



(10) 申请公布号 CN 117024560 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 10

(21) 申请号 202310920187.6

(22) 申请日 2017.12.20

(30) 优先权数据

62/438,272 2016.12.22 US

62/470,774 2017.03.13 US

62/555,435 2017.09.07 US

62/582,132 2017.11.06 US

(62) 分案原申请数据

201780086846.3 2017.12.20

(71) 申请人 库尔生物制药有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 罗纳德·D·赛德尔三世

罗多尔福·查帕罗

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理  
有限责任公司 11258

专利代理师 蒋桂梅

(51) Int. Cl.

C07K 14/55 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书88页  
序列表(电子公布) 附图50页

(54) 发明名称

T细胞调节性多聚体多肽及其使用方法

(57) 摘要

本公开提供了变体免疫调节多肽,以及包含所述变体免疫调节肽的融合多肽。本公开提供了T细胞调节性多聚体多肽,以及包含所述T细胞调节性多聚体多肽的组合物,其中所述T细胞调节性多聚体多肽包含本公开的变体免疫调节多肽。本公开提供了包含编码所述T细胞调节性多聚体多肽的核苷酸序列的核酸,以及包含所述核酸的宿主细胞。本公开提供了调节T细胞的活性的方法;所述方法包括使所述T细胞与本公开的T细胞调节性多聚体多肽接触。

1. 一种变体IL-2多肽,其包含与SEQ ID NO:1中列出的具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,

其中所述变体IL-2多肽具有相对于SEQ ID NO:1列出的一个或多个氨基酸取代,并且

其中所述变体IL-2多肽对包含具有图3A-3C中示出的氨基酸序列的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 多肽的IL-2受体(IL2R)表现出的结合亲和力与SEQ ID NO:1之一中列出的IL-2氨基酸序列对所述IL2R的结合亲和力相比降低。

2. 权利要求1所述的变体IL2多肽,其中所述变体包含E15、H16、D20、F42、Y45和Q126中的一个或多个的取代。

3. 权利要求1或权利要求2所述的变体IL2多肽,其中所述变体免疫调节多肽对所述IL2R表现出的结合亲和力低于SEQ ID NO:1中列出的所述IL2氨基酸序列对所述IL2R表现出的结合亲和力的10%至50%。

4. 权利要求1-3中任一项所述的变体IL2多肽,其中所述变体包含用Ala、Gly、Val、Ile或Leu进行的F42的取代。

5. 权利要求1-3中任一项所述的变体IL2多肽,其中所述变体包含F42和D20的取代或F42和H16的取代。

6. 权利要求1-3中任一项所述的变体IL2多肽,其中所述变体包含F42、D20和Y45的取代;或者其中所述变体包含F42、H16和Q126的取代。

7. 一种多聚体多肽,其包含:

a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:

i) 表位;

ii) 第一主要组织相容性复合物(MHC)多肽;以及

b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:

i) 第二MHC多肽;以及

ii) 任选的免疫球蛋白(Ig)Fc多肽或非Ig支架,

其中所述多聚体多肽包含一个或多个免疫调节结构域,其中所述一个或多个免疫调节结构域是:

A) 在所述第一多肽的所述C-末端;

B) 在所述第二多肽的所述N-末端;

C) 在所述第二多肽的所述C-末端;或

D) 在所述第一多肽的所述C-末端且在所述第二多肽的所述N-末端,并且

其中所述免疫调节结构域中的至少一个是天然存在的共刺激蛋白的变体,并且其中所述变体对其对应物共刺激蛋白表现出的亲和力与所述天然存在的共刺激蛋白对所述对应物共刺激蛋白的亲和力相比降低。

8. 一种多聚体多肽,其包含:

a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:

i) 表位;

ii) 第一主要组织相容性复合物(MHC)多肽;以及

b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:

i) 第二MHC多肽;以及

ii) 任选的免疫球蛋白 (Ig)Fc 多肽或非 Ig 支架，其中所述多聚体多肽包含一个或多个免疫调节结构域，其中所述一个或多个免疫调节结构域是：

- A) 在所述第一多肽的所述 C-末端；
- B) 在所述第二多肽的所述 N-末端；
- C) 在所述第二多肽的所述 C-末端；或
- D) 在所述第一多肽的所述 C-末端且在所述第二多肽的所述 N-末端，

其中所述一个或多个免疫调节结构域中的至少一个是权利要求 1-6 中任一项所述的变体 IL2 多肽，并且

其中所述多聚体多肽对包含具有图 3A-3C 中示出的氨基酸序列的  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  多肽的 IL-2 受体 (IL2R) 表现出的结合亲和力与包含 SEQ ID NO:1 中列出的 IL2 氨基酸序列的对照多聚体多肽对所述 IL2R 多肽的结合亲和力相比降低。

9. 权利要求 8 所述的多聚体多肽，其中：

a) 所述第一多肽从 N-末端至 C-末端依次包含：

- i) 所述表位；
- ii) 所述第一 MHC 多肽；以及
- iii) 所述变体 IL2 多肽；并且

b) 所述第二多肽从 N-末端至 C-末端依次包含：

- i) 所述第二 MHC 多肽；以及
- ii) 所述 Ig Fc 多肽。

10. 权利要求 8 所述的多聚体多肽，其中：

a) 所述第一多肽从 N-末端至 C-末端依次包含：

- i) 所述表位；以及
- ii) 所述第一 MHC 多肽；并且

b) 所述第二多肽从 N-末端至 C-末端依次包含：

- i) 所述变体 IL2 多肽；
- ii) 所述第二 MHC 多肽；以及
- iii) 所述 Ig Fc 多肽。

## T细胞调节性多聚体多肽及其使用方法

[0001] 本申请是申请号为201780086846.3的中国专利申请的分案申请,原申请是申请日为2017年12月20日的国际申请PCT/US2017/067663的中国国家阶段申请。

[0002] 交叉引用

[0003] 本申请要求2016年12月22日提交的美国临时专利申请号62/438,272、2017年3月13日提交的美国临时专利申请号62/470,774、2017年9月7日提交的美国临时专利申请号62/555,435以及2017年11月6日提交的美国临时专利申请号62/582,132的权益,所述申请各自以引用的方式整体并入本文。

[0004] 以引用的方式并入呈文本文件提供的序列列表

[0005] 序列列表特此提供为2017年11月14日创建的文本文件“CUEB-107WO\_SEQ\_LISTING\_171133\_ST25.txt”并且其大小为153KB。所述文本文件的内容以引用的方式整体并入本文。

[0006] 引言

[0007] 适应性免疫应答涉及存在于T细胞表面上的T细胞受体(TCR)与抗原呈递细胞(APC)表面上非共价呈递的小肽抗原通过主要组织相容性复合物(MHC;在人类中也称为人白细胞抗原(HLA)复合物)接合。这种接合代表了免疫系统靶向机制,并且是T细胞调节(活化或抑制)和效应子功能的必需分子相互作用。在表位特异性细胞靶向后,通过APC上发现的共刺激蛋白与T细胞的对应物共刺激蛋白的接合而活化靶向的T细胞。两种信号-表位/TCR结合和APC共刺激蛋白与T细胞共刺激蛋白的接合-均是驱动T细胞特异性和活化或抑制所必需的。TCR对给定表位有特异性;然而,共刺激蛋白不是表位特异性的,而是通常在所有T细胞或大T细胞亚群上表达。

### 发明内容

[0008] 本公开提供了变体免疫调节多肽,以及包含所述变体免疫调节肽的融合多肽。本公开提供了T细胞调节性多聚体多肽,以及包含所述T细胞调节性多聚体多肽的组合物,其中所述T细胞调节性多聚体多肽包含本公开的变体免疫调节多肽。本公开提供了包含编码所述T细胞调节性多聚体多肽的核苷酸序列的核酸,以及包含所述核酸的宿主细胞。本公开提供了调节T细胞的活性的方法;所述方法包括使所述T细胞与本公开的T细胞调节性多聚体多肽接触。

### 附图说明

[0009] 图1A-1D示意性地示出本公开的T细胞调节性多聚体多肽的多种实施方案。在这些实施方案中,二硫键在单独的多肽中存在的MHC(例如,HLA)多肽之间形成。

[0010] 图2A-2Q提供野生型人IL-2的氨基酸序列(图2A);以及变体IL-2多肽的氨基酸序列(图2B-2Q)。

[0011] 图3A-3C提供IL-2受体 $\alpha$ 链(图3A)、 $\beta$ 链(图3B)以及 $\gamma$ 链(图3C)的氨基酸序列。

[0012] 图4A-4C提供免疫球蛋白Fc多肽的氨基酸序列。

[0013] 图5A-5C提供人白细胞抗原(HLA) I类重链多肽的氨基酸序列。信号序列加下划线。



[0014] 图6提供来自智人 (*Homo sapiens*) (NP\_004039.1;SEQ ID NO:95)、黑猩猩 (*Pan troglodytes*) (NP\_001009066.1;SEQ ID NO:96)、猕猴 (*Macaca mulatta*) (NP\_001040602.1;SEQ ID NO:97)、黄牛 (*Bos Taurus*) (NP\_776318.1;SEQ ID NO:98) 以及小鼠 (*Mus musculus*) (NP\_033865.2;SEQ ID NO:99) 的 $\beta$ -2微球蛋白 (B2M) 前体(即,包括前导序列)的多重氨基酸序列比对。氨基酸1-20是信号肽。

[0015] 图7A-7B示出在瞬时转染后本公开的IL-2/synTac(“Cue-IL-2-a”和Cue-IL-2-b”)的产生。图7A示出未纯化的产率;图7B示出纯化的产物。

[0016] 图8A-8B示出本公开的IL-2/synTac的产生,其中IL-2多肽存在于轻链(具有MHC I类分子的轻链(例如 $\beta$ 2M)的多肽链)或重链(具有MHC I类分子的重链的多肽链)上。

[0017] 图9示出IL-2/syn-Tac的表达水平,其中IL-2是野生型(wt)或包含F42A、D20K、Q126A、E15A、Y45A和H16A的各种组合。

[0018] 图10示出本公开的IL-2/synTac的表达,其中IL-2以一个拷贝(1X)、两个拷贝(2X)或三个拷贝(3X)存在于synTac中。

[0019] 图11示出本公开的IL-2/synTac对抗原特异性CD8<sup>+</sup>T细胞和非特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的体外刺激,其中包含F42A和H16A取代的IL-2变体以两个拷贝存在于synTac中。

[0020] 图12示出IL-2/synTac与特异性(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒;LCMV)或非特异性(OT1;识别卵白蛋白)CD8<sup>+</sup>T细胞的结合。

[0021] 图13示出抗原特异性(LCMV)或非特异性(BL6)CD8<sup>+</sup>T细胞中的IL-2/synTac介导的信号传导。

[0022] 图14A-14F示出在各种IL-2/synTac浓度下用本公开的IL-2/synTac刺激CD8<sup>+</sup>抗原特异性(LCMV)或非特异性(BL6)细胞后磷酸信号转导和转录活化因子5(pSTAT5)阳性细胞的百分比。

