冬胺酸酶胺基轉移酶
- 丙胺酸胺基轉移酶
- γ麩胺醯基轉移酶
- 尿素氮
- 肌酸酐
- 總蛋白質
- 白蛋白
- 球蛋白及A/G (白蛋白/球蛋白)比(計算值)
- 葡萄糖
- 總膽固醇
- 三甘油酯
- 電解質(鈉、鉀、氯)
- 鈣
- 磷

實例8 – 無糖基化IgG1 Fc

天然IgG抗體具有於重鏈之恆定結構域2 (CH2)中之糖基化位點。例如，人類IgG1抗體具有定位於位置Asn297 (EU編碼)處之糖基化位點。迄今，製備無糖基化抗體之策略涉及用在物理-化學性質方面類似於Asn之胺基酸(例如Gln)或用模擬不具有極性基團之Asn側鏈之Ala殘基置換Asn殘基。此實例展示用甘胺酸置換Asn (N297G)之益處。N297G Fc為具有較好生物物理性質及可製造性屬性(例如在純化期間之回收)之無糖基化分子。

Fc片段及IgG抗體之多個已知晶體結構之檢查揭露在糖基化之環區段周圍、特定而言在糖基化之位置Asn297處之大量構象撓性。在許多已知晶體結構中，Asn297適應正骨架二面角。Gly具有較高之因缺乏側鏈原子而適應正骨架二面角之傾向。因此，基於此構象及結構原因，相比於N297Q或N297A，Gly可為Asn之較好置換。

利用Gly使Asn297突變產生具有純化製程之顯著改良之回收(或效率)及生物物理性質之無糖基化分子。例如，來自蛋白質A庫之回收百分比(最終產率)對於N297G突變而言為82.6%，與對於N297Q而言之45.6%及對於N297A而言之39.6%相比。SPHP管柱分析揭露，對於N297Q及N297A突變體而言之較低回收百分比係歸因於拖尾峰，此指示高分子量聚集及/或錯誤摺疊之物質。在較大之2 L規模運行下再次證實此結果。

在生物醫藥行業中，針對許多減輕該分子不適用於大規模生產及純化之風險之屬性評估具有大規模生產潛在需要(例如可能以藥物形式出售)之分子。在可製造性評估中，N297G揭露pH變化之穩健性。N297G沒有聚集問題；而N297Q及N297A之聚集分別增加20%及10%。儘管N297G具有較好可製造性屬性，但在所有測試其之功能分析中其與N297Q及N297A類似。例如，在ADCC分析中，N297G缺乏細胞毒性，此與N297Q及N297A類似。

實例9－ 經穩定之無糖基化IgG1 Fc

此實例闡述藉由引入經改造二硫鍵改良IgG抗體骨架之穩定性之方法。天然IgG抗體係穩定分子。然而，對於一些治療應用，可能需要進行突變或產生無糖基化分子。例如，無糖基化IgG分子可用於需

要避免ADCC之治療適應症及結合至Fcγ受體。然而，無糖基化IgG1具有比糖基化IgG1低得多之熔融溫度(CH2結構域熔融溫度降低約10℃；70℃至60℃)。所觀測到之較低熔融溫度消極地影響無糖基化IgG1之各種生物物理性質。例如，與糖基化IgG1相比，無糖基化IgG1在低pH下具有降低之聚集程度。

為改造二硫鍵，涉及C-α原子間之距離計算之基於結構之方法初始用於鑑別Fc區中用於突變成Cys之54個殘基對。將該54個位點進一步縮減為4個殘基對(V259C-L306C、R292C-V302C、A287C-L306C及V323C-I332C)。所用標準包括(i) 於CH2結構域內之位置，(ii) 遠離環、轉角及碳水化合物，(iii) 遠離Fcγ受體及FcRn相互作用位點，(iv) 溶劑可接觸性(較佳經隱埋位置)等。

在無糖基化N297G Fc之上下文中產生成對半胱胺酸取代。非還原肽映射分析揭露，四個經改造位點中之三者形成二硫鍵，如該上下文中所預期及設計。V259C-L306C突變不會正確形成二硫鍵且導致與CH2結構域中已存在之天然二硫化物誤配。其他三種設計(R292C-V302C、A287C-L306C及V323C-I332C)如預測及設計正確形成二硫鍵。將二硫鍵添加至N297G突變中導致相比於單獨N297G突變熱穩定性改良約15℃。在R292C-V302C、A287C-L306C及V323C-I332C二硫化物變體中，當投與給大鼠R292C-V302C及A287C-L306C具有良好藥物動力學($t_{1/2}$分別為11天及9天)。此與大鼠中針對先前所公開之CH2結構域二硫鍵觀測到之藥物動力學特徵形成對比(Gong等人，*J. Biol. Chem. 2009 284: 14203-14210*)，其具有5天之$t_{1/2}$。

改造CH2結構域中之二硫鍵以與糖基化之IgG1分子相當之程度改

良無糖基化分子之穩定性(熔融溫度改良10℃至15℃，如藉由差示掃描裏熱法所測定)。本文中所闡述之經改造位點不會導致二硫化物錯配且二硫化物係如所預測在該群體之大約100%中形成。更重要的係，與CH2結構域中所公開之二硫鍵位點不同，本文中所闡述之二硫鍵不影響大鼠PK。

實例10

活體外比較V91K及N88D突變對在來自食蟹猴及人類之T及NK細胞中之反應之效應。在存在CD25 (在全血pSTAT5反應中經$CD4^{+}CD25^{+}$選通之T細胞)之情況下，V91K突變對食蟹猴IL-2R信號傳導之效應與其對人類IL-2R之降低之活性相比可忽略不計。然而，在不存在CD25 (在全血 pSTAT5反應及NK細胞增殖二者中經$CD25^{-}$選通之T細胞)之情況下，V91K突變更顯著減少食蟹猴IL-2R信號傳導。相比之下，Fc.N88D顯示食蟹猴全血中之$CD25^{+}$ T細胞中之減少之信號傳導，其與人類全血中之T細胞中之Fc.V91K之信號傳導效應更類似。表2中所總結之活體外數據表明在食蟹猴中利用較弱激動劑Fc.N88D所觀測到之治療窗口將預測在人類個體中Fc.V91K之效應。

表2. V91K或N88D突變對人類及食蟹猴細胞之活體外反應之效應之總結

	全血 pSTAT5		NK 細胞增殖
	CD25+ T 細胞	CD25- T 細胞	
V91K 對食蟹猴	ø	↓	↓
V91K 對人類	↓	↓↓	↓↓
N88D 對食蟹猴	↓	↓↓	↓↓
N88D 對人類	↓↓	↓↓	↓↓↓

實例11

在食蟹猴中實施兩個活體內研究。第一食蟹猴研究係經設計以比較Fc.V91K之兩週與四週給藥間隔，來確定完整或部分藥物動力學(PK)及藥效動力學(PD)穀值是否改變對第二劑量之反應之量級(圖10A及B)。使用預測給予強Treg反應之第一劑量(50 μg/kg)及探究治療窗口之下限之第二劑量(10 μg/kg)。由於未知10 μg/kg是否過低，故在第1天、第3天及第5天給予劑量以增加反應之可能性。此給藥方案在第5天後給予與利用單一50 μg/kg皮下(SC)劑量所達成之暴露相同之暴露，但具有較低C-max。亦包括50 μg/kg靜脈內(IV)群組以調查PD之潛在差異，該差異取決於淋巴腔對血液腔中之較高藥物暴露。此研究之結果確定每一劑量值誘導強Treg生長反應而無不良事件(AE)或Teff或NK生長，且在第14天或第28天對第二劑量之反應等效。

表3.　第一食蟹猴研究之研究設計

群組	動物數	給藥(天)	劑量Fc.V91K
1	4	1、3、5、15	10 μg/kg　SC
2	4	1、15	50 μg/kg　SC
3	4	1、29	50 μg/kg　SC
4	4	1	50 μg/kg　IV

第二食蟹猴研究係經設計以利用1、3、100、200 μg/kg (SC)之Fc.V91K劑量探究治療窗口之容限並將此與在3 μg/kg、10 μg/kg、100 μg/kg、200 μg/kg (SC)之劑量下之較弱激動劑Fc.N88D及在3 μg/kg、10 μg/kg、30 μg/kg、100 μg/kg (SC QD×5)下之PROLEUKIN®比較。基於公開之人類及非人類靈長類研究選擇PROLEUKIN®劑量(Hartemann等人，2013, Lancet Diabetes Endocrin 1:295-305；Saadoun

等人，2011, NEJM 365:2067-77；Aoyama等人，2012, Am J Transplantation 12:2532-37)，並QD×5投與以模擬HCV血管炎及1型糖尿病(T1D)之低劑量IL-2臨床試驗。

表4. 第二食蟹猴研究之研究設計

群組	動物數	測試物質	第1週期治療 治療日：劑量(SC)	第2週期治療 治療日：劑量(SC)
1	4	PROLEUKIN®	第1天至第5天：3 μg/kg	第14天至第18天：30 μg/kg
2	4	PROLEUKIN®	第1天至第5天：10 μg/kg	第14天至第18天：100 μg/kg
3	4	Fc.V91K	第1天：1 μg/kg	第14天：100 μg/kg
4	4	Fc.V91K	第1天：3 μg/kg	第14天：200 μg/kg
5	4	Fc.N88D	第1天：3 μg/kg	第14天：100 μg/kg
6	4	Fc.N88D	第1天：10 μg/kg	第14天：200 μg/kg

在圖11A至F中，顯示細胞反應、體溫及血清CRP之動力學。x軸上之時間線以第0天而非第1天開始作為第一劑量當天。

兩個食蟹猴研究組合證明，IL-2突變蛋白相比於利用PROLEUKIN®所達成者誘導更大Treg富集以及更寬治療窗口(圖12A及B)。利用PROLEUKIN®，Treg富集與NK及嗜酸性球生長類似。不希望受限於任何特定理論，嗜酸性球生長係對IL-2療法之熟知反應且可能為來自$CD25^+$先天淋巴細胞之IL-2誘導之IL-5之結果。CD4及CD8 Teff生長發生在使Treg增加至CD4 T細胞之25%至35%之劑量下。相比之下，Fc.V91K及Fc.N88D以相比於NK細胞及嗜酸性球更大之選擇性誘導Treg生長，且促進Teff生長之劑量超過使Treg富集至CD4 T細胞之>40%之彼等。

在文獻中所報導之低劑量IL-2臨床試驗中，所發生之最初AE為

類似流行性感冒之症狀及發熱。因此，除了比較治療窗口外，此研究之目的為發現在發熱之前之生物標記。如圖12C中所顯示，利用PROLEUKIN®之兩個較高劑量，發現CRP含量與體溫類似。利用Fc.V91K，在最高劑量下檢測到體溫之適度升高，且在下一個較低劑量下觀測到較小CRP增加。因此，CRP可用於監測個體對利用本發明分子之治療之反應及/或界定在患者中劑量漸增之上限。

亦在PROLEUKIN®治療之動物中觀測到在Fc.V91K-或Fc.N88D治療之動物中較不顯著或不存在之某些毒性(圖12D)。發現血小板、嗜中性球及白蛋白之含量均因利用PROLEUKIN®之治療而減少，而導致類似或更大Treg富集之Fc.V91K或Fc.N88D之劑量極少降低或不降低該等參數。該等數據合起來指示，預期患者利用Fc.V91K-或Fc.N88D之治療之治療窗口顯著大於利用PROLEUKIN®之情況。

實例12

在所選時間點處，測試來自實例11之第一食蟹猴研究之血清之抗藥物抗體(ADA) (圖13)。顯示其中藉由競爭證實Fc.V91K特異性之樣品之ADA信號/雜訊數據。利用x軸以上之垂直線顯示其中測試ADA之時間點。在群組1中，在最後至少一劑量後第15天一隻動物生成ADA，在第2群組中，無任何動物針對ADA測試為陽性，且在群組3中，在第一劑量後第15天或更多天ADA一致出現在三隻動物中。在群組1及群組2在第162天以50 μg/kg重複給藥後，在四週後(第190天)無任何額外動物針對ADA測試為陽性。群組3中生成最強ADA信號(210、212)之之兩隻動物呈現減少之PD反應，此與在第二劑量後在該等動物中所觀測到之減少之C-max一致。在第四群組(50 μg/kg IV)中

無任何動物針對ADA測試為陽性。ADA對於IL-2及Fc結構域二者具有特異性，其可預期係歸因於食蟹猴IL-2與人類IL-2之間之8個胺基酸差異(V91K、C125A)。未測試ADA之中和活性。

【序列表】

<110> 美商安美基公司

<120> 用於T調節細胞之擴展的介白素-2突變蛋白

<130> A-1826-WO-PCT

<140>
<141>

<150> 61/784,669
<151> 2013-03-14

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (125)..(125)
<223> Cys、Ser、Val或Ala

<400> 1

```
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1               5                   10                  15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
            20                  25                  30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
        35                  40                  45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
    50                  55                  60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65                  70                  75                  80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu
                85                  90                  95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
            100                 105                 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Xaa Gln Ser Ile
```

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 2
<211> 133
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MOD_RES
<222> (125)..(125)
<223> Cys、Ser、Val 或 Ala

<400> 2
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Xaa Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 3
<211> 227
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 4
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 4
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1   5   10   15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20   25   30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35   40   45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50   55   60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65   70   75   80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85   90   95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100   105   110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115   120   125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130   135   140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145   150   155   160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165   170   175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180   185   190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195   200   205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210   215   220

Pro Gly
225

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 5
Gly Gly Gly Gly Ser
1   5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 6
Gly Gly Asn Gly Thr
1   5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 7
Tyr Gly Asn Gly Thr
1   5

<210> 8
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 8
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1   5   10   15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
            20   25   30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 9
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 9
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Ser Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 10
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 10
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 11
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 11
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Ala Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 12
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 12
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Glu
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 13
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 13
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Asp Ala Leu Asn Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 14
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 14
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Ala Leu Arg Leu Ala Pro Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 15
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 15
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Arg Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Glu
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Asp Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 16
<211> 364
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 16
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
290 295 300

Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
305 310 315 320

Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
355 360

<210> 17
<211> 364
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 17
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
245 250 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
260 265 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala
290 295 300

Pro Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
305 310 315 320

Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
355 360

<210> 18
<211> 364
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 18
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

```
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
225                 230                 235                 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
                245                 250                 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
            260                 265                 270
```

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
275 280 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
290 295 300

Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile
305 310 315 320

Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
325 330 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
340 345 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
355 360

<210> 19
<211> 364
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 19
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

```
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145                 150                 155                 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165                 170                 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
225                 230                 235                 240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
                245                 250                 255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
            260                 265                 270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
        275                 280                 285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Leu Ala
    290                 295                 300

Pro Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile
305                 310                 315                 320

Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
                325                 330                 335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
            340                 345                 350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
        355                 360
```

<210> 20
<211> 364
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 20
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1   5   10   15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20   25   30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35   40   45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50   55   60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65   70   75   80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85   90   95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100   105   110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115   120   125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130   135   140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145   150   155   160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                165   170   175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180   185   190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195   200   205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210   215   220

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys
225   230   235   240

Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu
                245   250   255

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr
            260   265   270

Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
        275   280   285

Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala
    290   295   300

Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asp Ile
305   310   315   320

Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
                325   330   335

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp
            340   345   350

Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
        355   360

<210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成 6×His 標籤

<400> 21
His His His His His His
1   5

<210> 22
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 22
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
20 25 30

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
35 40

<210> 23
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成多肽

<400> 23
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25 30

<210> 24
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 24
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
1 5 10 15

Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25

<210> 25
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 25
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu
1 5 10 15

Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25

<210> 26
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 26
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25

<210> 27
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 27
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25

<210> 28
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 28
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
20 25

<210> 29
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 29
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
1   5   10   15

Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
            20

<210> 30
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 30
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
1   5   10   15

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
            20

<210> 31
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 31
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
1   5   10   15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
            20   25

<210> 32
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 32
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala
1   5   10   15

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20 25

<210> 33
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 33
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Pro Thr Ser Ser
1 5 10 15

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20

<210> 34
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 34
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Pro Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20