[0023] 图15示出本公开的IL-2/synTac的体内活性。左图示出在施用磷酸盐缓冲盐水(PBS)、重组IL-2(rIL-2)或本公开的IL-2/synTac后抗原特异性CD8<sup>+</sup>T细胞数量的倍数变化。右图示出在施用PBS、rIL-2或本公开的IL-2/synTac后的抗原特异性和非抗原特异性应答。

[0024] 图16A-16B示出剂量递增(图16A)和施用途径(图16B)效应。

[0025] 图17A-17B示出IL-2拷贝数对针对肿瘤的体内功效的影响。

[0026] 图18示出在腹膜内施用10mg/kg的量的IL-2/synTac后,本公开的IL-2/synTac的血清半衰期。

[0027] 图19示出在腹膜内施用10mg/kg的量的IL-2/synTac后2小时,本公开的IL-2/synTac的稳定性。

[0028] 图20示出在将本公开的IL-2/synTac在4°C或37°C下保持5天后,关于所述IL-2/synTac的尺寸排阻色谱数据。

[0029] 图21提供具有前导肽的本公开的IL-2/synTac的重链的氨基酸序列,其中所述IL-2/synTac重链包含具有N297A取代的IgG1 Fc。

[0030] 图22提供无前导肽的本公开的IL-2/synTac的重链的氨基酸序列,其中所述IL-2/synTac重链包含具有N297A取代的IgG1 Fc。

[0031] 图23A-23B提供编码图21中示出的IL-2/synTac重链的核苷酸序列(图23A);以及

所述序列的图例(图23B)。

[0032] 图24提供具有前导肽的本公开的IL-2/synTac的重链的氨基酸序列,其中所述IL-2/synTac重链包含具有L234A和L235A取代的IgG1Fc。

[0033] 图25提供无前导肽的本公开的IL-2/synTac的重链的氨基酸序列,其中所述IL-2/synTac重链包含具有L234A和L235A取代的IgG1Fc。

[0034] 图26A-26B提供编码图24中示出的IL-2/synTac重链的核苷酸序列(图26A);以及所述序列的图例(图26B)。

[0035] 图27提供具有前导肽的本公开的IL-2/synTac的重链的氨基酸序列,其中所述IL-2/synTac重链包含具有L234F、L235E和P331S取代的IgG1 Fc。

[0036] 图28提供无前导肽的本公开的IL-2/synTac的重链的氨基酸序列,其中所述IL-2/synTac重链包含具有L234F、L235E和P331S取代的IgG1 Fc。

[0037] 图29A-29B提供编码图27中示出的IL-2/synTac重链的核苷酸序列(图29A);以及所述序列的图例(图29B)。

[0038] 图30提供具有前导肽的本公开的IL-2/synTac的轻链的氨基酸序列,其中所述IL-2/synTac轻链包含人乳头瘤病毒(HPV)E7表位。

[0039] 图31提供无前导肽的本公开的IL-2/synTac的轻链的氨基酸序列,其中所述IL-2/synTac轻链包含HPV E7表位。

[0040] 图32提供编码图30中示出的IL-2/synTac轻链的核苷酸序列。

[0041] 图33A-33D提供野生型人IgG1 Fc(图33A)、具有L234F、L235E和P331S取代的IgG1 Fc(图33B)、具有N297A取代的IgG1 Fc(图33C)和具有L234A和L235A取代的IgG1 Fc(图33D)的氨基酸序列。

[0042] 图34A-34C提供 $\beta$ 2-微球蛋白(R12C)多肽(图34A)、变体IL-2(H16A;F42A)多肽(图34B)和I类MHC-H链A0201(Y84A;A236C)(图34C)的氨基酸序列。

[0043] 图35示出IL-2/synTac介导的人CMV特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的扩增。

[0044] 图36提供具有变体IL-2多肽的synTac的表达数据和受体结合数据。

[0045] 图37示出如通过流式细胞术检测的IL-2/synTac与原代人HPV16 E7(11-20)特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的结合。

[0046] 图38示出变体IL-2/synTac与原代人HPV16 E7(11-20)特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的结合对SLP76的磷酸化的影响。

[0047] 图39示出变体IL-2/synTac与原代人HPV16 E7(11-20)特异性T细胞的结合对CD25、颗粒酶B和CD107 $\alpha$ 的产生的影响。

[0048] 图40示出变体IL-2/synTac与原代人HPV16 E7(11-20)特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的结合对IFN- $\gamma$ 的产生的影响。

[0049] 定义

[0050] 本文可互换使用的术语“多核苷酸”和“核酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合形式。因此,此术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交体、或包含嘌呤碱基和嘧啶碱基或其他天然的、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基的聚合物。

[0051] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用并且是指具有任何长度的氨基

酸的聚合形式,其可包括编码和非编码的氨基酸、化学或生物化学修饰的或衍生的氨基酸以及具有修饰的肽主链的多肽。

[0052] 多核苷酸或多肽与另一多核苷酸或多肽具有一定百分比的“序列同一性”,这意味着当比对时,当比较两个序列时,所述百分比的碱基或氨基酸是相同的,并且处于相同的相对位置中。可以许多不同的方式来确定序列同一性。为了确定序列同一性,可使用在包括 [ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)、[ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/](http://ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/)、[ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/](http://ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/)、[mafft.cbrc.jp/alignment/software/](http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/) 的万维网网址上可获得的各种方便的方法和计算机程序(例如,BLAST、T-COFFEE、MUSCLE、MAFFT等)来比对序列。参见,例如Altschul等人(1990),*J.Mol.Biol.* 215:403-10。

[0053] 术语“保守氨基酸取代”是指具有相似侧链的氨基酸残基的蛋白质中的可互换性。例如,具有脂肪族侧链的一组氨基酸由甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸组成;具有脂肪族-羟基侧链的一组氨基酸由丝氨酸和苏氨酸组成;具有含酰胺侧链的一组氨基酸由天冬酰胺和谷氨酰胺组成;具有芳香族侧链的一组氨基酸由苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸组成;具有碱性侧链的一组氨基酸由赖氨酸、精氨酸和组氨酸组成;具有酸性侧链的一组氨基酸由谷氨酸酯和天冬氨酸酯组成;并且具有含硫侧链的一组氨基酸由半胱氨酸和甲硫氨酸组成。示例性保守氨基酸取代基团是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸-甘氨酸以及天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0054] 如本文所用的“结合”(例如参考本公开的T细胞调节性多聚体多肽与T细胞上的多肽(例如,T细胞受体)的结合)是指之间的非共价相互作用。结合相互作用通常特征在于解离常数( $K_D$ )小于 $10^{-6}$ M、小于 $10^{-7}$ M、小于 $10^{-8}$ M、小于 $10^{-9}$ M、小于 $10^{-10}$ M、小于 $10^{-11}$ M、小于 $10^{-12}$ M、小于 $10^{-13}$ M、小于 $10^{-14}$ M或小于 $10^{-15}$ M。“亲和力”是指结合强度,增加的结合亲和力与较低的 $K_D$ 相关。

[0055] 如本文所用的术语“免疫突触”或“免疫突触”通常是指适应性免疫应答的两种相互作用免疫细胞之间的天然界面,包括例如抗原呈递细胞(APC)或靶细胞与效应细胞,例如淋巴细胞、效应T细胞、天然杀伤细胞等之间的界面。APC与T细胞之间的免疫突触通常由T细胞抗原受体与主要组织相容性复合物分子的相互作用引发,例如,如Bromley等人,*Annu Rev Immunol.* 2001;19:375-96中所描述;所述参考文献的公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0056] “T细胞”包括所有类型的表达CD3的免疫细胞,包括T-辅助细胞( $CD4^+$ 细胞)、细胞毒性T-细胞( $CD8^+$ 细胞)、T-调控细胞(Treg)以及NK-T细胞。

[0057] “共刺激多肽”(如所述术语在本文中使用的)包括特异性结合T细胞上的同源共刺激多肽的抗原呈递细胞(APC)(例如,树突细胞、B细胞等)上的多肽,从而提供除了由例如TCR/CD3复合物与负载有肽的主要组织相容性复合物(MHC)多肽的结合提供的主要信号之外的信号,所述信号介导T细胞应答,包括但不限于增殖、活化、分化等。共刺激配体可包括但不限于CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、Fas配体(FasL)、诱导型共刺激配体(ICOS-L)、细胞间粘附分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素 $\beta$ 受体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、结合Toll配体受体的激动剂或抗体以及与B7-H3特异性结合的配体。共刺激配体还尤其包括与T细胞上存在的共刺激分子特异性结合的抗体,如但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗

原-1 (LFA-1)、CD2、LIGHT、NKG2C、B7-H3以及特异性结合CD83的配体。

[0058] 本公开的T细胞调节性多聚体多肽的“调节结构域”(“MOD”)包含共刺激多肽,例如IL-2多肽,如本公开的变体IL-2多肽。

[0059] 如本文所用的“异源的”是指分别不存在于天然核酸或蛋白质中的核苷酸或多肽。

[0060] 如本文所使用的“重组”意指具体核酸(DNA或RNA)为克隆、限制、聚合酶链反应(PCR)和/或连接步骤的各种组合的产物,所述步骤产生具有可与天然系统中发现的内源核酸区别开的结构编码或非编码序列的构建体。编码多肽的DNA序列可从cDNA片段或从一系列合成寡核苷酸组装,以提供能够从包含在细胞中或无细胞转录和翻译系统中的重组转录单元表达的合成核酸。

[0061] 术语“重组表达载体”或“DNA构建体”在本文中可互换用于指包含载体和一种插入物的DNA分子。通常出于表达和/或繁殖插入物的目的或出于构建其他重组核苷酸序列而产生重组表达载体。所述插入物可以或可以不与启动子序列可操作地连接,并且可以或可以不与DNA调控序列可操作地连接。

[0062] 当此类DNA引入到细胞内部时,细胞被外源DNA例如重组表达载体“遗传修饰”或“转化”或“转染”。外源DNA的存在导致永久或瞬时遗传变化。转化DNA可以或可以不整合(共价连接)到细胞的基因组中。在例如原核生物、酵母和哺乳动物细胞中,转化DNA可维持在游离元件如质粒上。相对于真核细胞,稳定转化的细胞为其中转化DNA逐渐整合到染色体中使得通过染色体复制遗传给子细胞的一种细胞。

[0063] 如本文所用的“宿主细胞”指代体内或体外真核细胞或作为单细胞实体培养的来自多细胞生物的细胞(例如,细胞系),所述真核细胞可用作或已用作核酸的受体(例如,包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列的表达载体),并且包括已经通过核酸遗传修饰的原始细胞的子代。应该理解由于天然、偶然或有意突变,单细胞的子代可不必在形态或在基因组或总DNA互补序列上与原始亲本完全相同。“重组宿主细胞”(又称为“遗传修饰的宿主细胞”)是已将异源核酸例如表达载体引入到其中的宿主细胞。例如,遗传修饰的真核宿主细胞通过将异源核酸(例如,对真核宿主细胞来说外来的外源性核酸,或通常不存在于真核宿主细胞中的重组核酸)引入到合适的真核宿主细胞中而进行遗传修饰。

[0064] 本文使用术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等一般意指获得希望的药理作用和/或生理作用。所述作用就完全或部分预防疾病或其症状而言可为防治性的和/或就部分或完全治愈疾病和/或可归因于所述疾病的不利作用而言可为治疗性的。如本文所用的“治疗”涵盖哺乳动物体内疾病或症状的任何治疗,并且包括:(a)预防疾病或症状在可易于获得所述疾病或症状但尚未诊断为患有所述疾病或症状的受试者体内发生;(b)抑制所述疾病或症状,即阻止其发展;或(c)减轻所述疾病,即引起所述疾病消退。可在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用治疗剂。其中治疗使患者的不良临床症状稳定或减轻的持续疾病的治疗特别令人感兴趣。期望在受影响的组织中完全丧失功能之前进行这种治疗。将希望在疾病的症状阶段期间,并且在一些情况下在疾病的症状阶段之后施用主题疗法。

[0065] 术语“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”在本文中可互换使用并且是指希望诊断、治疗或疗法的任何哺乳动物受试者。哺乳动物包括例如人、非人灵长类动物、啮齿类动物(例如,大鼠;小鼠)、兔类动物(例如兔)、有蹄类动物(例如,牛、绵羊、猪、马、山羊等)等。

[0066] 在进一步描述本发明之前,应当理解本发明不限于所描述的特定实施方案,因而,

当然也可有所变化。还应理解,本文使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并且并不意图是限制性的,因为本发明的范围将仅受所附权利要求限制。

[0067] 在提供一个范围的值时,应当理解的是每个中间值到下限的第十个单位(除非上下文另外清晰地指示)、该范围的上限与下限之间以及任何其他陈述的或在陈述范围内的中间值都被涵盖在本发明之内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在所陈述的较小范围内,并且也包括在本发明内,服从所陈述范围中任何特别排除的限值。在所陈述范围包括所述极限值中的一个或两个的情况下,本发明中还包括排除那些所包括的极限值中的任一个或两个的范围。

[0068] 除非另外定义,在此使用的所有技术性和科学性术语具有与本发明所属领域的技术人员通常所理解的相同的含义。虽然在实践或检测本发明时也可使用与本文中描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料,但是现在描述优选的方法和材料。为了公开和描述公布在引用时所涉及的方法和/或材料,本文中提到的所有公布均以引用的方式并入本文。

[0069] 必须指出,除非上下文另外明确地规定,否则如本文和所附权利要求书中所用,不使用数量词修饰时涵盖复数指示物。因此,例如,提及“变体IL-2多肽”包括多种此类多肽并且提及“I类HLA重链多肽”包括提及一种或多种I类HLA重链多肽及其本领域技术人员已知的等效物,等等。进一步指出,权利要求书可经拟订以排除任何任选的要素。因此,此表述意图作为在列举权利要求要素时使用诸如“单独地”、“仅仅”等的独占性术语或使用“否定”限制的先行基础。

[0070] 应理解的是,为清楚起见在单独的实施方案的上下文中描述的本发明的某些特征也可在单个实施方案中组合提供。相反,为简洁起见而在单个实施方案的背景下描述的本发明的不同特征也可单独地或以任何适合的子组合形式提供。与本发明有关的实施方案的所有组合由本发明具体包括,并且在本文中公开,如同每个和每一组合均单独地且明确地公开一样。此外,各种实施方案及其要素的所有子组合也明确地由本发明涵盖并且在本文中公开,如同每个和每一这样的子组合均单独地且明确地在本文中公开一样。

[0071] 本文中讨论的出版物仅提供它们在本申请的提交日期之前的公开内容。本文没有任何内容被解释为承认本发明不能由于现有发明而有权先于这种公布。此外,所提供的出版日期可不同于实际出版日期,其可能需要单独证实。

## 具体实施方式

[0072] 本公开提供了变体免疫调节多肽,以及包含所述变体免疫调节肽的融合多肽。本公开提供了T细胞调节性多聚体多肽,以及包含所述T细胞调节性多聚体多肽的组合物,其中所述T细胞调节性多聚体多肽包含本公开的变体免疫调节多肽。本公开提供了包含编码所述T细胞调节性多聚体多肽的核苷酸序列的核酸,以及包含所述核酸的宿主细胞。本公开提供了调节T细胞的活性的方法;所述方法包括使所述T细胞与本公开的T细胞调节性多聚体多肽接触。

[0073] 在本文所述的实施方案中,多聚体多肽充当替代(surrogate)APC,并模拟适应性免疫应答。多聚体多肽通过使存在于T细胞表面上的TCR与表位呈递肽接合来实现,所述表位呈递肽与多聚体多肽中存在的MHC复合。这种接合为多聚体多肽提供实现表位特异性细

胞靶向的能力。在本文所述的实施方案中,所述多聚体多肽还具有至少一种免疫调节蛋白(在本文中也称为“调节结构域”或“MOD”),所述至少一种免疫调节蛋白接合T细胞上的对应物共刺激蛋白(在本文中也称为“免疫调节多肽”、“同源免疫调节多肽”或“同源共刺激蛋白”等)。信号-表位/MHC与TCR的结合和免疫调节多肽与同源共刺激多肽的结合两者然后驱动所需的T细胞特异性和抑制或活化/增殖。如本文进一步描述的,所述至少一种免疫调节蛋白可以是天然存在的免疫调节蛋白(例如,天然存在的IL-2)的变体,所述变体对T细胞上的其对应物共刺激蛋白(例如,IL-2R)表现出的亲和力与天然存在的免疫调节蛋白对所述对应物共刺激蛋白的亲和力相比降低。

[0074] 本公开的T细胞调节性多聚体多肽也称为“synTac多肽”。本公开的synTac多肽包含变体调节结构域,其中所述变体调节结构域对免疫调节多肽(同源共刺激多肽,例如T细胞表面上的同源共刺激多肽)表现出的结合亲和力与野生型调节结构域对所述免疫调节多肽的亲和力相比降低。本公开的synTac多肽可调节靶T细胞的活性。本公开的synTac多肽提供增强的靶细胞特异性。

[0075] 变体免疫调节多肽

[0076] 本公开提供了变体IL-2调节多肽。人IL-2的野生型氨基酸序列提供于图2A中。人IL-2多肽的野生型氨基酸序列可以是如下: APT

SSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TEKFY  
MPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISN  
IN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNRWITFCQSIIS TLT

(SEQ ID NO:1)。

[0077] 野生型IL-2结合至细胞表面上的IL-2受体(IL-2R)。IL-2受体在某些情况下是异三聚体多肽,其包含 $\alpha$ 链(IL-2R $\alpha$ ;也称为CD25)、 $\beta$ 链(IL-2R $\beta$ ;也称为CD122)以及 $\gamma$ 链(IL-2R $\gamma$ ;也称为CD132)。人IL-2R $\alpha$ 、IL-2R $\beta$ 和IL-2R $\gamma$ 的氨基酸序列提供于图3A-3C中。

[0078] 在一些情况下,与包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL-2R的结合亲和力相比,本公开的变体IL-2多肽对IL-2R表现出降低的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽结合IL-2R的结合亲和力小于包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL-2R多肽的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽结合IL-2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL-2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL-2R)的结合亲和力低至少5%、低至少10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在此类情况下,使用下文描述的程序测定结合亲和力。

[0079] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽对IL-2R具有100nM至100 $\mu$ M的结合亲和力。作为另一个实例,在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽对IL-2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL-2R)具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约

900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在此类情况下,使用下文描述的程序测定结合亲和力。

[0080] 本公开的变体IL-2多肽可相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有单个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有2至10个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有2个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有3个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有4个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有5个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有6个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有7个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有8个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有9个氨基酸取代。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有10个氨基酸取代。

[0081] 本公开的变体IL-2多肽可具有120个氨基酸至140个氨基酸、例如120个氨基酸至125个氨基酸、125个氨基酸至130个氨基酸、130个氨基酸至135个氨基酸或135个氨基酸至140个氨基酸的长度。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0082] E15取代

[0083] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2D中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸15是除谷氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸15是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Asp。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2D中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸15是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2D中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸15是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2D中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸15是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2D中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸15是Val。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽

包含与图2D中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸15是Leu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2D中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸15是Ile。在一些情况下,上文描述的E15取代变体IL-2多肽对IL2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,此类变体IL-2多肽结合IL-2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL-2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL-2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下,这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0084] H16取代

[0085] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是除组氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸16是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Val。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Leu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Asn。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Asp。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Cys。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,



其中氨基酸16是Gln。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Glu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Met。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Phe。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Ser。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Thr。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Trp。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Tyr。在一些情况下,上文描述的H16取代变体IL-2多肽对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,此类变体IL-2多肽结合IL-2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL-2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL-2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下,这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

#### [0086] D20取代

[0087] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2C中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2C中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2C中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸20是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2C中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸20是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2C中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸20是Val。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2C中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序

列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸20是Leu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2C中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸20是Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2C中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2C中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸20是Lys。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2C中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸20是Asn。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2C中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸20是Gln。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2C中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸20是His。在一些情况下,上文描述的D20取代变体IL-2多肽对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,此类变体IL-2多肽结合IL-2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL-2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL-2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下,这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0088] F42取代

[0089] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2B中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2B中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2B中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2B中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2B中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2B中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含

与图2B中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile。在一些情况下,上文描述的F42取代变体IL-2多肽对IL2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,此类变体IL-2多肽结合IL2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下,这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0090] Y45取代

[0091] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2F中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸45是除酪氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸45是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2F中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2F中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸45是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2F中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸45是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2F中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸45是Val。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2F中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸45是Leu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2F中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸45是Ile。在一些情况下,上文描述的Y45取代变体IL-2多肽对IL2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,此类变体IL-2多肽结合IL2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少

85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下,这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0092] Q126取代

[0093] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2G中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸126是除谷氨酰胺以外的氨基酸,例如,其中氨基酸126是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Iys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2G中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2G中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2G中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸126是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2G中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸126是Val。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2G中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸126是Leu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2G中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸126是Ile。在一些情况下,上文描述的Q126取代变体IL-2多肽对IL2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,此类变体IL-2多肽结合IL2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下,这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0094] F42和H16取代

[0095] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2H中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;并且其中氨基酸16是除组氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸16是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2H中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一

些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2H中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2H中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2H中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2H中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2H中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,上文描述的F42/H16取代变体IL-2多肽对IL2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,此类变体IL-2多肽结合IL2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下,这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0096] F42和D20取代

[0097] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;并且其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸20是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸20是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少

90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val并且氨基酸20是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu并且氨基酸20是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile并且氨基酸20是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸20是Asn。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸20是Gln。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸20是Lys。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸20是Arg。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸20是His。在一些情况下,上文描述的F42/D20取代变体IL-2多肽对IL2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,此类变体IL-2多肽结合IL2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下,这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0098] F42、D20和E15取代

[0099] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu;并且其中氨基酸15是除谷氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸15是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Asp。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸15是

Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His;并且其中氨基酸15是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Ala,并且氨基酸15是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gly,并且氨基酸15是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val,氨基酸20是Ala,并且氨基酸15是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu,氨基酸20是Ala,并且氨基酸15是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile,氨基酸20是Ala,并且氨基酸15是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gln,并且氨基酸15是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Lys,并且氨基酸15是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Arg,并且氨基酸15是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是His,并且氨基酸15是Ala。在一些情况下,上文描述的F42/D20/E15取代变体IL-2多肽对IL2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,此类变体IL-2多肽结合IL2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下,这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0100] F42、D20和H16取代