<210> 35
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 35
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala
1 5 10 15

Pro Asn Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20 25

<210> 36
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 36
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala
1   5   10   15

Pro Asn Ser Thr Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
            20   25

<210> 37
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 37
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Asn Gly Thr Ala
1   5   10   15

Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
            20   25

<210> 38
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之說明：合成肽

<400> 38
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Tyr Gly Asn Gly Thr Ala
1   5   10   15

Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
            20   25

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種人類介白素-2 (IL-2)突變蛋白，其包含V91K取代及與SEQ ID NO:1中所闡述之胺基酸序列具有至少90%一致性之胺基酸序列，其中位置125係丙胺酸，且其中該IL-2突變蛋白優先刺激T調節細胞。

【請求項2】

如請求項1之人類IL-2突變蛋白，其中該突變蛋白包含與SEQ ID NO:1中所闡述之胺基酸序列具有至少95%一致性之胺基酸序列。

【請求項3】

如請求項1或請求項2之人類IL-2突變蛋白，其中該突變蛋白包含SEQ ID NO:1中所闡述之胺基酸序列。

【請求項4】

一種分離核酸，其編碼如請求項1至3中任一項之人類IL-2突變蛋白。

【請求項5】

一種表現載體，其包含以操作方式連接至啟動子之如請求項4之分離核酸。

【請求項6】

一種宿主細胞，其包含如請求項4之分離核酸。

【請求項7】

如請求項6之宿主細胞，其中該分離核酸係以操作方式連接至啟動子。

【請求項8】

如請求項6或7之宿主細胞，其中該宿主細胞係原核細胞。

【請求項9】

如請求項8之宿主細胞，其中該宿主細胞係大腸桿菌(*E. coli*)。

【請求項10】

如請求項6或7之宿主細胞，其中該宿主細胞係真核細胞。

【請求項11】

如請求項10之宿主細胞，其中該宿主細胞係哺乳動物細胞。

【請求項12】

如請求項11之宿主細胞，其中該宿主細胞係中國倉鼠卵巢(CHO)細胞系。

【請求項13】

一種製備人類IL-2突變蛋白之方法，其包括在可以表現該啟動子之條件下培養如請求項7至12任一項之宿主細胞，及自該培養物收穫該人類IL-2突變蛋白。

【請求項14】

一種增加T細胞群體內調節T細胞(Treg)對非調節T細胞之比例之活體外方法，其包括使該T細胞群體與有效量之如請求項1至3中任一項之人類IL-2突變蛋白接觸。

【請求項15】

如請求項14之方法，其中CD3+FoxP3+細胞對CD3+FoxP3-之比例增加。

【請求項16】

如請求項15之方法，其中該CD3+FoxP3+細胞對CD3+FoxP3-之比

例增加至少50%。

【請求項17】

一種如請求項1至3中任一項之人類IL-2突變蛋白之用途，其用於製造用以增加個體外周血液內之調節T細胞(Treg)對非調節T細胞之比例之醫藥。

【請求項18】

如請求項17之用途，其中CD3+FoxP3+細胞對CD3+FoxP3-之比例增加。

【請求項19】

如請求項18之用途，其中該CD3+FoxP3+細胞對CD3+FoxP3-之比例增加至少50%。

【請求項20】

一種如請求項1至3中任一項之人類IL-2突變蛋白之用途，其用於製造用以增加個體外周血液內之調節T細胞(Treg)對自然殺手(NK)細胞之比例之醫藥。

【請求項21】

如請求項20之用途，其中CD3+FoxP3+細胞對表現CD56及/或CD16之CD3-CD19-淋巴球之比例增加。

【請求項22】

如請求項21之用途，其中該CD3+FoxP3+細胞對表現CD56及/或CD16之CD3-CD19-淋巴球之比例增加至少50%。

【請求項23】

一種如請求項1至3中任一項之人類IL-2突變蛋白之用途，其用於

製造用以治療患有發炎性或自體免疫疾病之個體之醫藥。

【請求項24】

如請求項23之用途，其中該醫藥可以減少該疾病之至少一種症狀。

【請求項25】

如請求項24之用途，其中個體外周血液內之調節T細胞(Treg)對非調節T細胞之比例在投與該醫藥後增加。

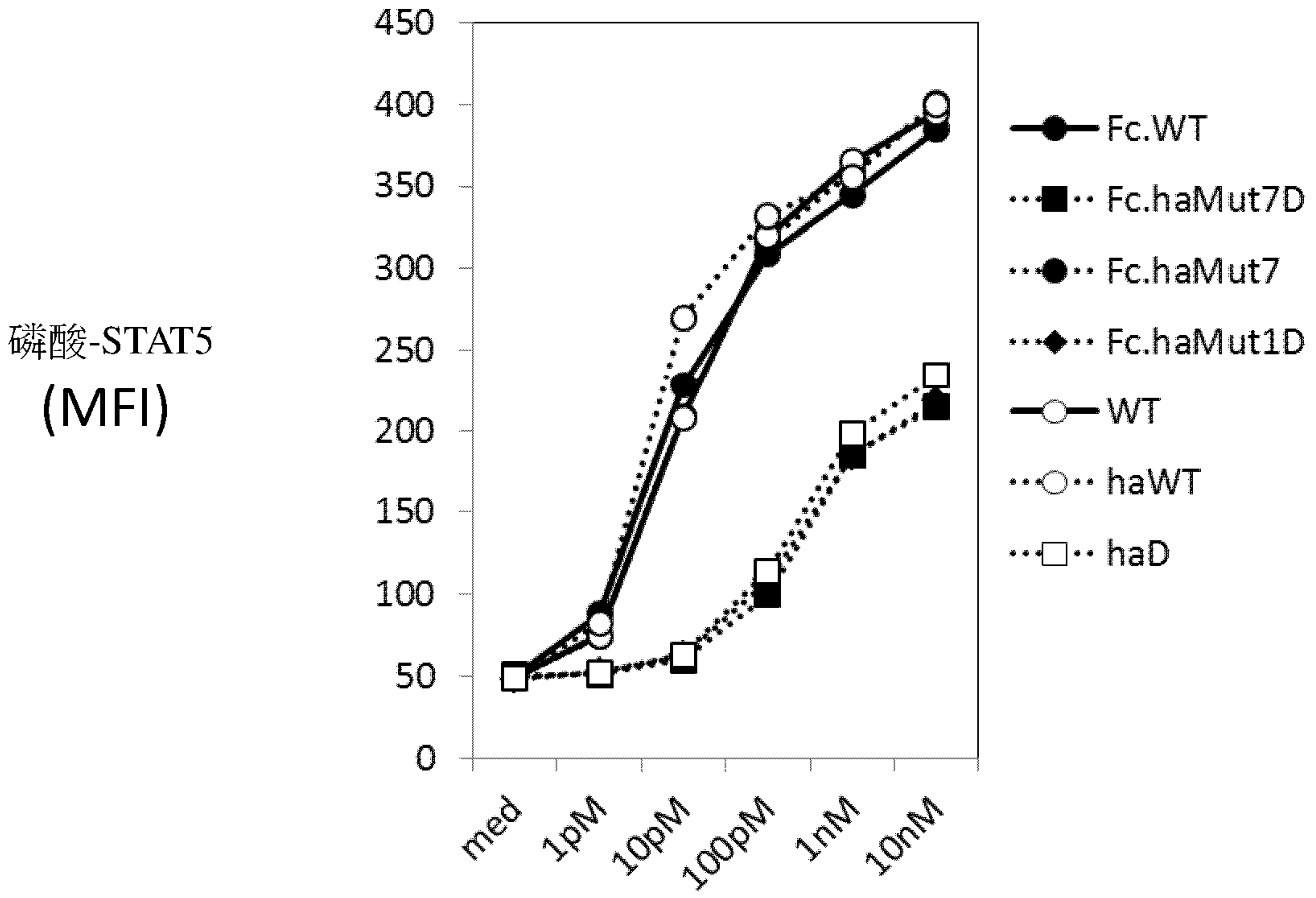
【請求項26】

如請求項24之用途，其中個體外周血液內之該調節T細胞(Treg)對非調節T細胞之比例在投與該醫藥後基本上保持相同。

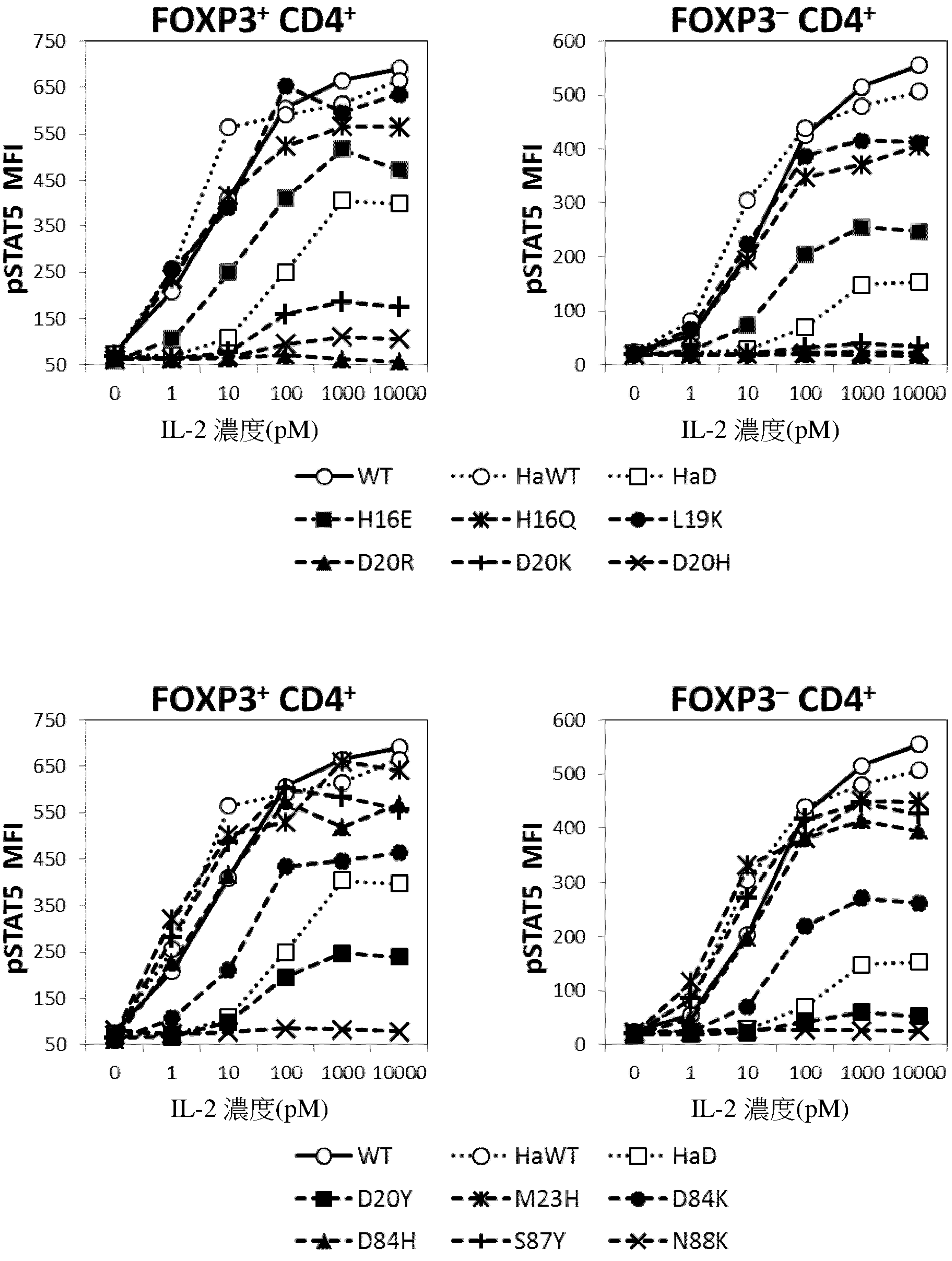
【請求項27】

如請求項23之用途，其中該發炎性或自體免疫疾病係狼瘡、移植物抗宿主疾病、C型肝炎誘導之血管炎、I型糖尿病、多發性硬化症、自然性流產、異位性疾病或發炎性腸疾病。

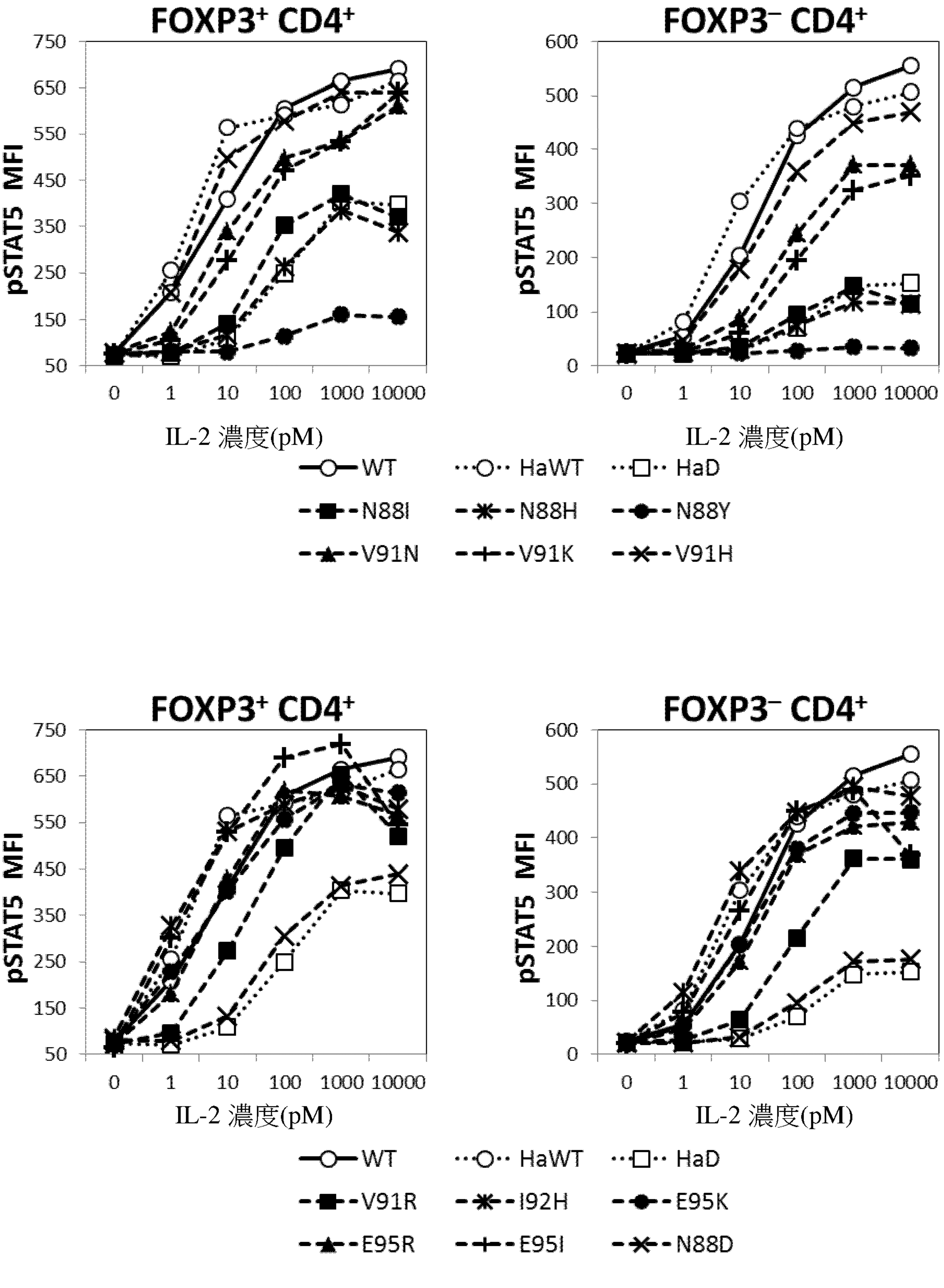
【發明圖式】


磷酸-STAT5
(MFI)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
med
1pM
10pM
100pM
1nM
10nM
Fc.WT
Fc.haMut7D
Fc.haMut7
Fc.haMut1D
WT
haWT
haD