[0101] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu;并且其中氨基酸16是除组氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸16是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gly,并且氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val,氨基酸20是Ala,并且氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu,氨基酸20是Ala,并且氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile,氨基酸20是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Asn,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gln,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Lys,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Arg,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是His,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,上文描述的F42/D20/H16取代变体IL-2多肽对IL2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约



400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,此类变体IL-2多肽结合IL2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下,这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0102] F42、D20和Q126取代

[0103] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu;并且其中氨基酸126是除谷氨酰胺以外的氨基酸,例如其中氨基酸126是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His;并且其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Ala,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gly,并且氨基酸126是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val,氨基酸20是Ala,并且氨基酸126是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu,氨基酸20是Ala,并且氨基酸126是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile,氨基酸20是Ala,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Asn,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基

酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gln,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Lys,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Arg,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是His,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,上文描述的F42/D20/Q126取代变体IL-2多肽对IL2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,此类变体IL-2多肽结合IL2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下,这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0104] F42、D20和Y45取代

[0105] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu;并且其中氨基酸45是除酪氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸45是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His;并且其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Ala,并且氨基酸45是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gly,并且氨基酸45是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至

少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val,氨基酸20是Ala,并且氨基酸45是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu,氨基酸20是Ala,并且氨基酸45是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile,氨基酸20是Ala,并且氨基酸45是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Asn,并且氨基酸45是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gln,并且氨基酸45是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Lys,并且氨基酸45是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Arg,并且氨基酸45是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是His,并且氨基酸45是Ala。在一些情况下,上文描述的F42/D20/Y45取代变体IL-2多肽对IL2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,此类变体IL-2多肽结合IL2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下,这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0106] F42、D20、Y45和H16取代

[0107] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu;其中氨基酸45是除酪氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸45是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;并且其中氨基酸16是除组氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸16是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、Asp或Glu。在一些情况下,本公开

的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His;其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Ala,氨基酸45是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gly,氨基酸45是Gly,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val,氨基酸20是Ala,氨基酸45是Gly,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile,氨基酸20是Ala,氨基酸45是Ala,并且氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Asn,氨基酸45是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gln,氨基酸45是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Lys,氨基酸45是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Arg,氨基酸45是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,上文描述的F42/D20/Y45/H16取代变体IL-2多肽对IL2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,此类变体IL-2多肽结合IL2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL2R(例如,包含含有图

3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下,这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0108] F42、D20、Y45和Q126取代

[0109] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu;其中氨基酸45是除酪氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸45是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;并且其中氨基酸126是除谷氨酰胺以外的氨基酸,例如其中氨基酸126是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His;其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Ala,氨基酸45是Ala,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gly,氨基酸45是Gly,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val,氨基酸20是Ala,氨基酸45是Gly,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu,氨基酸20是Ala,氨基酸45是Gly,并且氨基酸126是Val。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile,氨基酸20是Ala,氨基酸45是Ala,并且氨基酸126是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Asn,氨基酸45是Ala,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的

氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gln,氨基酸45是Ala,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Lys,氨基酸45是Ala,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Arg,氨基酸45是Ala,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是His,氨基酸45是Ala,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,上文描述的F42/D20/Y45/Q126取代变体IL-2多肽对IL2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,此类变体IL-2多肽结合IL2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下,这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0110] F42、D20、Y45、H16和Q126取代

[0111] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu;其中氨基酸45是除酪氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸45是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸126是除谷氨酰胺以外的氨基酸,例如其中氨基酸126是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu;并且其中氨基酸16是除组氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸16是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His;其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸126是Ala、Gly、

Val、Leu或Ile；并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下，本公开的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Ala，氨基酸45是Ala，氨基酸126是Ala，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Gly，氨基酸45是Gly，氨基酸126是Ala，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Val，氨基酸20是Ala，氨基酸45是Gly，氨基酸126是Ala，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Leu，氨基酸20是Ala，氨基酸45是Gly，氨基酸126是Val，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ile，氨基酸20是Ala，氨基酸45是Ala，氨基酸126是Gly，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Asn，氨基酸45是Ala，氨基酸126是Ala，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Gln，氨基酸45是Ala，氨基酸126是Ala，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Lys，氨基酸45是Ala，氨基酸126是Ala，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Arg，氨基酸45是Ala，氨基酸126是Ala，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是His，氨基酸45是Ala，氨基酸126是Ala，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，上文描述的F42/D20/Y45/H16/Q126取代变体IL-2多肽对IL2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下，此类变体IL-2多肽结合IL2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL2R（例如，包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列（成熟形式）的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL2R）的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下，这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的

长度。

[0112] F42、Q126和H16取代

[0113] 在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸126是除谷氨酰胺以外的氨基酸,例如其中氨基酸126是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu;并且其中氨基酸16是除组氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸16是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸126是Asn、Gln、Lys、Arg或His;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸126是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸126是Gly,并且氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val,氨基酸126是Ala,并且氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu,氨基酸126是Ala,并且氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile,氨基酸126是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸126是Asn,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸126是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸126是Lys,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸126是Arg,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸126是His,并且氨基



酸16是A1a。在一些情况下，F42/Q126/H16取代变体IL-2多肽对IL2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下，此类变体IL-2多肽结合IL2R的结合亲和力比包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL2R(例如，包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的IL2R)的结合亲和力低至少5%、低10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。在一些情况下，这种变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

#### [0114] 融合多肽

[0115] 本公开提供了IL-2融合多肽。本公开的融合多肽包含：a) 本公开的变体IL-2多肽；以及b) 异源融合配偶体。在一些情况下，所述异源融合配偶体融合至变体IL-2多肽的N-末端。在一些情况下，所述异源融合配偶体融合至变体IL-2多肽的C-末端。在一些情况下，本公开的IL-2融合多肽包含与变体IL-2多肽的N-末端融合的第一异源融合配偶体，以及与变体IL-2多肽的C-末端融合的第二异源融合配偶体。

[0116] 本公开的IL-2融合多肽的总长度可在135个氨基酸至2000个氨基酸的范围内。例如，本公开的IL-2融合多肽可在135个氨基酸至150个氨基酸、150个氨基酸至175个氨基酸、175个氨基酸至200个氨基酸、200个氨基酸至225个氨基酸、225个氨基酸至250个氨基酸、250个氨基酸至275个氨基酸、275个氨基酸至300个氨基酸、300个氨基酸至350个氨基酸、350个氨基酸、350个氨基酸至400个氨基酸、400个氨基酸、400个氨基酸至450个氨基酸、450个氨基酸至500个氨基酸、500个氨基酸至600个氨基酸、600个氨基酸至700个氨基酸、700个氨基酸至800个氨基酸、800个氨基酸至900个氨基酸、900个氨基酸至1000个氨基酸、1000个氨基酸至1250个氨基酸、1250个氨基酸至1500个氨基酸、1500个氨基酸至1750个氨基酸或1750个氨基酸至2000个氨基酸的范围内。

[0117] 合适的融合配偶体包括但不限于，跨膜结构域；抗体Fc区；抗体的抗原结合区；细胞因子(除IL-2外)；免疫调节结构域；细胞内信号传导结构域；等。

#### [0118] T细胞调节多聚体多肽

[0119] 本公开提供了多聚体(例如，异二聚体、异三聚体)多肽。所述多聚体多肽是T细胞调节性多肽，并且在本文中也称为“T细胞调节性多聚体多肽”或“synTac”(对于“T细胞活化的免疫突触”而言)。图1A-1D提供本公开的T细胞调节性多聚体多肽的示意性描述。本公开的T细胞调节性多聚体多肽也称为“IL-2/synTac”、“synTac多肽”或“多聚体多肽”。

[0120] 在一些情况下，本公开的synTac多肽包含野生型IL-2多肽。在一些情况下，本公开的synTac多肽包含野生型IL-2多肽的单个拷贝。在一些情况下，本公开的synTac多肽包含野生型IL-2多肽的两个拷贝。在一些情况下，本公开的synTac多肽包含野生型IL-2多肽的三个拷贝。在一些情况下，所述野生型IL-2多肽包含与图2A中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0121] 在一些情况下，本公开的synTac多肽包含本公开的变体IL-2多肽。如上所述，与野

生型IL-2与IL-2R的结合亲和力相比,存在于本公开的多聚体多肽中的变体IL-2多肽对IL-2R表现出降低的结合亲和力。与包含野生型IL-2的对照多聚体多肽对IL-2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 多肽的IL-2R)相比,包含本公开的变体IL-2多肽的本公开的多聚体多肽也对IL-2R表现出降低的结合亲和力。

[0122] 在一些情况下,与包含图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽对IL-2R的结合亲和力相比,本公开的synTac多肽对IL-2R表现出降低的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合IL-2R的结合亲和力小于包含含有图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽的对照synTac多肽对包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 多肽的IL-2R的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽结合IL-2R的结合亲和力比包含含有图2A中示出的氨基酸序列的IL-2多肽的对照synTac多肽对IL-2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 多肽的IL-2R)的结合亲和力低至少10%、低至少15%、低至少20%、低至少25%、低至少30%、低至少35%、低至少40%、低至少45%、低至少50%、低至少55%、低至少60%、低至少65%、低至少70%、低至少75%、低至少80%、低至少85%、低至少90%、低至少95%或低超过95%。

[0123] 在一些情况下,本公开的synTac多肽对IL-2R具有100nm至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,本公开的synTac多肽对IL-2R具有约100nM至500nM的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽对IL-2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 多肽的IL-2R)具有约100nM至约150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约450nM或约450nM至约500nM的结合亲和力。在一些情况下,本公开的synTac多肽对IL-2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 多肽的IL-2R)具有约500nM至1 $\mu$ M的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽对IL-2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 多肽的IL-2R)具有约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM或约900nM至约1 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,本公开的synTac多肽对IL-2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 多肽的IL-2R)具有约1 $\mu$ M至10 $\mu$ M的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽对IL-2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 多肽的IL-2R)具有约1 $\mu$ M至2 $\mu$ M、约2 $\mu$ M至约3 $\mu$ M、约3 $\mu$ M至约4 $\mu$ M、约4 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约6 $\mu$ M、约6 $\mu$ M至约7 $\mu$ M、约7 $\mu$ M至约8 $\mu$ M、约8 $\mu$ M至约9 $\mu$ M或约9 $\mu$ M至约10 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,本公开的synTac多肽对IL-2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 多肽的IL-2R)具有约10 $\mu$ M至100 $\mu$ M的结合亲和力。例如,在一些情况下,本公开的synTac多肽对IL-2R(例如,包含含有图3A-3C中示出的氨基酸序列(成熟形式)的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 多肽的IL-2R)具有约10 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约30 $\mu$ M、约30 $\mu$ M至约40 $\mu$ M、约40 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约60 $\mu$ M、约60 $\mu$ M至约70 $\mu$ M、约70 $\mu$ M至约80 $\mu$ M、约80 $\mu$ M至约90 $\mu$ M或约90 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。

[0124] 测定结合亲和力

[0125] 免疫调节多肽与其同源共免疫调节多肽之间的结合亲和力可通过使用纯化的免疫调节多肽和纯化的同源共免疫调节多肽的生物层干涉测量法(BLI)来测定。本公开的synTac与其同源共免疫调节多肽之间的结合亲和力也可使用纯化的synTac和同源共免疫

调节多肽通过BLI来测定。BLI方法是本领域技术人员熟知的。参见例如,Lad等人(2015) J. Biomol. Screen. 20(4):498-507;以及Shah和Duncan(2014) J. Vis. Exp. 18:e51383。本公开中描述的免疫调节多肽与其同源共免疫调节多肽之间或synTac与其同源共免疫调节多肽之间的特异性和相对结合亲和力可使用以下程序测定。

[0126] 为了测定本公开的synTac与其同源共免疫调节多肽之间的结合亲和力,可使用Octet RED 96(Pal FortéBio)仪器或类似仪器如下进行BLI测定。为了测定T细胞调节性多聚体多肽(例如,本公开的synTac;或对照T细胞调节性多聚体多肽(其中对照T细胞调节性多聚体多肽包含野生型免疫调节多肽)的结合亲和力),将所述T细胞调节性多聚体多肽固定到不溶性载体(“生物传感器”)上。固定的T细胞调节性多聚体多肽是“靶标”。固定化可通过将捕获抗体固定到不溶性载体上来实现,其中所述捕获抗体固定所述T细胞调节性多聚体多肽。例如,可通过将抗Fc(例如,抗人IgG Fc)抗体固定到不溶性载体上来实现固定,其中所述固定的抗Fc抗体结合至并固定T细胞调节性多聚体多肽(其中所述T-细胞调节性多聚体多肽包含IgFc多肽)。将共免疫调节多肽以几种不同的浓度施加至所述固定的T细胞调节性多聚体多肽,并记录仪器的响应。测定在包含25mM HEPES pH 6.8、5%聚(乙二醇)6000、50mM KCl、0.1%牛血清白蛋白和0.02%Tween 20非离子洗涤剂的液体培养基中进行。共免疫调节多肽与固定的T细胞调节性多聚体多肽的结合在30°C下进行。作为结合亲和力的阳性对照,可使用抗MHC I类单克隆抗体。例如,可使用抗HLA I类单克隆抗体W6/32(美国典型培养物保藏中心编号HB-95;Parham等人(1979) J. Immunol. 123:342),其具有7nM的 $K_D$ 。可使用抗MHC I类单克隆抗体的连续稀释液产生标准曲线。共免疫调节多肽或抗MHC I类mAb是“分析物”。BLI分析从两个表面反射的白光的干涉图案:i)来自固定的多肽(“靶标”);和ii)内反射层。与生物传感器尖端结合的分子(“分析物”;例如,共免疫调节多肽;抗HLA抗体)数量的变化引起干涉图案的偏移;可实时测量干涉图案的这种偏移。描述靶标/分析物相互作用的亲和力的两个动力学术语是缔合常数( $k_a$ )和解离常数( $k_d$ )。这两个项目的比率( $k_d/k_a$ )产生亲和常数 $K_D$ 。

[0127] 如上所述,测定免疫调节多肽(例如,IL-2或IL-2变体)与其同源共免疫调节多肽(例如IL-2R)之间的结合亲和力也可通过BLI测定。所述测定类似于上文针对synTac多聚体多肽所述的测定。可使用Octet RED 96(Pal FortéBio)仪器或类似仪器如下进行BLI测定。本公开的synTac的组分免疫调节多肽(例如,本公开的变体IL-2多肽);和对照免疫调节多肽(其中对照免疫调节多肽包含野生型免疫调节多肽,例如野生型IL-2)被固定到不溶性载体(“生物传感器”)上。免疫调节多肽是“靶标”。固定化可通过将捕获抗体固定到不溶性载体上来实现,其中捕获抗体固定所述免疫调节多肽。例如,如果靶标与免疫亲和标签(例如FLAG,人IgG Fc)融合,则可通过用免疫亲和标签的适当抗体(例如抗人IgG Fc)固定到不溶性载体上来实现固定化,其中固定的抗体结合至并固定免疫调节多肽(其中免疫调节多肽包含IgFc多肽)。将共免疫调节多肽(或多肽)以几种不同的浓度施加至所述固定的免疫调节多肽,并记录仪器的响应。或者,将共免疫调节多肽(或多肽)固定至生物传感器(例如,对于IL-2受体异源三聚体,作为单体亚基,异二聚体亚复合物或完整的异源三聚体)并且将免疫调节多肽以几种不同的浓度施加至固定的共免疫调节多肽,并且记录仪器的响应。测定在包含25mM HEPES pH 6.8、5%聚(乙二醇)6000、50mM KCl、0.1%牛血清白蛋白和0.02%Tween 20非离子洗涤剂的液体培养基中进行。共免疫调节多肽与固定的免疫调节多

肽的结合在30°C下进行。作为结合亲和力的阳性对照,可使用抗MHC I类单克隆抗体。例如,可使用抗HLA I类单克隆抗体W6/32(美国典型培养物保藏中心编号HB-95;Parham等人(1979) *J. Immunol.* 123:342),其具有7nM的 $K_D$ 。可使用抗MHC I类单克隆抗体的连续稀释液产生标准曲线。共免疫调节多肽或抗MHC I类mAb是“分析物”。BLI分析从两个表面反射的白光的干涉图案:i)来自固定的多肽(“靶标”);和ii)内反射层。与生物传感器尖端结合的分子(“分析物”;例如,共免疫调节多肽;抗HLA抗体)数量的变化引起干涉图案的偏移;可实时测量干涉图案的这种偏移。描述靶标/分析物相互作用的亲和力的两个动力学术语是缔合常数( $k_a$ )和解离常数( $k_d$ )。这两个项目的比率( $k_a/k_d$ )产生亲和常数 $K_D$ 。测定野生型免疫调节多肽(例如,IL-2)对其受体(例如,IL-2R)和变体免疫调节多肽(例如,如本文公开的IL-2变体)对其同源共免疫调节多肽(例如,其受体)(例如,IL-2R)的结合亲和力因此允许测定与野生型共免疫调节多肽相比,变体共免疫调节多肽对同源共免疫调节多肽的相对结合亲和力。也就是说,与野生型免疫调节多肽对相同同源免疫调节多肽的结合亲和力相比,可确定变体免疫调节多肽对其受体(其同源共免疫调节多肽)的结合亲和力是否降低,并且如果是这样,则确定从野生型共免疫调节多肽的结合亲和力降低的百分比是多少。

[0128] BLI测定在多孔板中进行。为了进行测定,定义板布局,定义测定步骤,并在Octet数据采集软件中指定生物传感器。生物传感器组件是水合的。将水合生物传感器组件和测定板在Octet仪器上平衡10分钟。一旦获取数据,就将采集的数据加载到Octet数据分析软件中。通过指定用于参考扣除、y轴对准、级间校正和Savitzky-Golay滤波的方法,在处理窗口中处理数据。通过指定分析步骤(缔合和解离)的步骤、选择曲线拟合模型(1:1)、拟合方法(全局)和目标窗口(秒),在分析窗口中分析数据。评价拟合等级。如果在3倍范围内,则可对每个数据追踪(分析物浓度)的 $K_D$ 值进行平均。 $K_D$ 误差值应在亲和常数值的一个数量级内; $R^2$ 值应高于0.95。参见例如,Abdiche等人(2008) *J. Anal. Biochem.* 377:209。

[0129] 在一些情况下,当通过BLI(如上所述)测量时,i)对照T细胞调节性多聚体多肽(其中所述对照包含野生型免疫调节多肽,例如野生型IL-2)与同源共免疫调节多肽(例如,IL-2R)的结合亲和力与ii)本公开的包含野生型免疫调节多肽的变体(例如,变体IL-2)的T细胞调节性多聚体多肽与同源共免疫调节多肽(例如,IL-2R)的结合亲和力的比例是至少1.5:1、至少2:1、至少5:1、至少10:1、至少15:1、至少20:1、至少25:1、至少50:1、至少100:1、至少500:1、至少 $10^2$ :1、至少 $5 \times 10^2$ :1、至少 $10^3$ :1、至少 $5 \times 10^3$ :1、至少 $10^4$ :1、至少 $10^5$ :1或至少 $10^6$ :1。在一些情况下,当通过BLI测量时,i)对照T细胞调节性多聚体多肽(其中所述对照包含野生型免疫调节多肽)与同源共免疫调节多肽的结合亲和力与ii)本公开的包含野生型免疫调节多肽的变体的T细胞调节性多聚体多肽与同源共免疫调节多肽的结合亲和力的比例在1.5:1至 $10^6$ :1,例如1.5:1至10:1、10:1至50:1、50:1至 $10^2$ :1、 $10^2$ :1至 $10^3$ :1、 $10^3$ :1至 $10^4$ :1、 $10^4$ :1至 $10^5$ :1或 $10^5$ :1至 $10^6$ :1的范围内。

[0130] 在一些情况下,当通过BLI(如上所述)测量时,i)对照免疫调节多肽(其中所述对照包含野生型免疫调节多肽,例如野生型IL-2)与同源共免疫调节多肽(例如,IL-2R)的结合亲和力与ii)本公开的包含野生型免疫调节多肽的变体(例如,变体IL-2)的免疫调节多肽与同源共免疫调节多肽(例如,IL-2R)的结合亲和力的比例是至少1.5:1、至少2:1、至少5:1、至少10:1、至少15:1、至少20:1、至少25:1、至少50:1、至少100:1、至少500:1、至少 $10^2$ :1、至少 $5 \times 10^2$ :1、至少 $10^3$ :1、至少 $5 \times 10^3$ :1、至少 $10^4$ :1、至少 $10^5$ :1或至少 $10^6$ :1。在一些情况

下,当通过BLI测量时,i)对照免疫调节多肽(其中所述对照包含野生型免疫调节多肽)与同源共免疫调节多肽的结合亲和力与ii)本公开的包含野生型免疫调节多肽的变体的免疫调节多肽与同源共免疫调节多肽的结合亲和力的比例在1.5:1至 $10^6$ :1,例如1.5:1至10:1、10:1至50:1、50:1至 $10^2$ :1、 $10^2$ :1至 $10^3$ :1、 $10^3$ :1至 $10^4$ :1、 $10^4$ :1至 $10^5$ :1或 $10^5$ :1至 $10^6$ :1的范围内。

[0131] 在本公开的synTac多肽中存在的变体IL-2多肽可相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有单个氨基酸取代。在一些情况下,在本公开的synTac多肽中存在的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有2至10个氨基酸取代。在一些情况下,在本公开的synTac多肽中存在的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有2个氨基酸取代。在一些情况下,在本公开的synTac多肽中存在的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有3个氨基酸取代。在一些情况下,在本公开的synTac多肽中存在的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有4个氨基酸取代。在一些情况下,在本公开的synTac多肽中存在的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有5个氨基酸取代。在一些情况下,在本公开的synTac多肽中存在的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有6个氨基酸取代。在一些情况下,在本公开的synTac多肽中存在的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有7个氨基酸取代。在一些情况下,在本公开的synTac多肽中存在的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有8个氨基酸取代。在一些情况下,在本公开的synTac多肽中存在的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有9个氨基酸取代。在一些情况下,在本公开的synTac多肽中存在的变体IL-2多肽相对于野生型IL-2多肽(例如,包含图2A中示出或如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列的IL-2多肽)具有10个氨基酸取代。