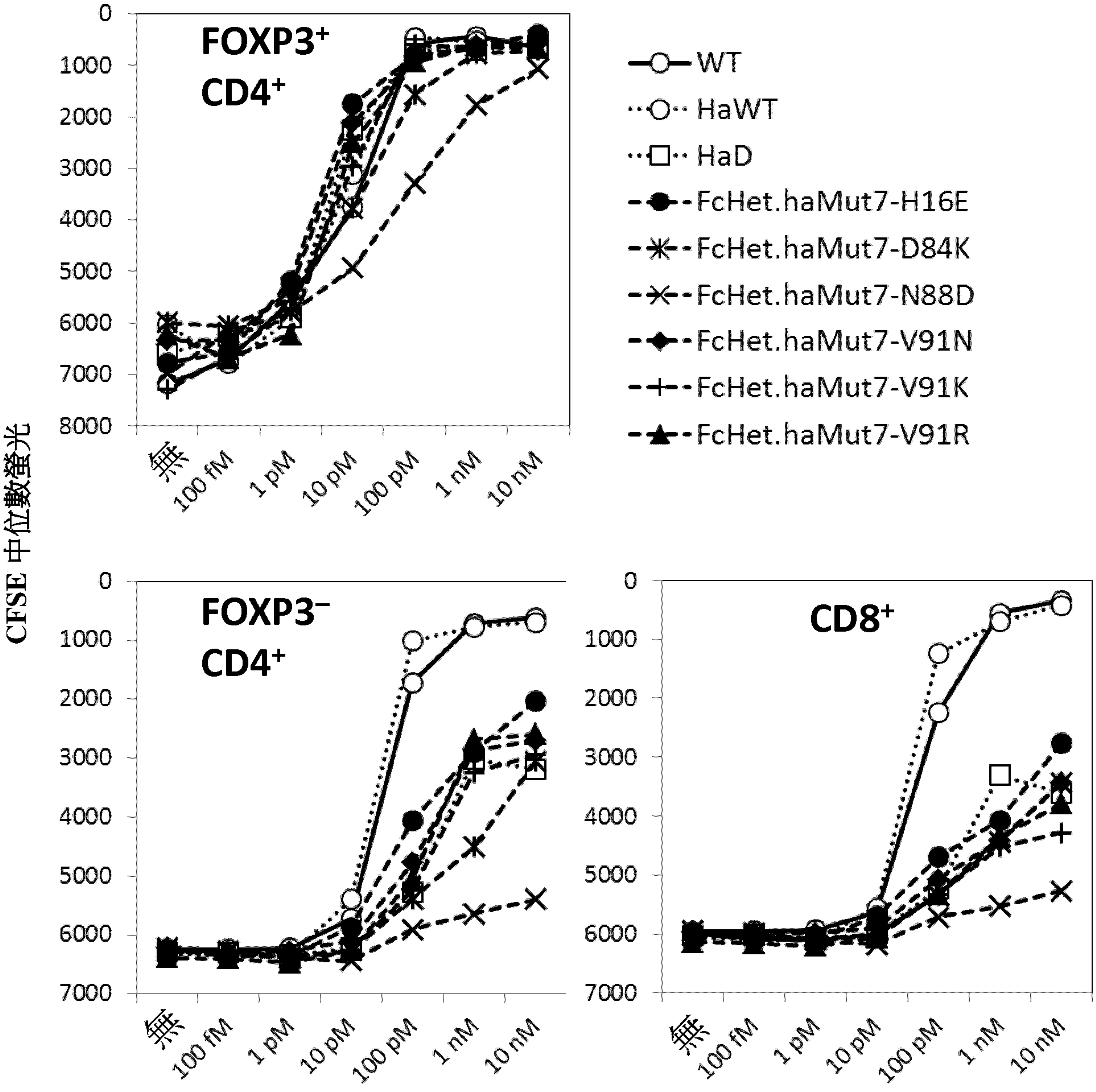
【圖 1】


FOXP3+ CD4+
FOXP3− CD4+
pSTAT5 MFI
750
650
550
450
350
250
150
50
600
500
400
300
200
100
0
0 1 10 100 1000 10000
IL-2 濃度(pM)
WT
HaWT
HaD
H16E
H16Q
L19K
D20R
D20K
D20H
D20Y
M23H
D84K
D84H
S87Y
N88K

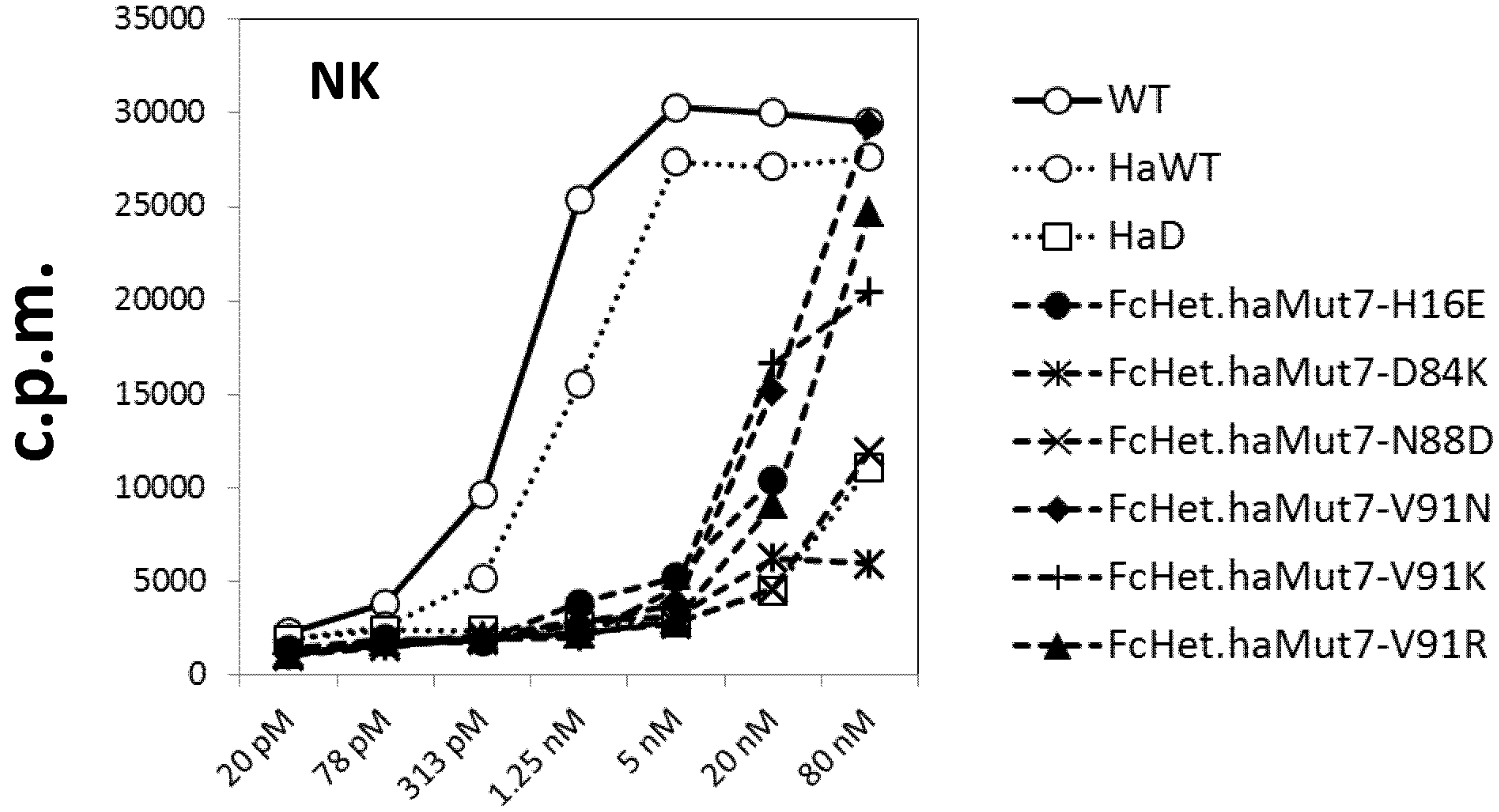
【圖 2A】


FOXP3+ CD4+
FOXP3− CD4+
pSTAT5 MFI
750
650
550
450
350
250
150
50
600
500
400
300
200
100
0
0 1 10 100 1000 10000
IL-2 濃度(pM)
WT
HaWT
HaD
N88I
N88H
N88Y
V91N
V91K
V91H
V91R
I92H
E95K
E95R
E95I
N88D

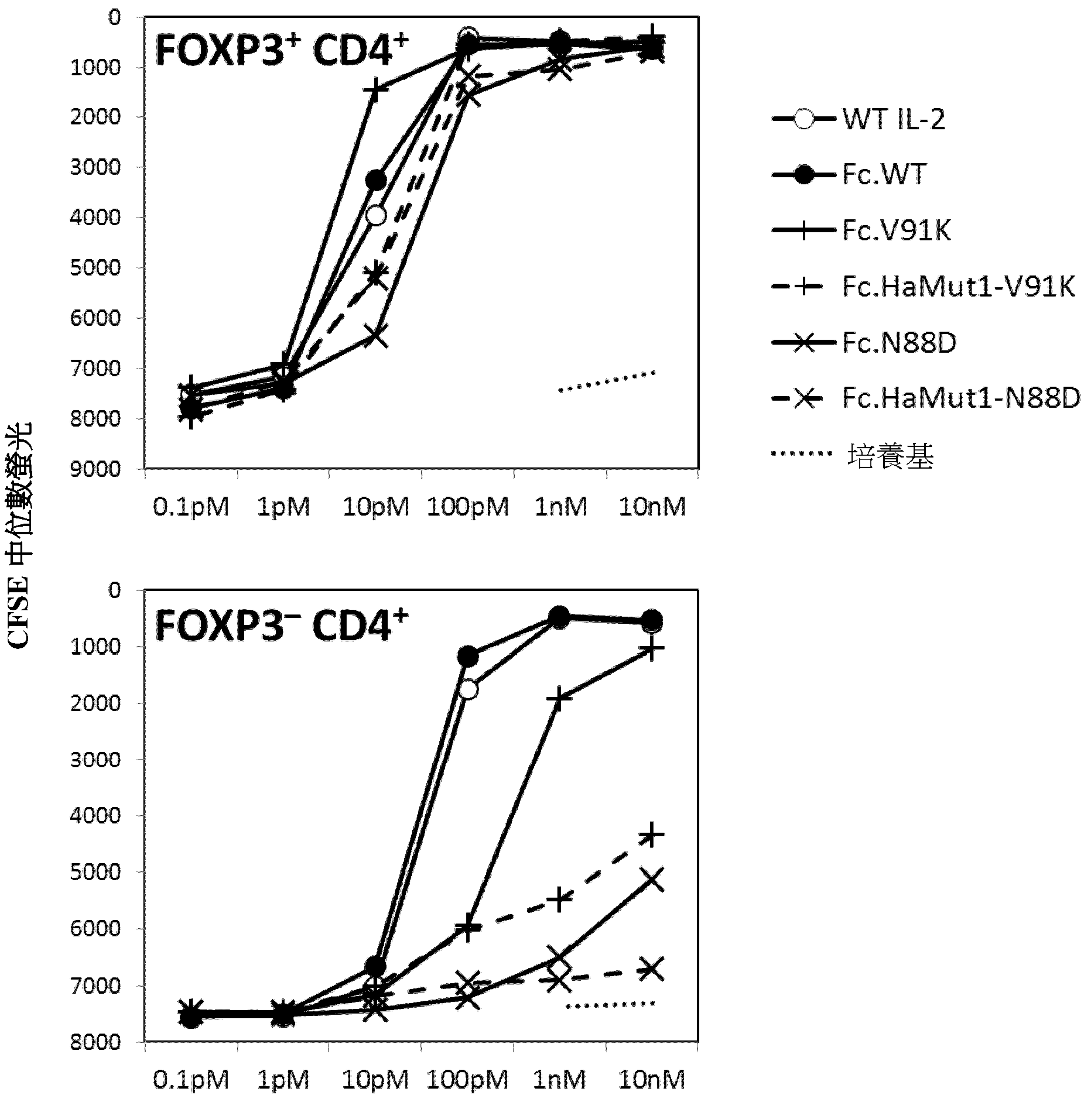
【圖 2B】


CFSE 中位數螢光
FOXP3+ CD4+
FOXP3– CD4+
CD8+
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
無
100 fM
1 pM
10 pM
100 pM
1 nM
10 nM
WT
HaWT
HaD
FcHet.haMut7-H16E
FcHet.haMut7-D84K
FcHet.haMut7-N88D
FcHet.haMut7-V91N
FcHet.haMut7-V91K
FcHet.haMut7-V91R

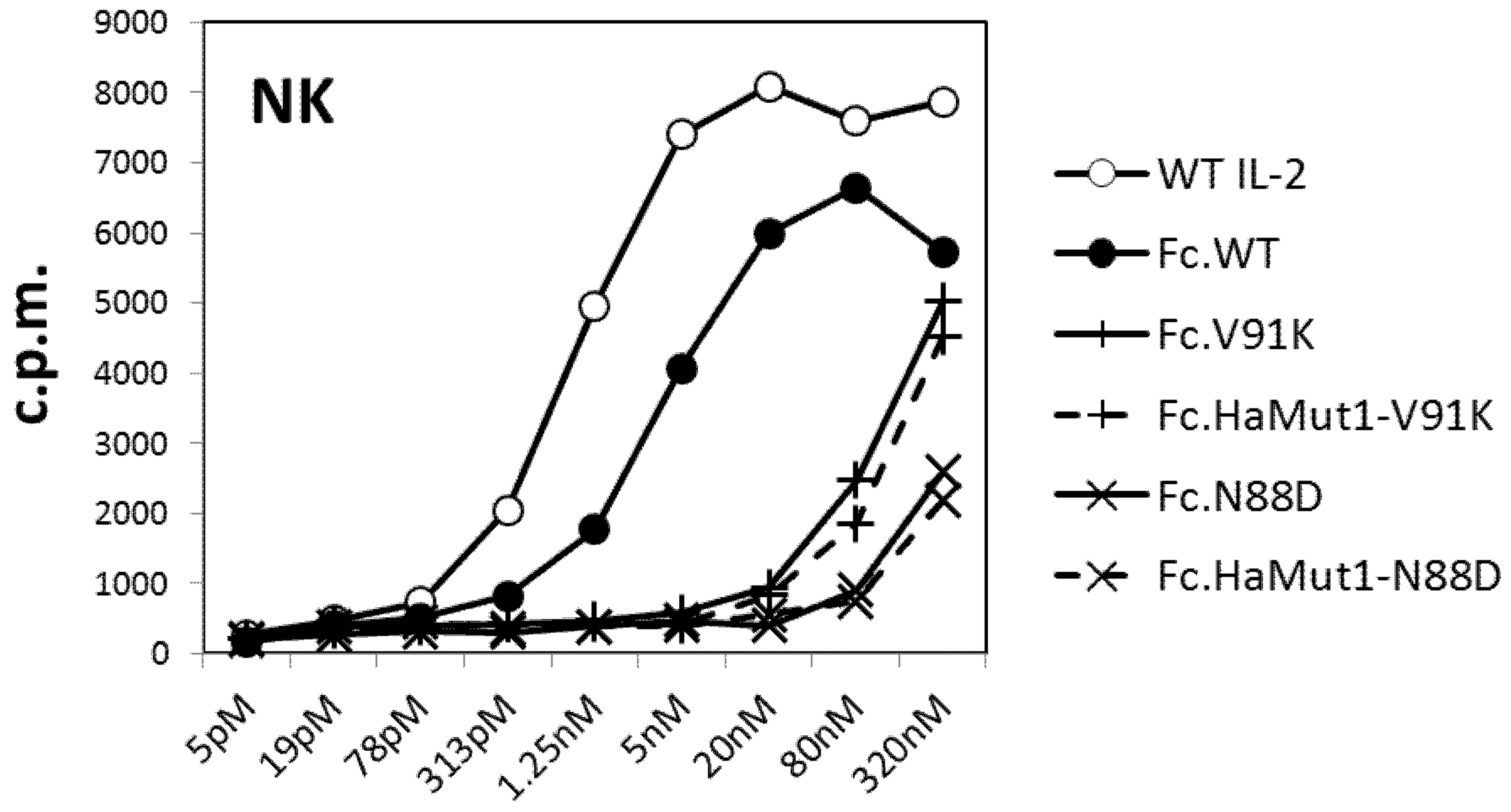
【圖 3】


NK
c.p.m.
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
20 pM
78 pM
313 pM
1.25 nM
5 nM
20 nM
80 nM
WT
HaWT
HaD
FcHet.haMut7-H16E
FcHet.haMut7-D84K
FcHet.haMut7-N88D
FcHet.haMut7-V91N
FcHet.haMut7-V91K
FcHet.haMut7-V91R

【圖 4】

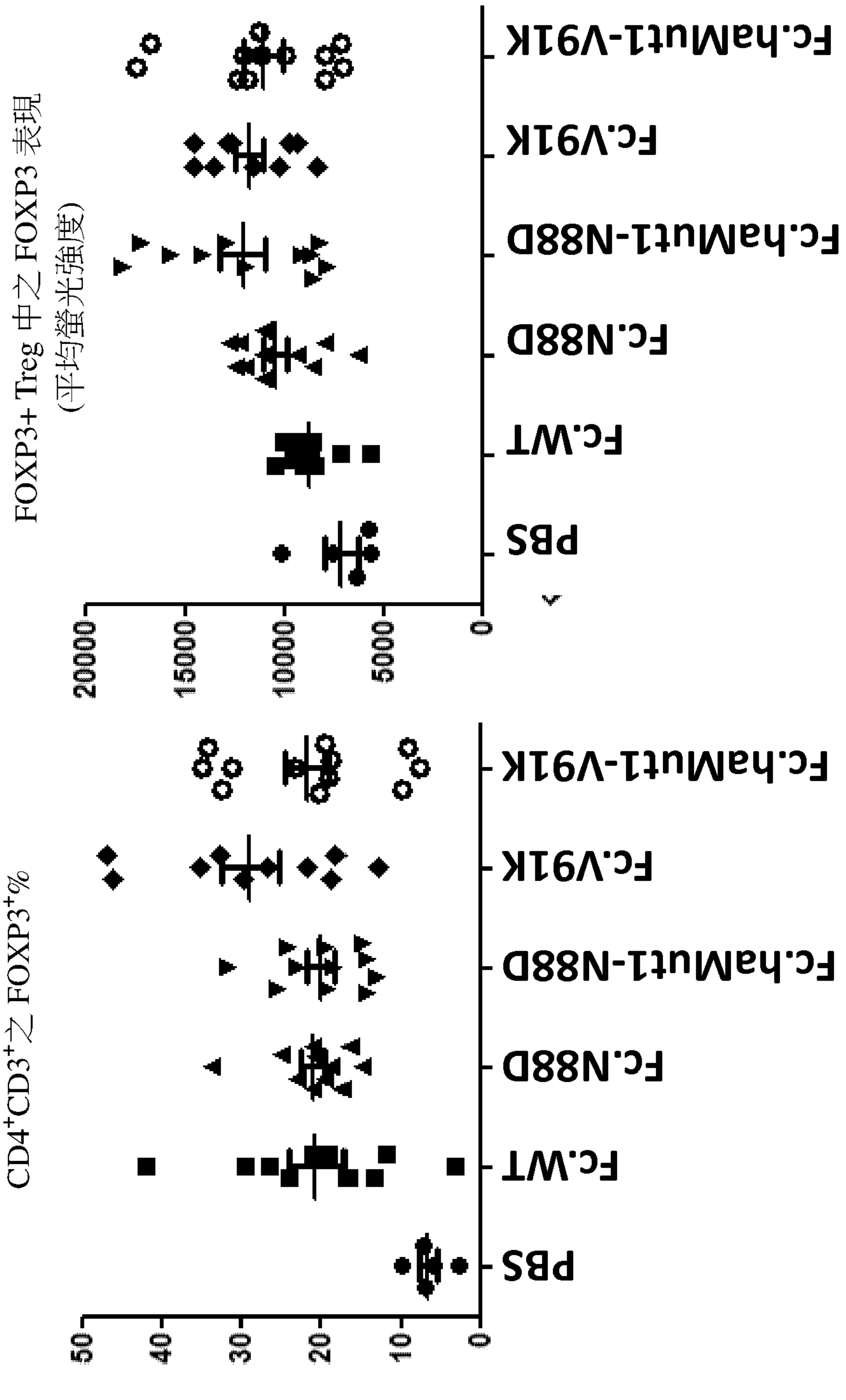

FOXP3+ CD4+
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000
0.1pM
1pM
10pM
100pM
1nM
10nM
CFSE 中位數螢光
FOXP3− CD4+
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
0.1pM
1pM
10pM
100pM
1nM
10nM
WT IL-2
Fc.WT
Fc.V91K
Fc.HaMut1-V91K
Fc.N88D
Fc.HaMut1-N88D
培養基

【圖 5】

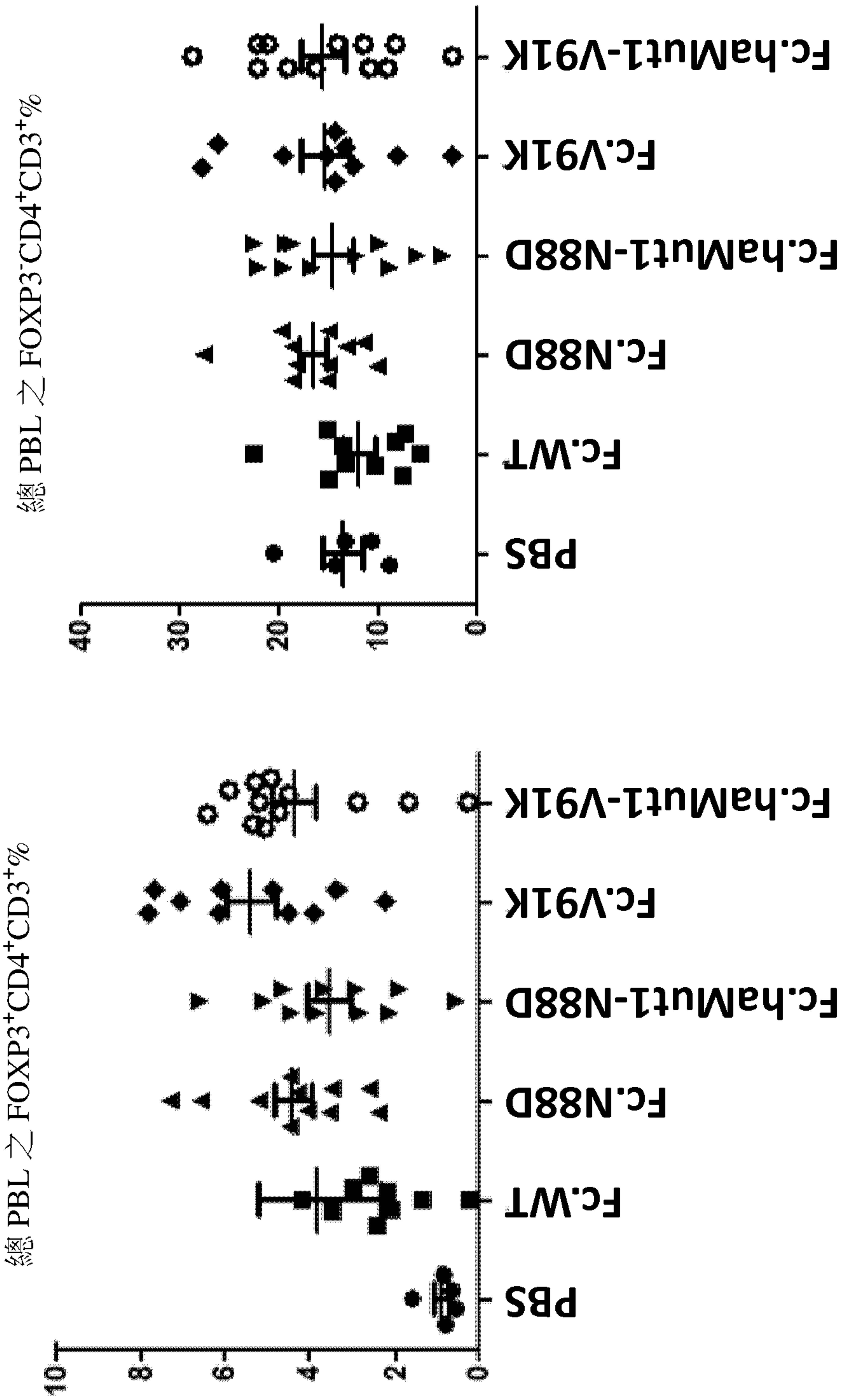


NK
c.p.m.
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
5pM
19pM
78pM
313pM
1.25nM
5nM
20nM
80nM
320nM
WT IL-2
Fc.WT
Fc.V91K
Fc.HaMut1-V91K
Fc.N88D
Fc.HaMut1-N88D

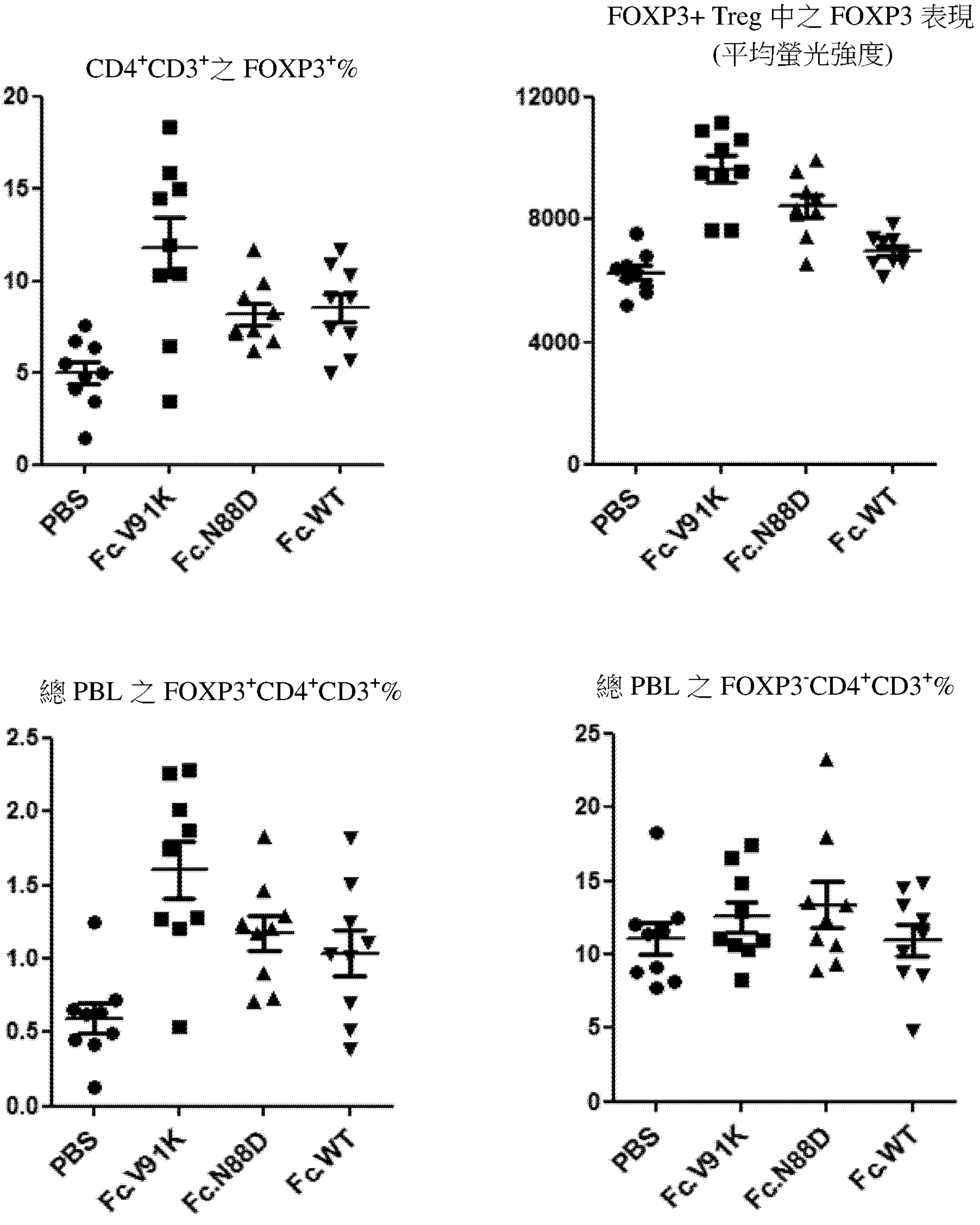
【圖 6】


FOXP3+ Treg 中之 FOXP3 表現
(平均螢光強度)
20000
15000
10000
5000
0
PBS
Fc.WT
Fc.N88D
Fc.haMut1-N88D
Fc.V91K
Fc.haMut1-V91K
CD4+CD3+之 FOXP3+%
50
40
30
20
10
0
PBS
Fc.WT
Fc.N88D
Fc.haMut1-N88D
Fc.V91K
Fc.haMut1-V91K

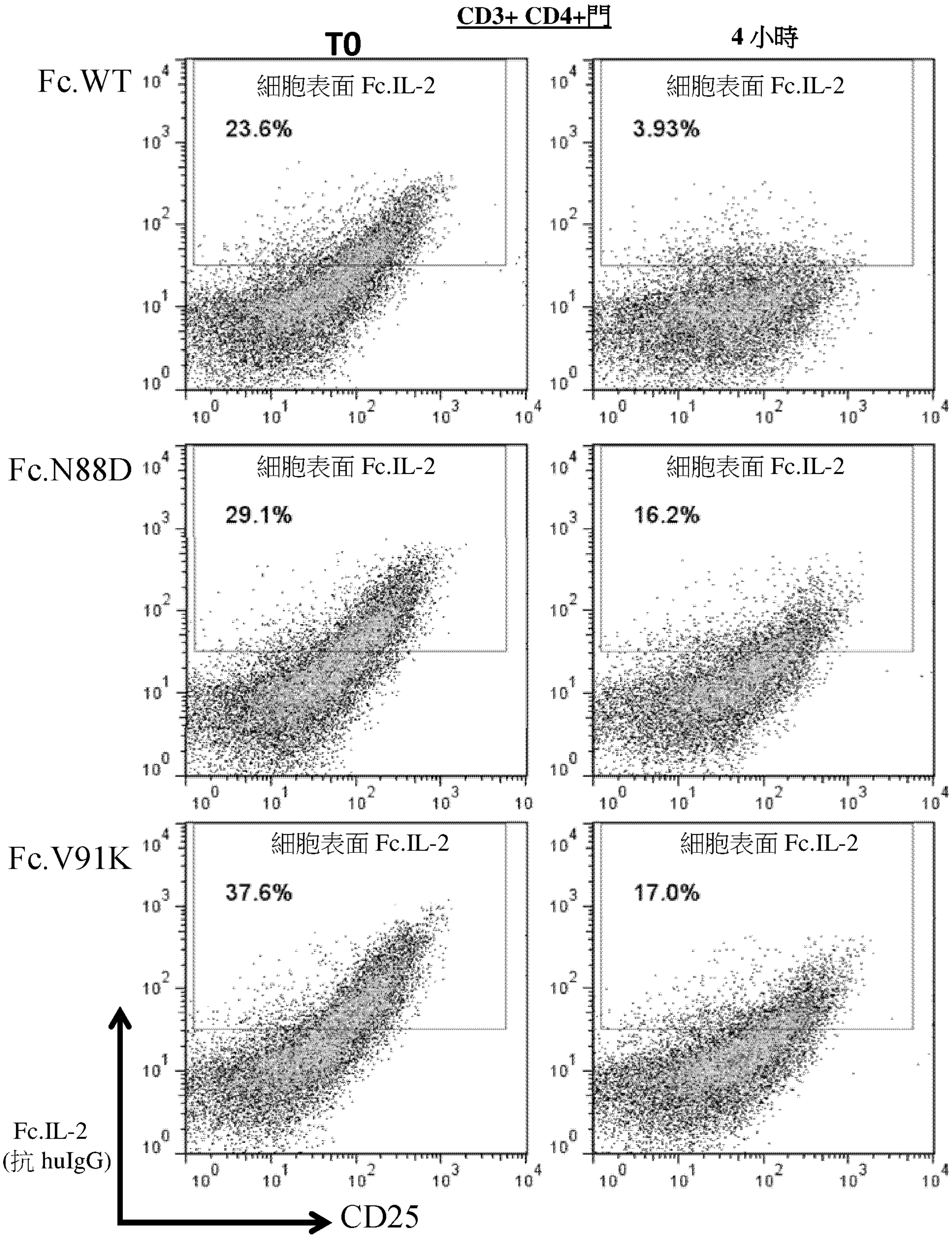
【圖 7A】


總 PBL 之 FOXP3^{-}CD4^{+}CD3^{+}%
總 PBL 之 FOXP3^{+}CD4^{+}CD3^{+}%
PBS
Fc.WT
Fc.N88D
Fc.haMut1-N88D
Fc.V91K
Fc.haMut1-V91K
0
10
20
30
40
2
4
6
8