[0132] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽从氨基末端(N-末端)至羧基末端(C-末端)依次包含:a)表位(例如,T细胞表位);b)第一主要组织相容性复合物(MHC)多肽和c)免疫调节多肽(例如,本公开的变体IL-2多肽);并且其中所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)第二MHC多肽;和b)免疫球蛋白(Ig)Fc多肽。在其他情况下,本公开的多聚体多肽包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)表位(例如,T细胞表位);和b)第一MHC多肽;并且其中所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)免疫调节多肽(例如,本公开的变体IL-2多肽);b)第二MHC多肽;和c)Ig Fc多肽。在一些情况下,所述第一和第二MHC多肽是I类MHC多肽;例如,在一些情况下,所述第一MHC多肽是MHC I类 $\beta$ 2-微球蛋白( $\beta$ 2M或 $\beta$ 2M)多肽,并且所述第二MHC多肽是MHC I类重链(H链);或所述第一MHC多肽是MHC I类H链,并且所述第二MHC多肽是MHC I类 $\beta$ 2M多肽)。在其他情况下,所述第一和第二MHC多肽是II类MHC多肽;例如,在一些情况

下,所述第一MHC多肽是MHC II类 $\alpha$ 链多肽,并且所述第二MHC多肽是MHC II类 $\beta$ 链多肽。在其他情况下,所述第一多肽是MHC II类 $\beta$ 链多肽,并且所述第二MHC多肽是MHC II类 $\alpha$ 链多肽。在一些情况下,所述多聚体多肽包含两种或更多种免疫调节多肽,其中所述免疫调节多肽中的至少一种是本公开的变体IL-2免疫调节多肽。在本公开的多聚体多肽包含两种或更多种免疫调节多肽的情况下,在一些情况下,所述两种或更多种免疫调节多肽存在于同一多肽链中,并且可处于串联形式。在本公开的多聚体多肽包含两种或更多种免疫调节多肽的情况下,在一些情况下,所述两种或更多种免疫调节多肽存在于单独多肽中。在一些情况下,本公开的多聚体多肽是异二聚体。在一些情况下,本公开的多聚体多肽是三聚体多肽。

[0133] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;和ii) 第一MHC多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 第二MHC多肽;和ii) Ig Fc多肽;以及iii) 免疫调节结构域(例如,本公开的变体IL-2多肽)。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;和ii) 第一MHC多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 第二MHC多肽;和ii) 免疫调节结构域(例如,本公开的变体IL-2多肽)。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;和ii) 第一MHC多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 免疫调节结构域(例如,本公开的变体IL-2多肽);和ii) 第二MHC多肽。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;ii) 第一MHC多肽;和iii) 免疫调节结构域(例如,本公开的变体IL-2多肽);以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 第二MHC多肽。在一些情况下,在本公开的多聚体多肽包含非Ig支架的情况下,所述非Ig支架是XTEN肽、转铁蛋白多肽、Fc受体多肽、弹性蛋白样多肽、丝状多肽或丝-弹性蛋白样多肽。

[0134] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽是单价的。在一些情况下,本公开的多聚体多肽是多价的。在一些情况下,本公开的多价多聚体多肽在所述第一或第二多肽中的一个上包含免疫球蛋白Fc多肽。例如,取决于本公开的多聚体多肽中存在的Fc多肽,所述多聚体多肽可以是同二聚体,其中所述多聚体多肽的两个分子存在于所述同二聚体中,其中所述多聚体多肽的两个分子可彼此例如二硫键连接,例如经由所述两个分子中存在的Fc多肽。作为另一个实例,本公开的多聚体多肽可包含多聚体多肽的三个、四个或五个分子,其中所述多聚体多肽的分子可彼此二硫键连接,例如,经由所述分子中存在的Fc多肽。

[0135] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;ii)  $\beta$ 2M多肽;和iii) 本公开的变体IL-2多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) I类MHC重链;和ii) Fc多肽。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;和ii)  $\beta$ 2M多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 本公开的变体IL-2多肽;ii) I类MHC重链;和iii) Fc多肽。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) 表位;ii)  $\beta$ 2M多肽;iii) 本公开的第一变体IL-2多肽;iv) 本公开的第二变体IL-2多肽;和v) 本公开的第三变体IL-2多肽;以及b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i) I类MHC重链;和ii) Fc多肽。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体IL-2多肽具有相同的氨基酸序列。在一些情况下,所

述第一、第二和第三变体IL-2多肽在氨基酸序列上彼此不同。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)表位;和ii)β2M多肽;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)本公开的第一变体IL-2多肽;ii)本公开的第二变体IL-2多肽;和iii)本公开的第三变体IL-2多肽;iv)I类MHC重链;和v)Fc多肽。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体IL-2多肽具有相同的氨基酸序列。在一些情况下,所述第一、第二和第三变体IL-2多肽在氨基酸序列上彼此不同。

#### [0136] 接头

[0137] 本公开的多聚体多肽可包含插入在例如表位与MHC多肽之间;在MHC多肽与免疫调节多肽之间;在MHC多肽与Ig Fc多肽之间;在第一变体IL-2多肽与第二变体IL-2多肽之间;或在第二变体IL-2多肽与第三变体IL-2多肽之间的接头肽。

[0138] 合适的接头(也称为“间隔物”)可容易地选择,并且可具有许多合适长度中的任一种,如1个氨基酸至25个氨基酸、3个氨基酸至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸或7个氨基酸至8个氨基酸。合适的接头的长度可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。

[0139] 示例性接头包括甘氨酸聚合物( $G_n$ )、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括,例如,  $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:89)和 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:86),其中n是至少一的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物以及本领域中已知的其他柔性接头。可使用甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物;Gly和Ser两者均是相对非结构化的,并且因此可充当组分之间的中性系链。可使用甘氨酸聚合物;甘氨酸比甚至丙氨酸获得显著更多的phi-psi空间,并且比具有更长侧链的残基限制少的多(参见Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992))。示例性接头可包含氨基酸序列,包括但不限于GGSG(SEQ ID NO:2)、GGSGG(SEQ ID NO:3)、GSGSG(SEQ ID NO:4)、GSGGG(SEQ ID NO:5)、GGGSG(SEQ ID NO:6)、GSSSG(SEQ ID NO:7)等。示例性接头可包括例如Gly(Ser4) $_n$ ,其中n是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GSSSS) $_n$ (SEQ ID NO:93),其中n是4。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GSSSS) $_n$ (SEQ ID NO:94),其中n是5。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS) $_n$ (SEQ ID NO:9),其中n是1。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS) $_n$ (SEQ ID NO:92),其中n是2。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS) $_n$ (SEQ ID NO:89),其中n是3。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS) $_n$ (SEQ ID NO:90),其中n是4。在一些情况下,接头包含氨基酸序列(GGGGS) $_n$ (SEQ ID NO:91),其中n是5。

[0140] 在一些情况下,在本公开的多聚体多肽的第一多肽中存在的接头多肽包含半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基可与本公开的多聚体多肽的第二多肽中存在的半胱氨酸残基形成二硫键。在一些情况下,例如,合适的接头包含氨基酸序列

**GCGASGGGGSGGGGS (SEQ IDNO:10)。**

#### [0141] 表位

[0142] 在本公开的多聚体多肽中存在的表位可具有约4个氨基酸至约25个氨基酸的长度,例如,所述表位可具有4个氨基酸(aa)至10aa、10aa至15aa、15aa至20aa或20aa至25aa的长度。例如,在本公开的多聚体多肽中存在的表位可具有4个氨基酸(aa)、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、20aa、21aa、22aa、

23aa、24aa或25aa的长度。在一些情况下,在本公开的多聚体多肽中存在的表位具有5个氨基酸至10个氨基酸,例如,5aa、6aa、7aa、8aa、9aa或10aa的长度。

[0143] 在本公开的多聚体多肽中存在的表位被T细胞特异性结合,即所述表位被表位特异性T细胞特异性结合。表位特异性T细胞结合具有参考氨基酸序列的表位,但基本上不结合不同于参考氨基酸序列的表位。例如,表位特异性T细胞结合具有参考氨基酸序列的表位,并且结合与参考氨基酸序列不同的表位(如果发生的话)的亲和力小于 $10^{-6}$ M、小于 $10^{-5}$ M或小于 $10^{-4}$ M。表位特异性T细胞可结合对其具有特异性的表位的亲和力是至少 $10^{-7}$ M、至少 $10^{-8}$ M、至少 $10^{-9}$ M或至少 $10^{-10}$ M。

[0144] 合适的表位包括但不限于存在于癌症相关抗原中的表位。癌症相关抗原包括但不限于 $\alpha$ -叶酸受体;碳酸酐酶IX(CAIX);CD19;CD20;CD22;CD30;CD33;CD44v7/8;癌胚抗原(CEA);上皮糖蛋白-2(EGP-2);上皮糖蛋白-40(EGP-40);叶酸结合蛋白(FBP);胎儿乙酰胆碱受体;神经节苷脂抗原GD2;Her2/neu;IL-13R-a2; $\kappa$ 轻链;LeY;L1细胞粘附分子;黑色素瘤相关抗原(MAGE);MAGE-A1;间皮素;MUC1;NKG2D配体;癌胚抗原(h5T4);前列腺干细胞抗原(PSCA);前列腺特异性膜抗原(PSMA);肿瘤相关糖蛋白-72(TAG-72);以及血管内皮生长因子受体-2(VEGF-R2)。参见例如,Vigneron等人(2013)Cancer Immunity 13:15;和Vigneron(2015)BioMed Res.Int'l Article ID 948501。在一些情况下,表位是人乳头瘤病毒E7抗原表位;参见例如,Ramos等人(2013)J. Immunother. 36:66。

[0145] 在一些情况下,所述表位是HPV16E7/82-90(LLMGTLGIV;SEQ ID NO:11)。在一些情况下,所述表位是HPV16E7/86-93(TLGIVCPI;SEQ ID NO:12)。在一些情况下,所述表位是HPV16E7/11-20(YMLDLQPETT;SEQ ID NO:13)。在一些情况下,所述表位是HPV16E7/11-19(YMLDLQPET;SEQ ID NO:87)。关于另外合适的HPV表位,参见例如,Ressing等人((1995)J. Immunol. 154:5934)。

#### [0146] MHC多肽

[0147] 如上所述,本公开的多聚体多肽包含MHC多肽。出于本公开的目的,术语“主要组织相容性复合物(MHC)多肽”是指包括各种物种的MHC多肽,包括人MHC(也称为人白细胞抗原(HLA))多肽、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠等)、MHC多肽和其他哺乳动物物种(例如,兔类动物、非人灵长类动物、犬科动物、猫科动物、有蹄类动物(例如,马科动物、牛科动物、绵羊科动物、山羊科动物等)的MHC多肽等。术语“MHC多肽”是指包括I类MHC多肽(例如, $\beta$ -2微球蛋白和MHCI类重链)和MHC II类多肽(例如,MHC II类 $\alpha$ 多肽和MHC II类 $\beta$ 多肽)。