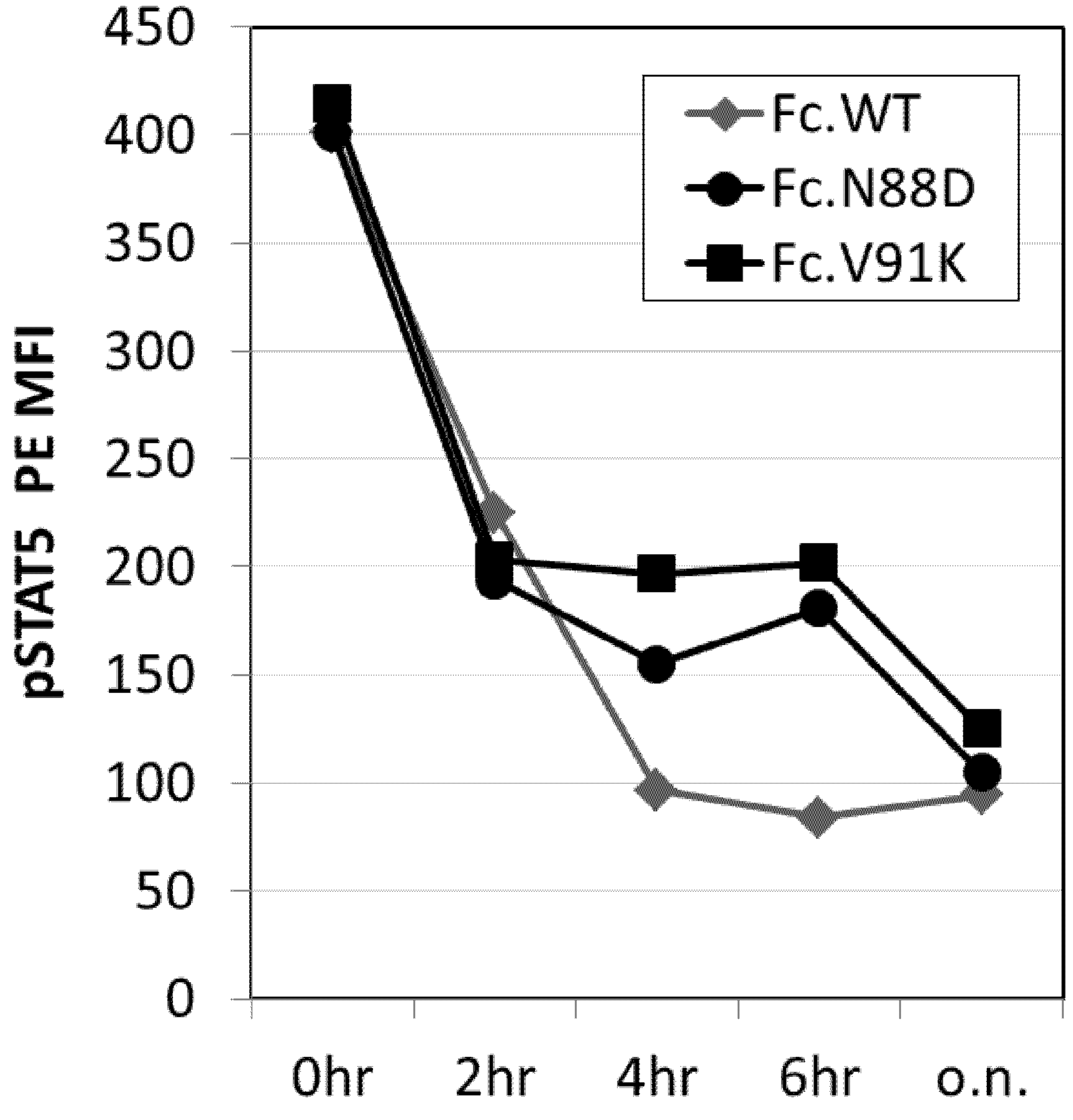
【圖 7B】


CD4+CD3+之 FOXP3+%
20
15
10
5
0
PBS
Fc.V91K
Fc.N88D
Fc.WT
FOXP3+ Treg 中之 FOXP3 表現
(平均螢光強度)
12000
8000
4000
0
PBS
Fc.V91K
Fc.N88D
Fc.WT
總 PBL 之 FOXP3+CD4+CD3+%
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
PBS
Fc.V91K
Fc.N88D
Fc.WT
總 PBL 之 FOXP3-CD4+CD3+%
25
20
15
10
5
0
PBS
Fc.V91K
Fc.N88D
Fc.WT

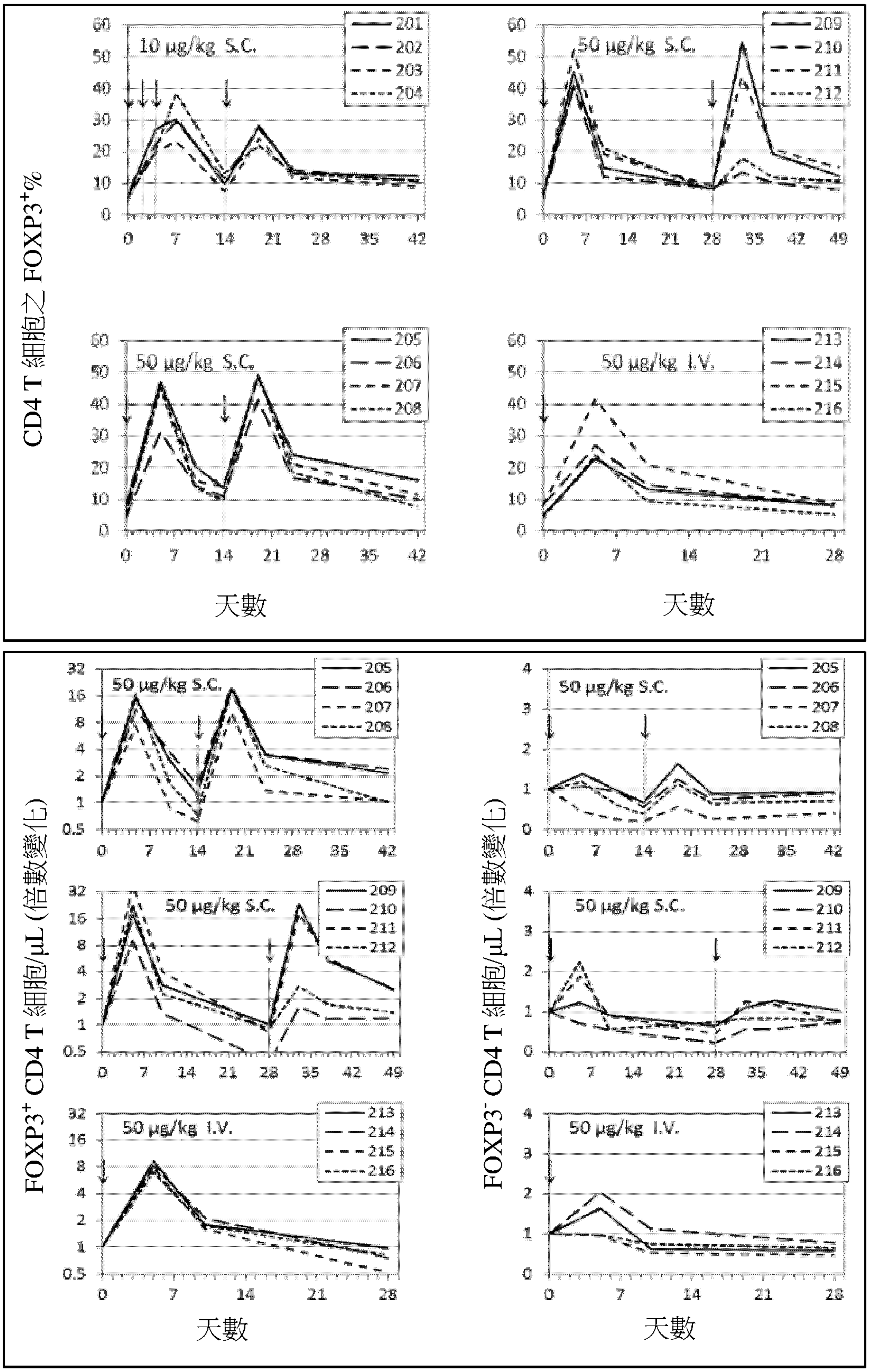
【圖 8】


CD3+ CD4+門
T0
4 小時
Fc.WT
Fc.N88D
Fc.V91K
細胞表面 Fc.IL-2
23.6%
3.93%
29.1%
16.2%
37.6%
17.0%
Fc.IL-2
(抗 huIgG)
CD25

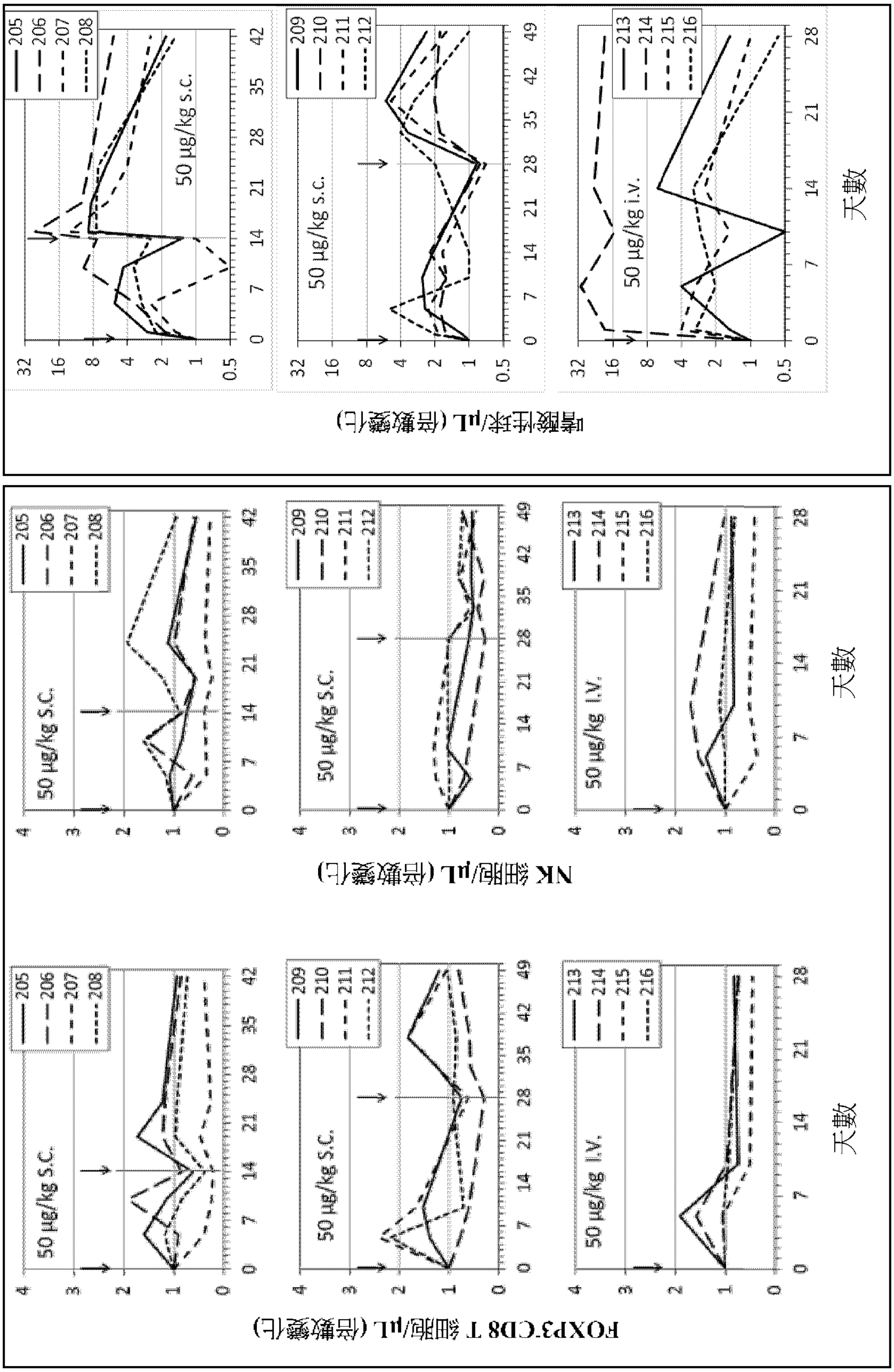
【圖 9A】


450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
pSTAT5 PE MFI
Fc.WT
Fc.N88D
Fc.V91K
0hr
2hr
4hr
6hr
o.n.

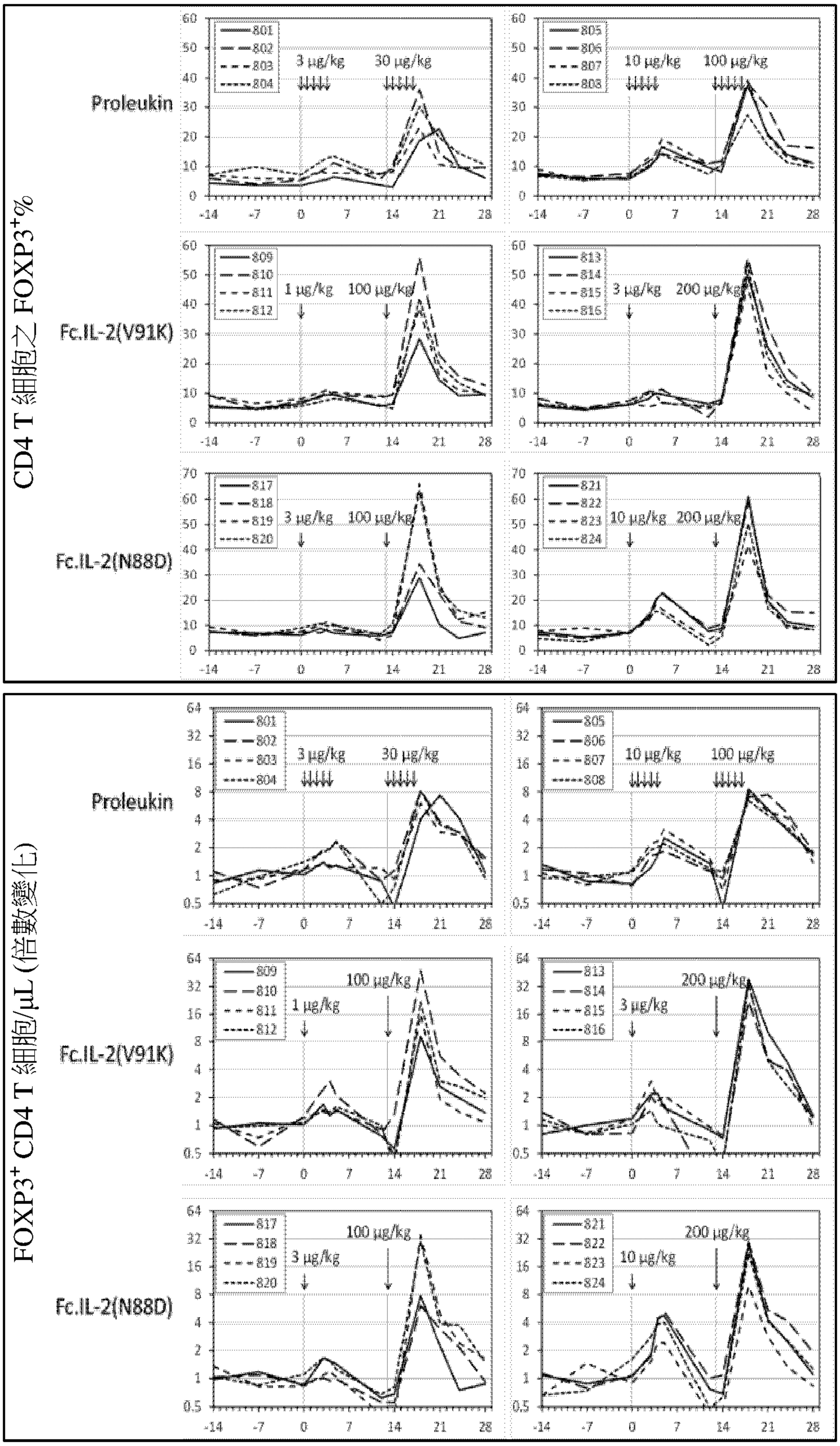
【圖 9B】


CD4 T 細胞之 FOXP3⁺%
10 μg/kg S.C.
201
202
203
204
50 μg/kg S.C.
209
210
211
212
50 μg/kg S.C.
205
206
207
208
50 μg/kg I.V.
213
214
215
216
天數
天數
FOXP3⁺ CD4 T 細胞/μL (倍數變化)
FOXP3⁻ CD4 T 細胞/μL (倍數變化)
50 μg/kg S.C.
50 μg/kg S.C.
50 μg/kg I.V.
天數
天數

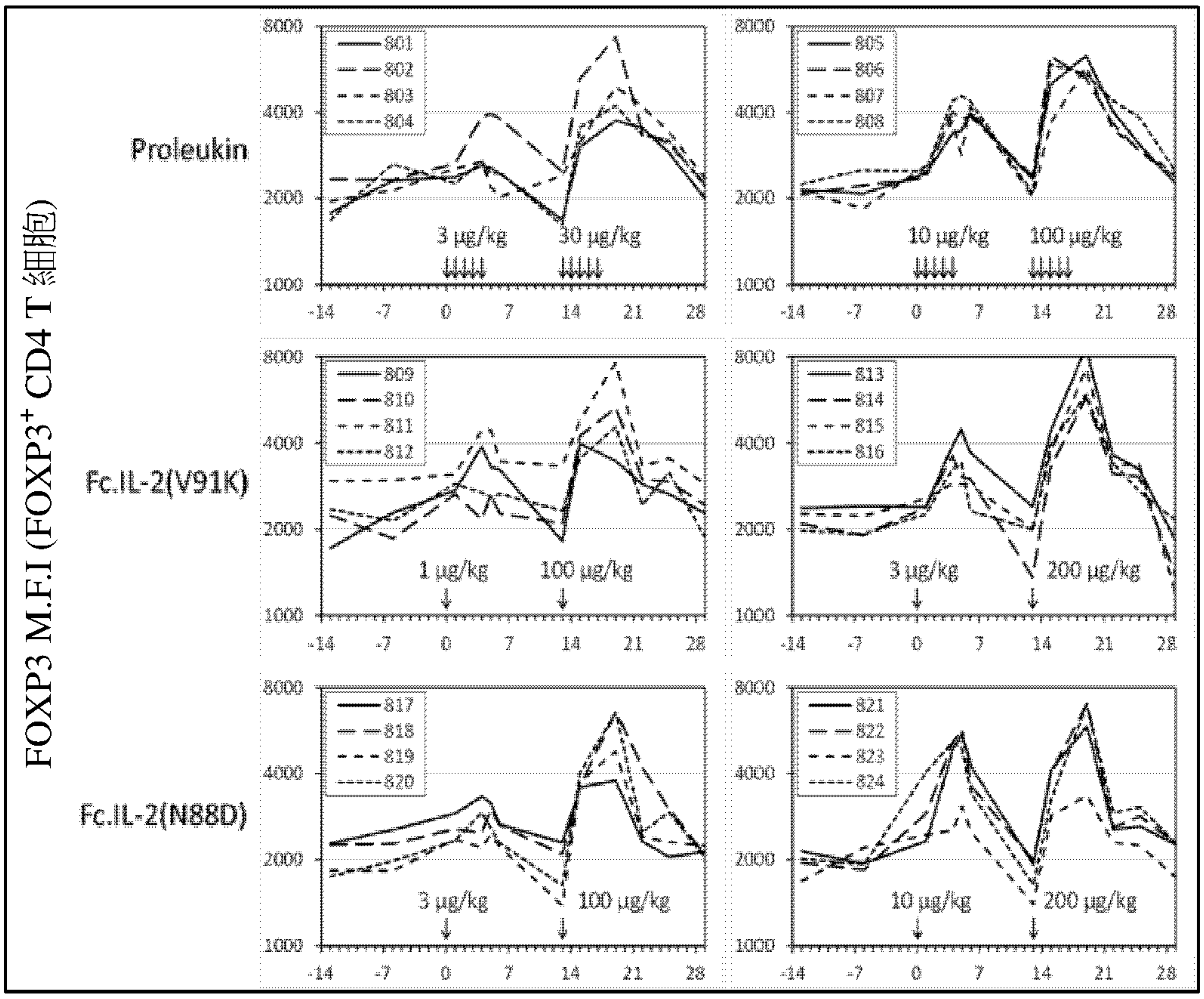
【圖 10A】

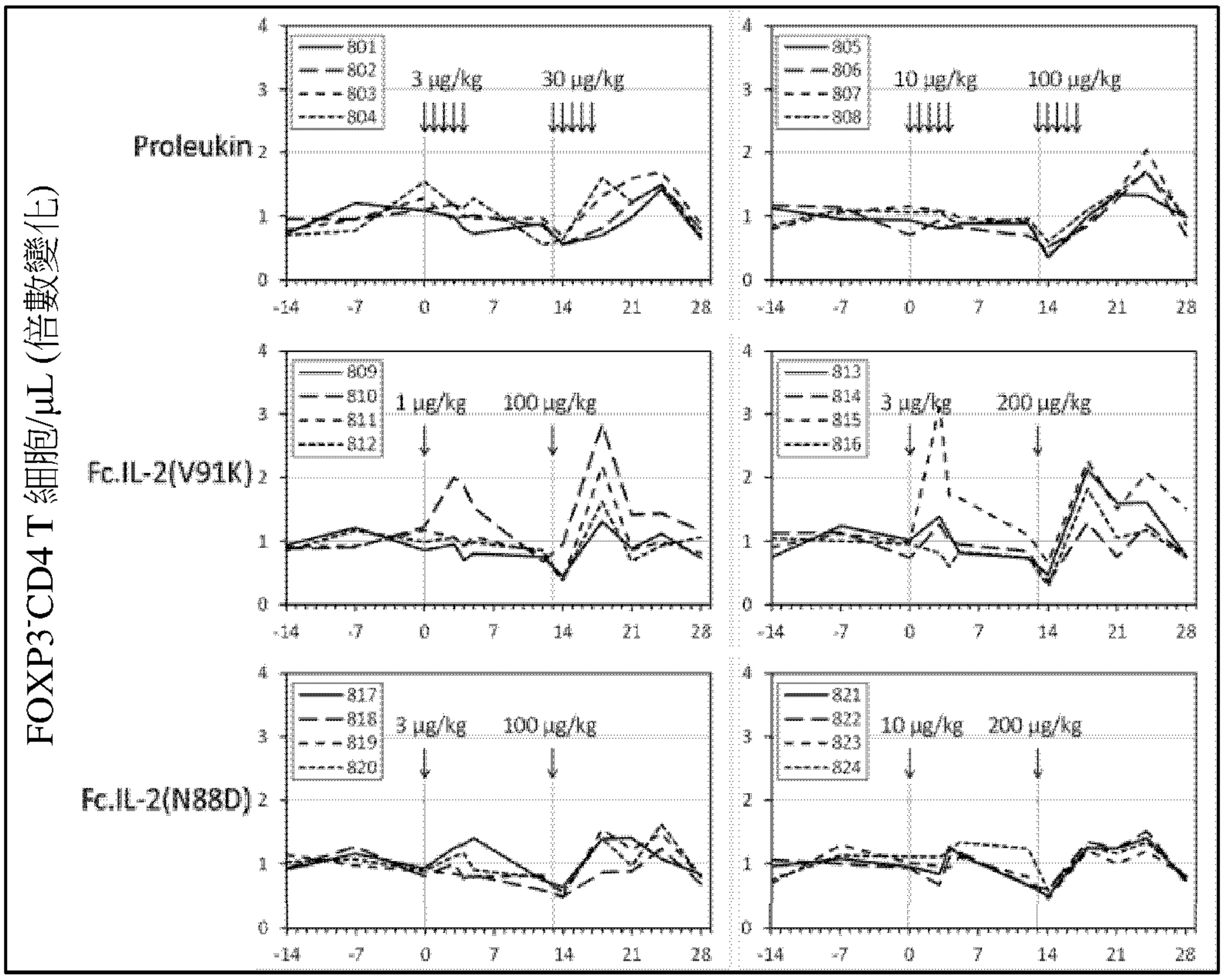

嗜酸性球/μL (倍數變化)
NK 細胞/μL (倍數變化)
FOXP3-CD8 T 細胞/μL (倍數變化)
50 μg/kg s.c.
50 μg/kg i.v.
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
天數

【圖 10B】

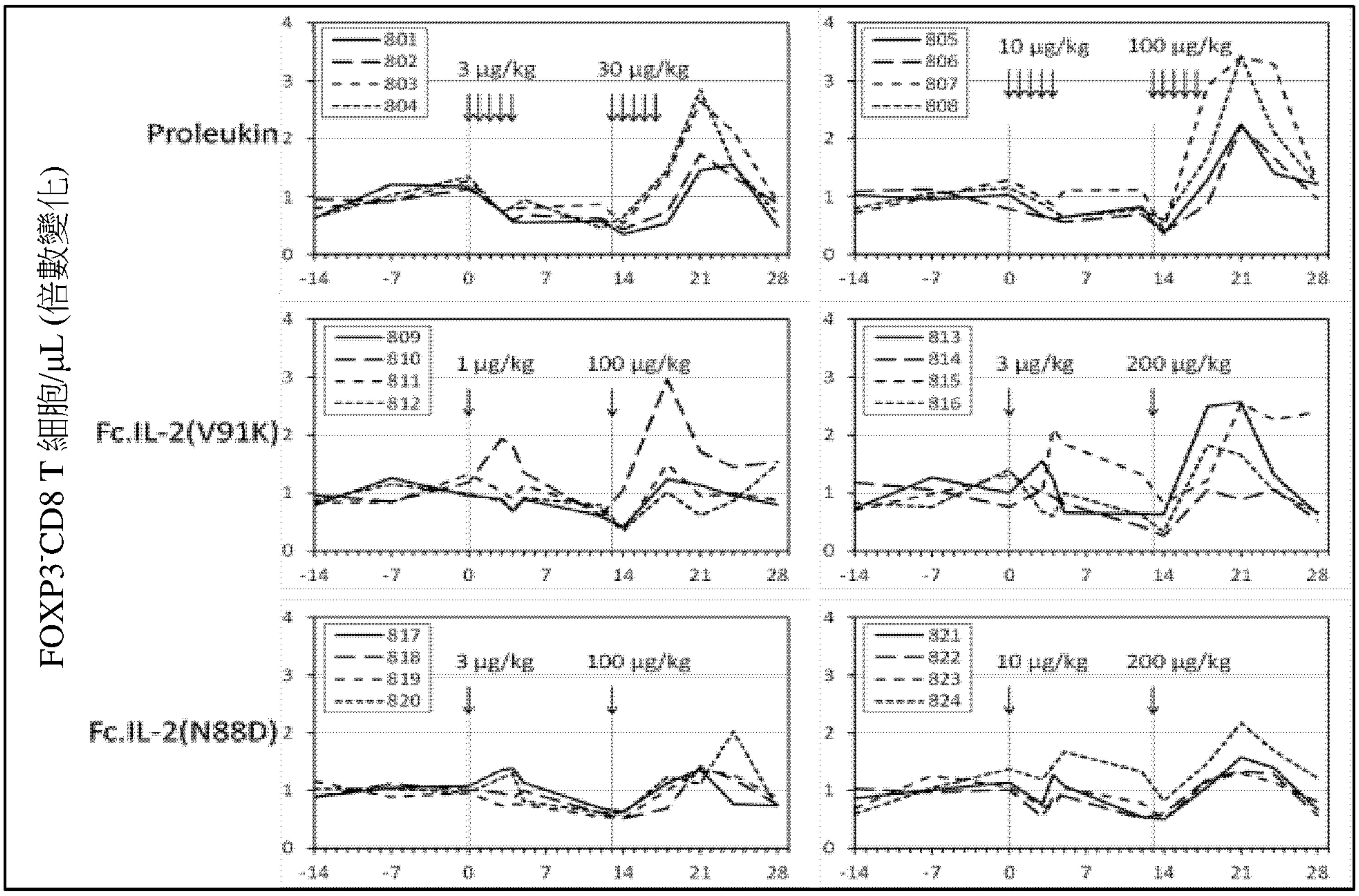

CD4 T 細胞之 FOXP3+%
FOXP3+ CD4 T 細胞/μL (倍數變化)
Proleukin
Fc.IL-2(V91K)
Fc.IL-2(N88D)
801
802
803
804
3 μg/kg
30 μg/kg
805
806
807
808
10 μg/kg
100 μg/kg
809
810
811
812
1 μg/kg
100 μg/kg
813
814
815
816
3 μg/kg
200 μg/kg
817
818
819
820
3 μg/kg
100 μg/kg
821
822
823
824
10 μg/kg
200 μg/kg