[0148] 如上所述,在本公开的多聚体多肽的一些实施方案中,所述第一和第二MHC多肽是I类MHC多肽;例如,在一些情况下,所述第一MHC多肽是MHC I类 $\beta$ 2-微球蛋白( $\beta$ 2M)多肽,并且所述第二MHC多肽是MHC I类重链(H链)。在其他情况下,所述第一和第二MHC多肽是II类MHC多肽;例如,在一些情况下,所述第一MHC多肽是MHC II类 $\alpha$ 链多肽,并且所述第二MHC多肽是MHC II类 $\beta$ 链多肽。在其他情况下,所述第一多肽是MHC II类 $\beta$ 链多肽,并且所述第二MHC多肽是MHC II类 $\alpha$ 链多肽。

[0149] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽的MHC多肽是人MHC多肽,其中人MHC多肽也称为“人白细胞抗原”(“HLA”)多肽。在一些情况下,本公开的多聚体多肽的MHC多肽是I类HLA多肽,例如 $\beta$ 2-微球蛋白多肽,或I类HLA重链多肽。I类HLA重链多肽包括HLA-A重链多肽、HLA-B重链多肽、HLA-C重链多肽、HLA-E重链多肽、HLA-F重链多肽和HLA-G重链多肽。在一些



情况下,本公开的多聚体多肽的MHC多肽是II类HLA多肽,例如II类HLA  $\alpha$ 链或II类HLA  $\beta$ 链。MHC II类多肽包括MCH II类DP  $\alpha$ 和 $\beta$ 多肽、DM  $\alpha$ 和 $\beta$ 多肽、DOA  $\alpha$ 和 $\beta$ 多肽、DOB  $\alpha$ 和 $\beta$ 多肽、DQ  $\alpha$ 和 $\beta$ 多肽以及DR  $\alpha$ 和 $\beta$ 多肽。

[0150] 作为实例,本公开的多聚体多肽的MHC I类重链多肽可包含与图5A中示出的人HLA-A重链多肽的氨基酸序列的氨基酸25-365具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0151] 作为实例,本公开的多聚体多肽的MHC I类重链多肽可包含与以下人HLA-A重链氨基酸序列的氨基酸序列的氨基酸25-365具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列:

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRM  
EPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGYYNQSE  
AGSHTVQRMYGCDVGSWRFRLRGYHQYAYDGKDYLKEDLRS  
[0152] WTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLEN  
GKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQ  
RDGEDQTQDTELVETRPAGDGTQKWA AVVVPSGQEQRYTCHV  
QHEGLPKPLTLRWEP (SEQ ID NO:14)。

[0153] 作为另一个实例,本公开的多聚体多肽的MHC I类重链多肽可包含与图5B中示出的人HLA-B重链多肽的氨基酸序列的氨基酸25-362具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0154] 作为另一个实例,本公开的多聚体多肽的MHC I类重链多肽可包含与图5C中示出的人HLA-C重链多肽的氨基酸序列的氨基酸25-362具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0155] 作为另一个实例,本公开的多聚体多肽的MHC I类重链多肽可包含与以下氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0156] GPHSLRYFVTA VSRPGLGEPRIAVGYVDDTQFVRFSDADN  
PRFEPRAPWMEQEGPEYWEEQTQRAKSDEQWFRVSLRTAQRYY  
NQSKGGSHTFQRMFGCDVGSWRLLRGYQQFAYDGRDYIALNE  
DLKTWTAADTAALITRRKWEQAGDAEYYRAYLEGECVEWLRRY  
[0157] LELGNETLLRTDSPKAHVTYHPRSQVDVTLRCWALGFYPADITLT  
WQLNGEDLTQDMELVETRPAGDGTQKWA AVVVPLGKEQNYT  
CHVHHKGLPEPLTLRW (SEQ ID NO:15)。

[0158] 本公开的多聚体多肽的 $\beta$ 2-微球蛋白( $\beta$ 2M)多肽可以是人 $\beta$ 2M多肽、非人灵长类动物 $\beta$ 2M多肽、鼠 $\beta$ 2M多肽等。在一些情况下, $\beta$ 2M多肽包含与图6中示出的 $\beta$ 2M氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序

列同一性的氨基酸序列。在一些情况下， $\beta$ 2M多肽包含与图6中示出的 $\beta$ 2M氨基酸序列的氨基酸21至119具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0159] 在一些情况下，MHC多肽相对于参考MHC多肽（其中参考MHC多肽可以是野生型MHC多肽）包含单个氨基酸取代，其中所述单个氨基酸取代用半胱氨酸（Cys）残基取代氨基酸。当在本公开的多聚体多肽的第一多肽的MHC多肽中存在时，此类半胱氨酸残基可与本公开的多聚体多肽的第二多肽链中存在的半胱氨酸残基形成二硫键。

[0160] 在一些情况下，在本公开的多聚体多肽的第一多肽中存在的第一MHC多肽和/或在本公开的多聚体多肽的第二多肽中存在的第二MHC多肽包含氨基酸取代以用半胱氨酸取代氨基酸，其中所述第一MHC多肽中的取代的半胱氨酸与所述第二MHC多肽中的半胱氨酸形成二硫键，其中所述第一MHC多肽中的半胱氨酸与所述第二MHC多肽中的取代的半胱氨酸形成二硫键，或其中所述第一MHC多肽中的取代的半胱氨酸与所述第二MHC多肽中的取代的半胱氨酸形成二硫键。

[0161] 例如，在一些情况下，HLA  $\beta$ 2-微球蛋白和HLA I类重链中的以下残基对中的一个被半胱氨酸取代（其中残基数是成熟多肽的残基数）：1)  $\beta$ 2M残基12，HLA I类重链残基236；2)  $\beta$ 2M残基12，HLA I类重链残基237；3)  $\beta$ 2M残基8，HLA I类重链残基234；4)  $\beta$ 2M残基10，HLA I类重链残基235；5)  $\beta$ 2M残基24，HLA I类重链残基236；6)  $\beta$ 2M残基28，HLA I类重链残基232；7)  $\beta$ 2M残基98，HLA I类重链残基192；8)  $\beta$ 2M残基99，HLA I类重链残基234；9)  $\beta$ 2M残基3，HLA I类重链残基120；10)  $\beta$ 2M残基31，HLA I类重链残基96；11)  $\beta$ 2M残基53，HLA I类重链残基35；12)  $\beta$ 2M残基60，HLA I类重链残基96；13)  $\beta$ 2M残基60，HLA I类重链残基122；14)  $\beta$ 2M残基63，HLA I类重链残基27；15)  $\beta$ 2M残基Arg3，HLA I类重链残基Gly120；16)  $\beta$ 2M残基His31，HLA I类重链残基Gln96；17)  $\beta$ 2M残基Asp53，HLA I类重链残基Arg35；18)  $\beta$ 2M残基Trp60，HLA I类重链残基Gln96；19)  $\beta$ 2M残基Trp60，HLA I类重链残基Asp122；20)  $\beta$ 2M残基Tyr63，HLA I类重链残基Tyr27；21)  $\beta$ 2M残基Lys6，HLA I类重链残基Glu232；22)  $\beta$ 2M残基Gln8，HLA I类重链残基Arg234；23)  $\beta$ 2M残基Tyr10，HLA I类重链残基Pro235；24)  $\beta$ 2M残基Ser11，HLA I类重链残基Gln242；25)  $\beta$ 2M残基Asn24，HLA I类重链残基Ala236；26)  $\beta$ 2M残基Ser28，HLA I类重链残基Glu232；27)  $\beta$ 2M残基Asp98，HLA I类重链残基His192；以及28)  $\beta$ 2M残基Met99，HLA I类重链残基Arg234。MHC/HLA I类重链的氨基酸编号是参考无信号肽的成熟MHC/HLA I类重链。例如，在图5A中示出的包含信号肽的氨基酸序列中，Gly120是Gly144；Gln96是Gln120；等。在一些情况下，所述 $\beta$ 2M多肽包含R12C取代，并且所述HLA I类重链包含A236C取代；在此类情况下，在 $\beta$ 2M多肽的Cys-12与HLA I类重链的Cys-236之间形成二硫键。例如，在一些情况下，成熟HLA-A氨基酸序列的残基236（即图5A中示出的氨基酸序列的残基260）被Cys取代。在一些情况下，成熟HLA-B氨基酸序列的残基236（即图5B中示出的氨基酸序列的残基260）被Cys取代。在一些情况下，成熟HLA-C氨基酸序列的残基236（即图5C中示出的氨基酸序列的残基260）被Cys取代。在一些情况下，图6中示出的氨基酸序列的残基32（对应于成熟 $\beta$ 2M的Arg-12）被Cys取代。

[0162] 在一些情况下， $\beta$ 2M多肽包含氨基酸序列：**IQRTPKIQVY SRH PAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGERIEKVE HSDL SFS KDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVTL SQP KIVKWDRD**

- [0163] M (SEQ ID NO:16)。在一些情况下,β2M多肽包含氨基酸序列:I  
QRTPKIQVY SCHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLKNGE
- [0164] RIEKVE HSDLSFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVNHVT  
LSQP KIVKWDRDM (SEQ ID NO:17)。
- [0165] 在一些情况下,HLAI类重链多肽包含氨基酸序列:  
GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVRFSDAAS  
QRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKYKAHSQTHRVDLGTLRGYY  
NQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDIALKE
- [0166] DLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRR  
YLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEIT  
LTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGQEQR  
Y TCHVQHEGLPKPLTLRWEP (SEQ ID NO:14)。
- [0167] 在一些情况下,HLAI类重链多肽包含氨基酸序列:  
GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVRFSDAAS  
QRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKYKAHSQTHRVDLGTLRGYY  
NQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDIALKE
- [0168] DLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRR  
YLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEIT  
LTWQRDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVVPSGQEQR  
Y TCHVQHEGLPKPLTLRWEP (SEQ ID NO:18)。
- [0169] 在一些情况下,HLAI类重链多肽包含氨基酸序列:  
GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRM  
EPRAPWIEQEGPEYWDGETRKYKAHSQTHRVDLGTLRGAYNQSE  
AGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDIALKEDLRS
- [0170] WTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLEN  
GKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQ  
RDGEDQTQDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVVPSGQEQR  
YTCHV QHEGLPKPLTLRWE (SEQ ID NO:19)。
- [0171] 在一些情况下,所述β2M多肽包含以下氨基酸序列:
- [0172] IQRTPKIQVY SCHPAENGKS NFLNCYVSGF HPSDIEVDLLK  
NGERIEKVE HSDLSFSKDW SFYLLYYTEF TPTEKDEYAC RVN  
HVTLSQP KIVKWDRDM (SEQ ID NO:17);并且本公开的多聚体多肽的HLA I类