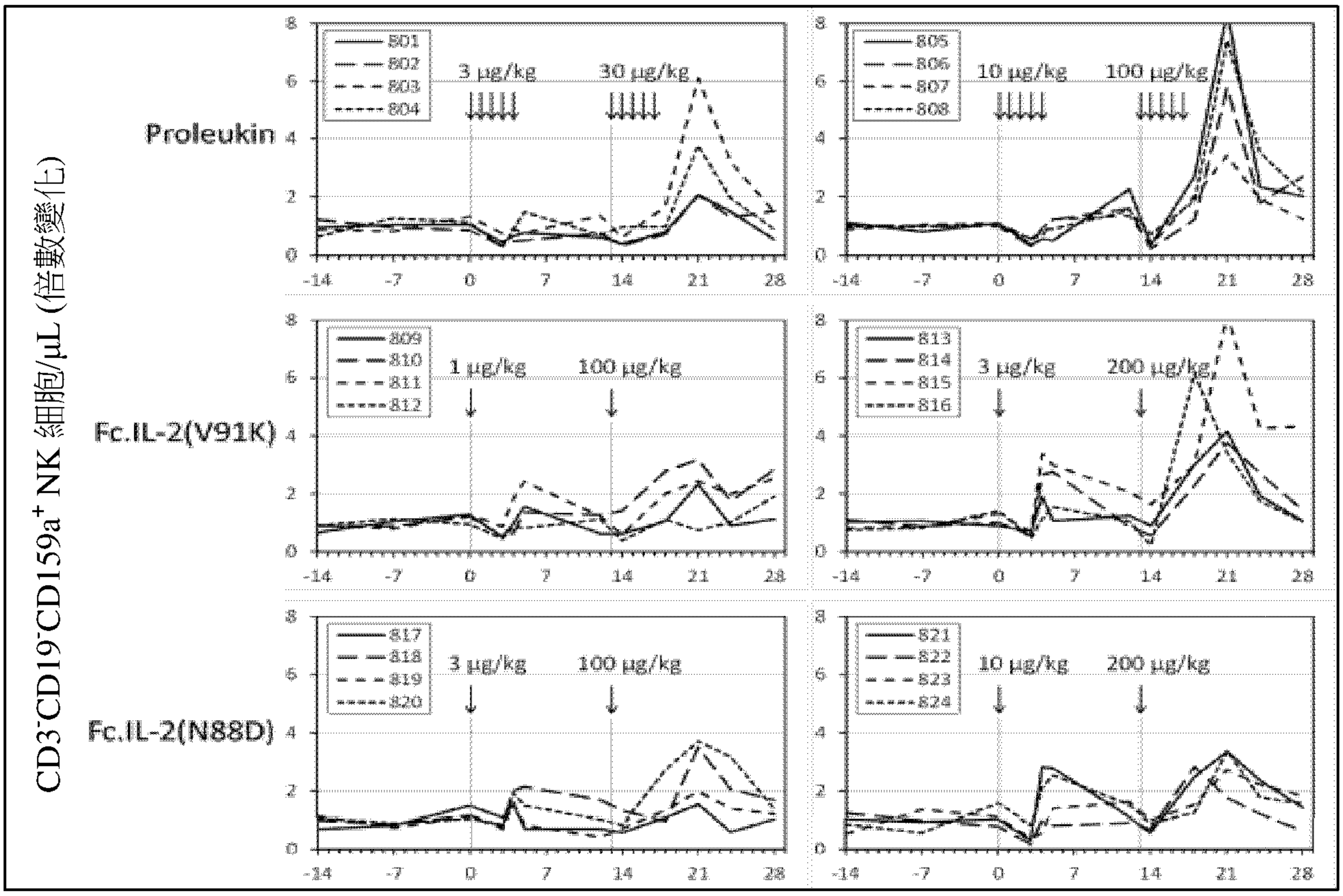
【圖 11A】


FOXP3 M.F.I (FOXP3⁺ CD4 T 細胞)
Proleukin
Fc.IL-2(V91K)
Fc.IL-2(N88D)
3 μg/kg
30 μg/kg
10 μg/kg
100 μg/kg
1 μg/kg
200 μg/kg
FOXP3⁻CD4 T 細胞/μL (倍數變化)

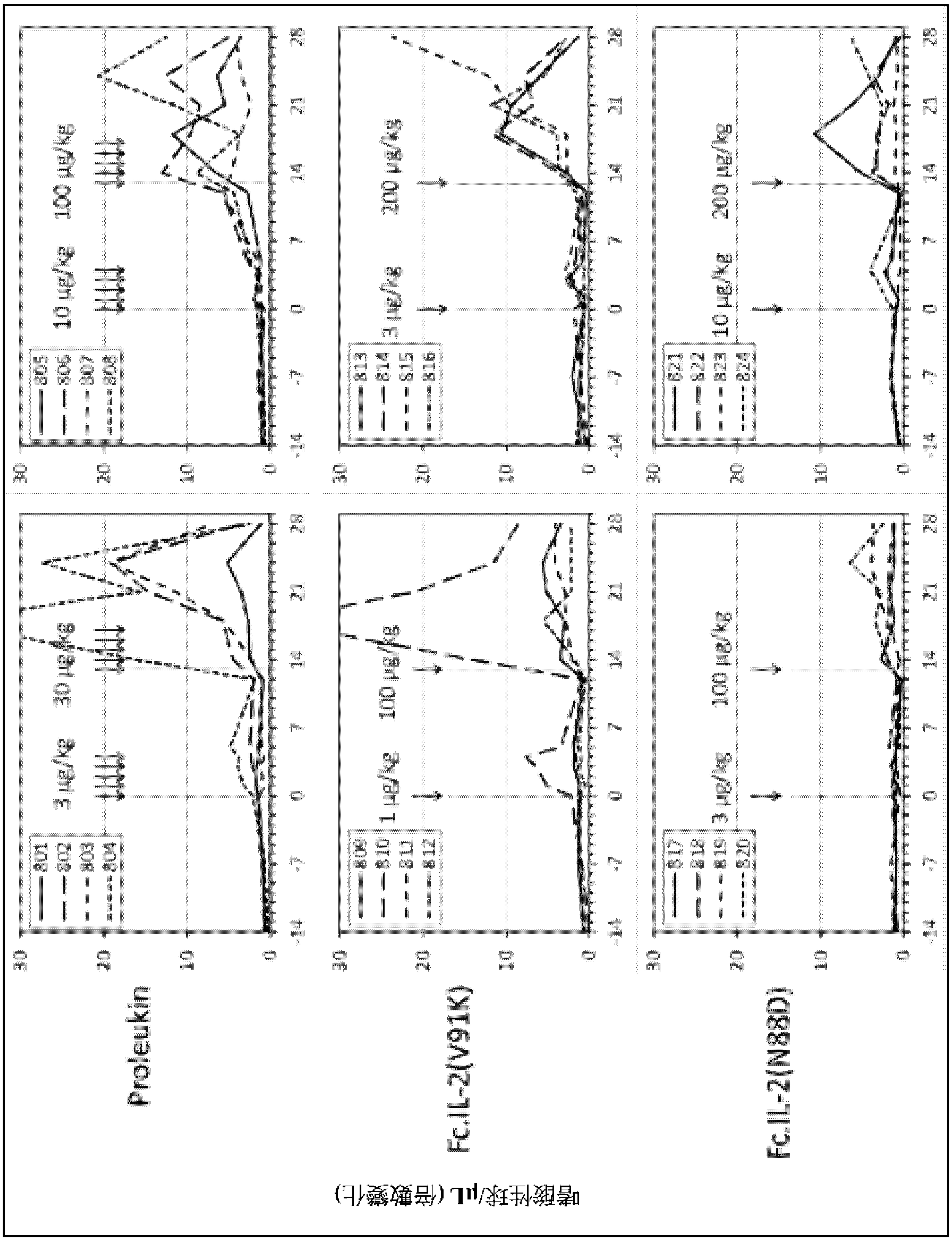


【圖 11B】


FOXP3⁻CD8 T 細胞/μL (倍數變化)
Proleukin
801
802
803
804
3 μg/kg
30 μg/kg
805
806
807
808
10 μg/kg
100 μg/kg
Fc.IL-2(V91K)
809
810
811
812
1 μg/kg
100 μg/kg
813
814
815
816
3 μg/kg
200 μg/kg
Fc.IL-2(N88D)
817
818
819
820
3 μg/kg
100 μg/kg
821
822
823
824
10 μg/kg
200 μg/kg

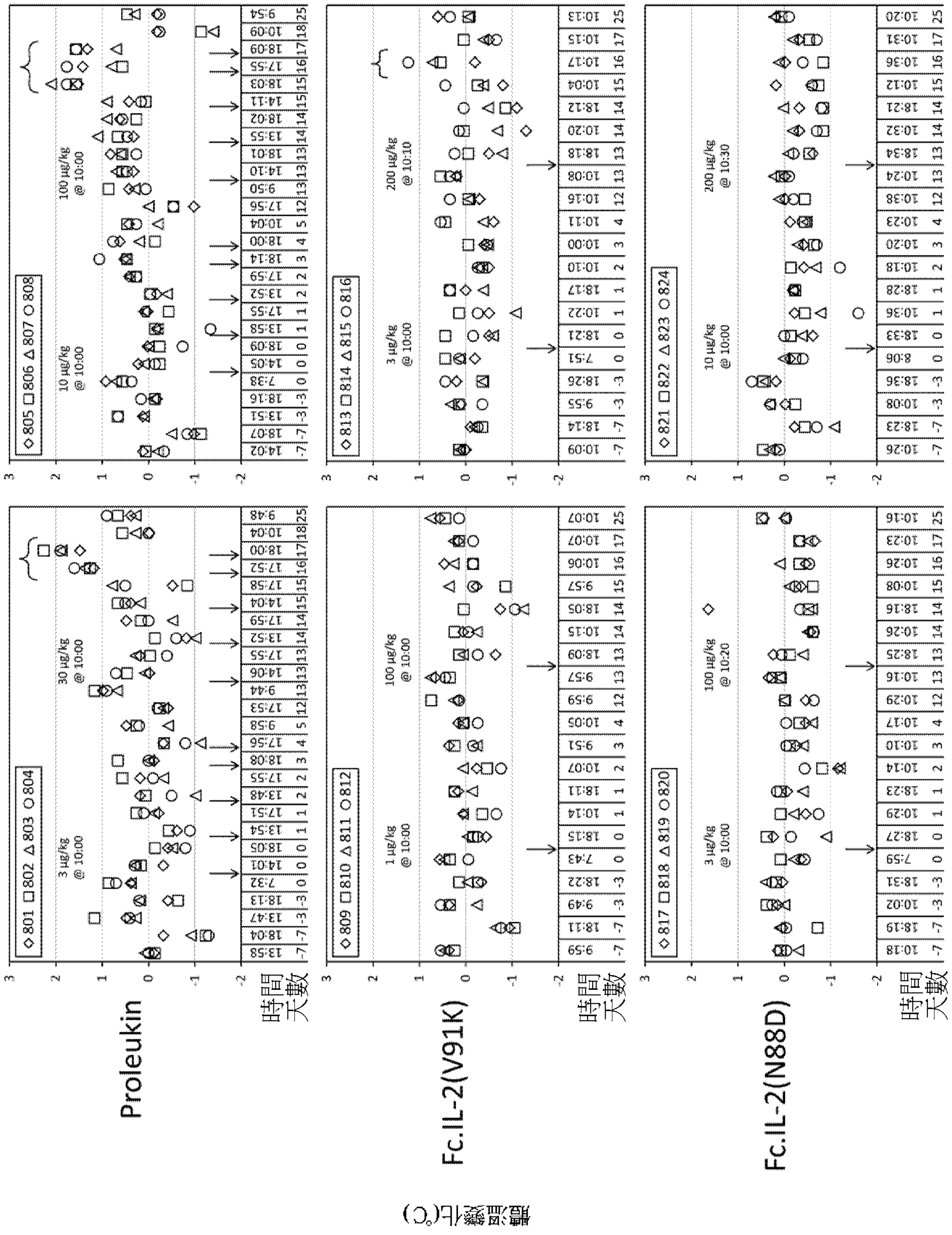

CD3⁻CD19⁻CD159a⁺ NK 細胞/μL (倍數變化)
Proleukin
801
802
803
804
3 μg/kg
30 μg/kg
805
806
807
808
10 μg/kg
100 μg/kg
Fc.IL-2(V91K)
809
810
811
812
1 μg/kg
100 μg/kg
813
814
815
816
3 μg/kg
200 μg/kg
Fc.IL-2(N88D)
817
818
819
820
3 μg/kg
100 μg/kg
821
822
823
824
10 μg/kg
200 μg/kg

【圖 11C】

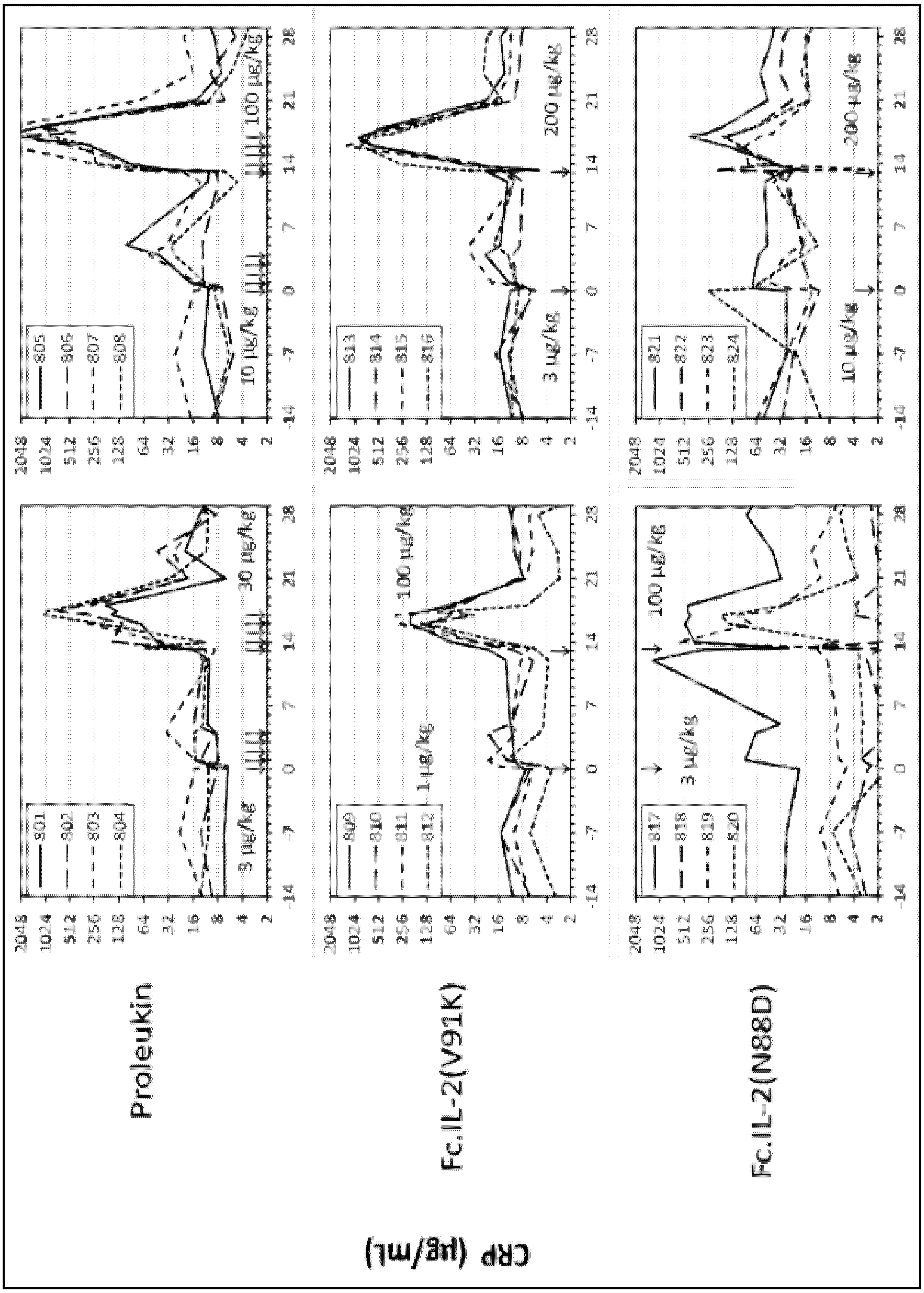


Proleukin
Fc.IL-2(V91K)
Fc.IL-2(N88D)
嗜酸性球/μL (倍數變化)
3 μg/kg
30 μg/kg
10 μg/kg
100 μg/kg
1 μg/kg
100 μg/kg
3 μg/kg
200 μg/kg
3 μg/kg
100 μg/kg
10 μg/kg
200 μg/kg
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824

【圖 11D】

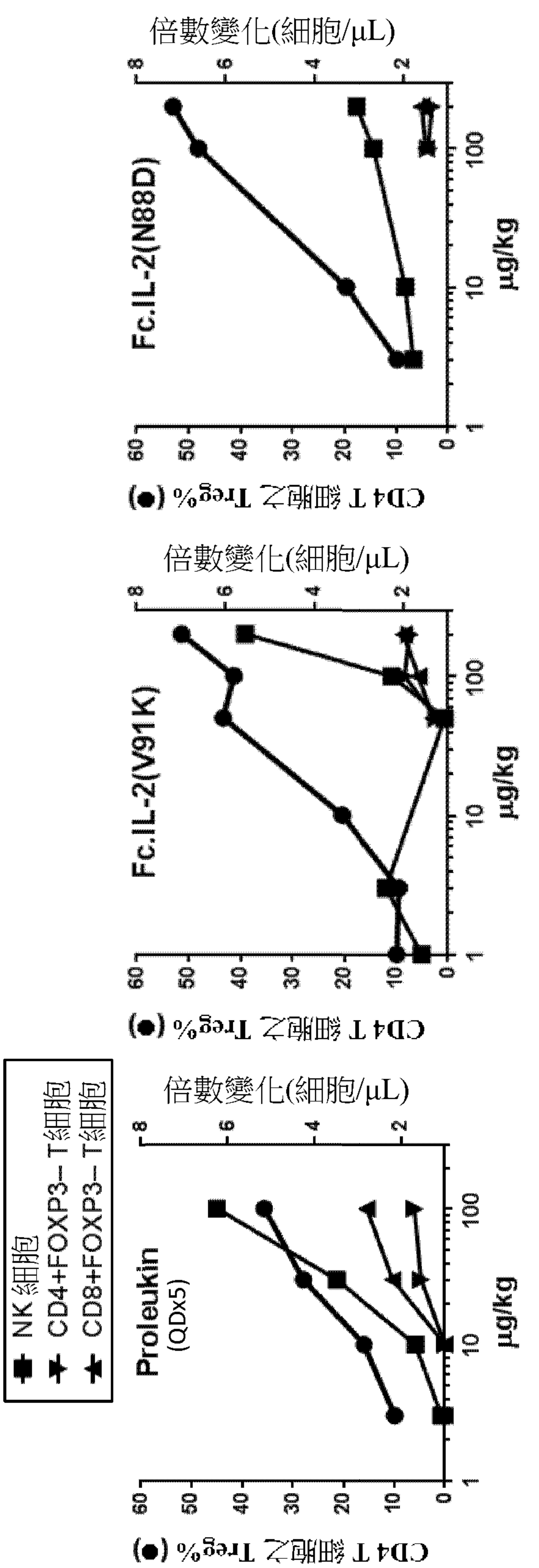

Proleukin
Fc.IL-2(V91K)
Fc.IL-2(N88D)
◇801 □802 Δ803 ○804
◇805 □806 Δ807 ○808
◇809 □810 Δ811 ○812
◇813 □814 Δ815 ○816
◇817 □818 Δ819 ○820
◇821 □822 Δ823 ○824
3 µg/kg @ 10:00
30 µg/kg @ 10:00
10 µg/kg @ 10:00
100 µg/kg @ 10:00
1 µg/kg @ 10:00
100 µg/kg @ 10:00
3 µg/kg @ 10:00
200 µg/kg @ 10:10
3 µg/kg @ 10:00
100 µg/kg @ 10:20
10 µg/kg @ 10:00
200 µg/kg @ 10:30
體溫變化(°C)
時間
天數

【圖 11E】

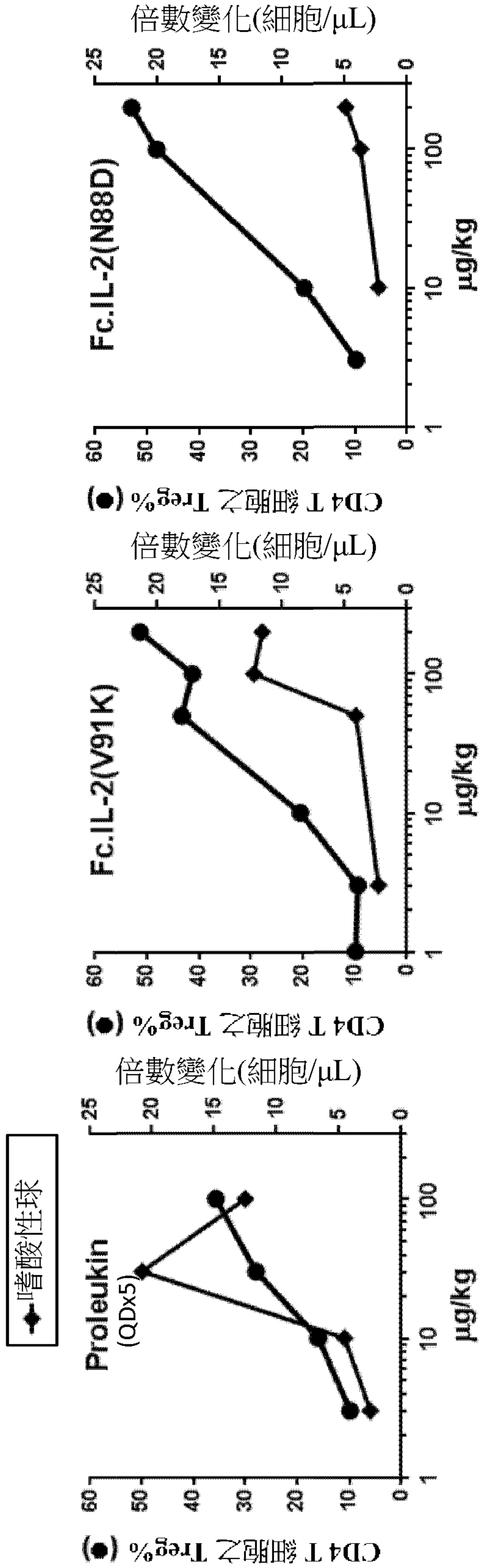


CRP (μg/mL)
Proleukin
Fc.IL-2(V91K)
Fc.IL-2(N88D)
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
3 μg/kg
30 μg/kg
10 μg/kg
100 μg/kg
1 μg/kg
100 μg/kg
3 μg/kg
200 μg/kg
3 μg/kg
100 μg/kg
10 μg/kg
200 μg/kg

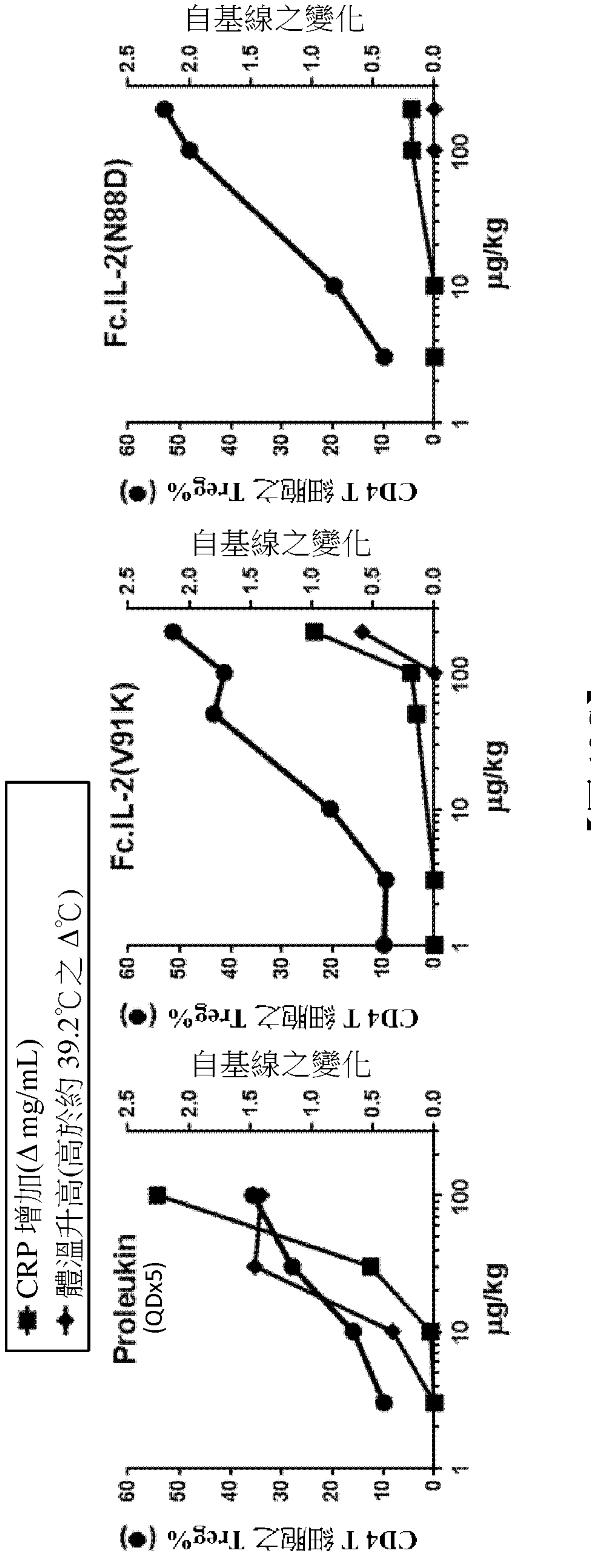
【圖 11F】


Fc.IL-2(N88D)
Fc.IL-2(V91K)
Proleukin
(QDx5)
倍數變化(細胞/μL)
CD4 T 細胞之 Treg% (●)
μg/kg
NK 細胞
CD4+FOXP3– T細胞
CD8+FOXP3– T細胞

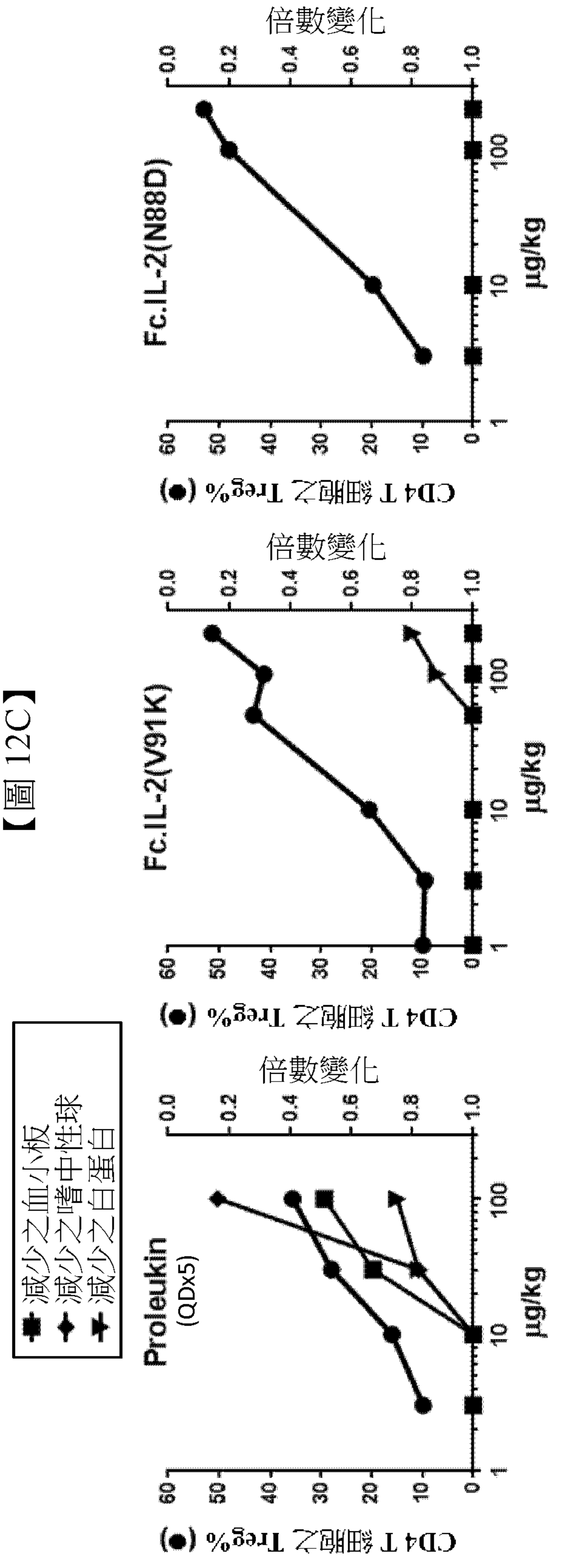
【圖 12A】


Fc.IL-2(N88D)
Fc.IL-2(V91K)
Proleukin
(QDx5)
倍數變化(細胞/μL)
CD4 T 細胞之 Treg% (●)
μg/kg
嗜酸性球

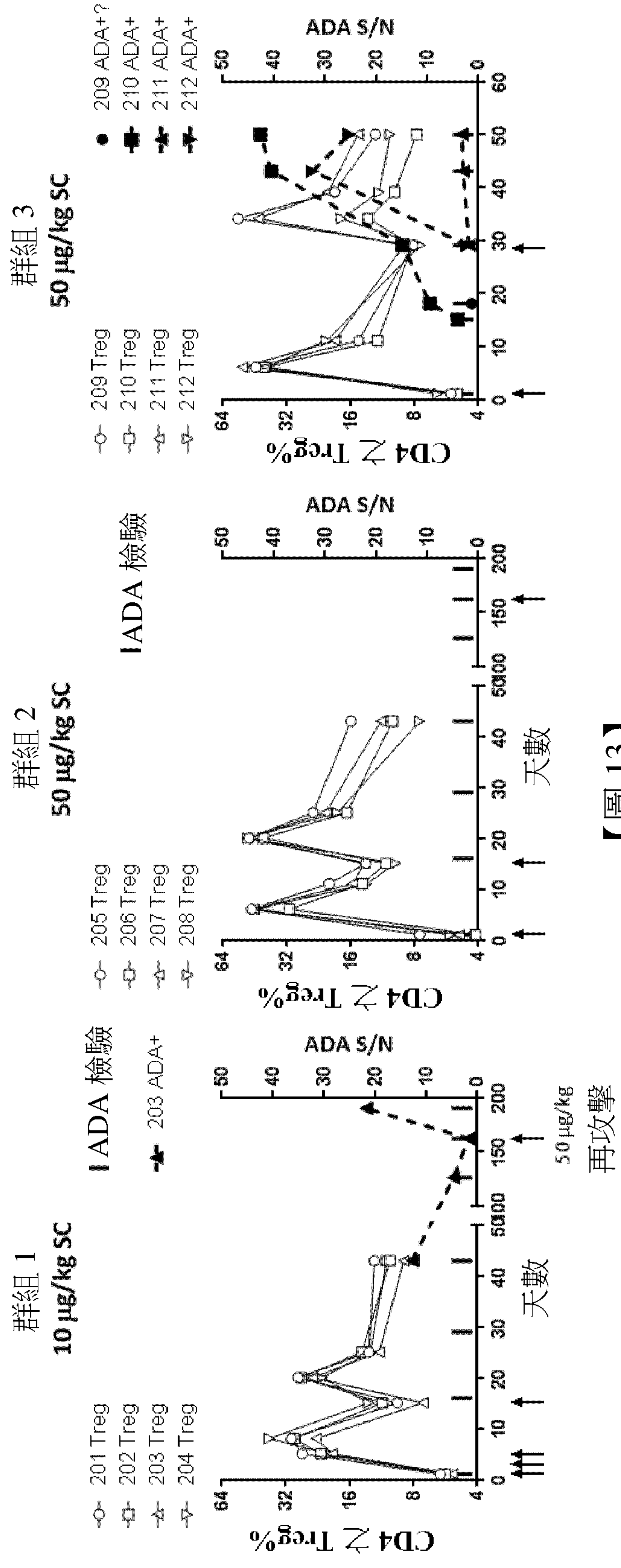
【圖 12B】


CRP 增加(Δ mg/mL)
體溫升高(高於約 39.2℃之 Δ℃)
Proleukin
(QDx5)
Fc.IL-2(V91K)
Fc.IL-2(N88D)
自基線之變化
CD4 T 細胞之 Treg% (●)
μg/kg

【圖 12C】


減少之血小板
減少之嗜中性球
減少之白蛋白
Proleukin
(QDx5)
Fc.IL-2(V91K)
Fc.IL-2(N88D)
倍數變化
CD4 T 細胞之 Treg% (●)
μg/kg

【圖 12D】


群組 1
10 μg/kg SC
201 Treg
202 Treg
203 Treg
204 Treg
IADA 檢驗
203 ADA+
CD4 之 Treg%
ADA S/N
天數
50 μg/kg
再攻擊
群組 2
50 μg/kg SC
205 Treg
206 Treg
207 Treg
208 Treg
IADA 檢驗
CD4 之 Treg%
ADA S/N
天數
群組 3
50 μg/kg SC
209 Treg
210 Treg
211 Treg
212 Treg
209 ADA+?
210 ADA+
211 ADA+
212 ADA+
CD4 之 Treg%
ADA S/N

【圖 13】