重链多肽包含以下氨基酸序列：

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFIAVGYVDDTQFVRFSDAAS  
 QRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGYY  
 NQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDYLALKE  
 [0173] DLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRR  
 YLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEIT  
 LTWQRDGEDQTQDTEL VETRPCGDGTFQKWAAVVVPSGQEQR Y  
 [0174] TCHVQHEGLPKPLTLRWEP (SEQ ID NO:18),其中加下划线且呈粗体的  
 Cys残基在所述多聚体多肽中与彼此形成二硫键。

[0175] 在一些情况下,所述β2M多肽包含氨基酸序列：

IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERI  
 [0176] EKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQPK  
 IVKWDRDM (SEQ ID NO:17)。

[0177] 免疫调节多肽

[0178] 本公开的多聚体多肽包含如上所述的本公开的变体IL-2多肽,即天然存在的共刺激蛋白的变体,所述变体对T细胞上的其对应物(同源)共刺激蛋白(例如,IL-2R)表现出的亲和力与天然存在的IL-2对所述对应物共刺激蛋白(IL-2R)的亲和力相比降低。因此,本公开的多聚体多肽包含本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽。

[0179] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是除组氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸16是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Val。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Leu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,

其中氨基酸16是Asn。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Asp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Cys。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Gln。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Met。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Phe。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Ser。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Thr。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Trp。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2E中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸16是Tyr。在一些情况下,所述变体IL-2多肽对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,所述变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0180] F42取代

[0181] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2B中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2B中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2B中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2B中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基

酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2B中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2B中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2B中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile。在一些情况下,变体IL-2多肽的单个拷贝存在于本公开的多聚体多肽中。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝,例如,其中所述两个拷贝处于串联,在两个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的三个拷贝,例如,其中所述三个拷贝处于串联,在三个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含HLA I类重链的多肽链上。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含 $\beta$ 2M多肽的多肽链上。在一些情况下,所述变体IL-2多肽或包含所述变体IL-2多肽的synTac对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0182] Y45取代

[0183] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2F中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸45是除酪氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸45是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2F中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2F中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸45是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2F中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸45是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2F中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸45是Val。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2F中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸45是Leu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2F中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸45

是Ile。在一些情况下,变体IL-2多肽的单个拷贝存在于本公开的多聚体多肽中。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝,例如,其中所述两个拷贝处于串联,在两个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的三个拷贝,例如,其中所述三个拷贝处于串联,在三个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含HLA I类重链的多肽链上。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含 $\beta$ 2M多肽的多肽链上。在一些情况下,所述变体IL-2多肽或包含所述变体IL-2多肽的synTac对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

#### [0184] Q126取代

[0185] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2G中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸126是除谷氨酰胺以外的氨基酸,例如,其中氨基酸126是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2G中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2G中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2G中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸126是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2G中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸126是Val。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2G中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸126是Ile。在一些情况下,变体IL-2多肽的单个拷贝存在于本公开的多聚体多肽中。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝,例如,其中所述两个拷贝处于串联,在两个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的三个拷贝,例如,其中所述三个拷贝处于串联,在三个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含HLAI类重链的多肽链上。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含 $\beta$ 2M多肽



的多肽链上。在一些情况下,所述变体IL-2多肽或包含所述变体IL-2多肽的synTac对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0186] F42和H16取代

[0187] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2H中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;并且其中氨基酸16是除组氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸16是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2H中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2H中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2H中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2H中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2H中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2H中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,变体IL-2多肽的单个拷贝存在于本公开的多聚体多肽中。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝,例如,其中所述两个拷贝处于串联,在两个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的三个拷贝,例如,其中所述三个拷贝处于串联,在三个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含HLA I类重链的多肽链上。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含 $\beta$ 2M多肽的多肽链上。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含含有F42A和H16A取代的IL-2变体的2个拷贝,其中所述多聚体多肽包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M多肽,并且其中IL-2的2个拷贝(F42A、H16A)位于包含HLA I类重链的多肽链上。在一些情况下,所述变体IL-2多肽或包含所述变体IL-2多肽的synTac对IL-2R具有约100nM至150nM、约



150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。在一些情况下,所述变体IL-2多肽包含图34B中示出的氨基酸序列(包含H16A和F42A取代)。

[0188] F42和D20取代

[0189] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;并且其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸20是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸20是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val并且氨基酸20是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu并且氨基酸20是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile并且氨基酸20是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸20是Asn。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸20是Gln。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸20是Lys。在一些情况下,本公开的多聚

体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸20是Arg。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala并且氨基酸20是His。在一些情况下,变体IL-2多肽的单个拷贝存在于本公开的多聚体多肽中。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝,例如,其中所述两个拷贝处于串联,在两个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的三个拷贝,例如,其中所述三个拷贝处于串联,在三个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含HLA I类重链的多肽链上。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含 $\beta$ 2M多肽的多肽链上。在一些情况下,所述变体IL-2多肽或包含所述变体IL-2多肽的synTac对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0190] F42、D20和E15取代

[0191] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu;并且其中氨基酸15是除谷氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸15是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Asp。在一些情况下,本公开的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸15是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His;并且其中氨基酸15是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Ala,并且氨基酸15是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gly,并且氨基酸15是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具

有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val,氨基酸20是Ala,并且氨基酸15是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu,氨基酸20是Ala,并且氨基酸15是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile,氨基酸20是Ala,并且氨基酸15是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Asn,并且氨基酸15是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gln,并且氨基酸15是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Lys,并且氨基酸15是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2J中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Arg,并且氨基酸15是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2I中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是His,并且氨基酸15是Ala。在一些情况下,变体IL-2多肽的单个拷贝存在于本公开的多聚体多肽中。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝,例如,其中所述两个拷贝处于串联,在两个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和β2M时,所述IL-2多肽在包含HLA I类重链的多肽链上。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和β2M时,所述IL-2多肽在包含β2M多肽的多肽链上。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的三个拷贝,例如,其中所述三个拷贝处于串联,在三个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,所述变体IL-2多肽或包含所述变体IL-2多肽的synTac对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1μM、约1μM至约5μM、约5μM至约10μM、约10μM至约15μM、约15μM至约20μM、约20μM至约25μM、约25μM至约50μM、约50μM至约75μM或约75μM至约100μM的结合亲和力。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0192] F42、D20和H16取代

[0193] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、

Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu；并且其中氨基酸16是除组氨酸以外的氨基酸，例如其中氨基酸16是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、Asp或Glu。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile；其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile；并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile；其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His；并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Ala，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Gly，并且氨基酸16是Gly。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Val，氨基酸20是Ala，并且氨基酸16是Gly。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Leu，氨基酸20是Ala，并且氨基酸16是Gly。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ile，氨基酸20是Ala，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Asn，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Gln，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Lys，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Arg，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2K中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是His，并且氨基酸16是Ala。在一些情况下，变体IL-2多肽的单个拷贝存在于本公开的多聚体多肽中。在一些情况下，本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝，例如，其中所述两个拷贝处于串联，在两个拷贝之间没有接头；或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下，本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的三个拷贝，例如，其中所述三个拷贝处于串联，在三个拷贝之间没有接

头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含HLAI类重链的多肽链上。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含 $\beta$ 2M多肽的多肽链上。在一些情况下,所述变体IL-2多肽或包含所述变体IL-2多肽的synTac对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0194] F42、D20和Q126取代

[0195] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu;并且其中氨基酸126是除谷氨酰胺以外的氨基酸,例如其中氨基酸126是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His;并且其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Ala,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gly,并且氨基酸126是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val,氨基酸20是Ala,并且氨基酸126是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu,氨基酸20是Ala,并且氨基酸126是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile,氨基酸20是Ala,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多

肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Asn,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gln,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Lys,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Arg,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2L中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是His,并且氨基酸126是Ala。在一些情况下,变体IL-2多肽的单个拷贝存在于本公开的多聚体多肽中。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝,例如,其中所述两个拷贝处于串联,在两个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的三个拷贝,例如,其中所述三个拷贝处于串联,在三个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含HLAI类重链的多肽链上。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含 $\beta$ 2M多肽的多肽链上。在一些情况下,所述变体IL-2多肽或包含所述变体IL-2多肽的synTac对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0196] F42、D20和Y45取代

[0197] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu;并且其中氨基酸45是除酪氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸45是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、

至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His;并且其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Ala,并且氨基酸45是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gly,并且氨基酸45是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val,氨基酸20是Ala,并且氨基酸45是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu,氨基酸20是Ala,并且氨基酸45是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile,氨基酸20是Ala,并且氨基酸45是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Asn,并且氨基酸45是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gln,并且氨基酸45是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Lys,并且氨基酸45是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Arg,并且氨基酸45是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2M中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是His,并且氨基酸45是Ala。在一些情况下,变体IL-2多肽的单个拷贝存在于本公开的多聚体多肽中。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝,例如,其中所述两个拷贝处于串联,在两个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的三个拷贝,例如,其中所述三个拷贝处于串联,在三个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和β2M时,所述IL-2多肽在包含HLA I类重链的多肽链上。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和β2M时,所述IL-2多肽在包含β2M多肽的多肽链上。在一些情况下,所述变体IL-2多肽或包含所述变体IL-2多肽的synTac对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1μM、约1μM至约5μM、约5μM至约10μM、约10μM至约15

$\mu\text{M}$ 、约 $15\mu\text{M}$ 至约 $20\mu\text{M}$ 、约 $20\mu\text{M}$ 至约 $25\mu\text{M}$ 、约 $25\mu\text{M}$ 至约 $50\mu\text{M}$ 、约 $50\mu\text{M}$ 至约 $75\mu\text{M}$ 或约 $75\mu\text{M}$ 至约 $100\mu\text{M}$ 的结合亲和力。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0198] F42、D20、Y45和H16取代

[0199] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu;其中氨基酸45是除酪氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸45是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;并且其中氨基酸16是除组氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸16是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His;其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Ala,氨基酸45是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gly,氨基酸45是Gly,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val,氨基酸20是Ala,氨基酸45是Gly,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu,氨基酸20是Ala,氨基酸45是Gly,并且氨基酸16是Val。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile,氨基酸20是Ala,氨基酸45是Ala,并且氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Asn,氨基酸45是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序



列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gln,氨基酸45是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Lys,氨基酸45是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Arg,氨基酸45是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2N中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是His,氨基酸45是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,变体IL-2多肽的单个拷贝存在于本公开的多聚体多肽中。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝,例如,其中所述两个拷贝处于串联,在两个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的三个拷贝,例如,其中所述三个拷贝处于串联,在三个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含HLA I类重链的多肽链上。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含 $\beta$ 2M多肽的多肽链上。在一些情况下,所述变体IL-2多肽或包含所述变体IL-2多肽的synTac对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0200] F42、D20、Y45和Q126取代

[0201] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu;其中氨基酸45是除酪氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸45是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;并且其中氨基酸126是除谷氨酰胺以外的氨基酸,例如其中氨基酸126是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是

Ala、Gly、Val、Leu或Ile；其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His；其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile；并且其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Ala，氨基酸45是Ala，并且氨基酸126是Ala。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Gly，氨基酸45是Gly，并且氨基酸126是Ala。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Val，氨基酸20是Ala，氨基酸45是Gly，并且氨基酸126是Ala。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Leu，氨基酸20是Ala，氨基酸45是Gly，并且氨基酸126是Val。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ile，氨基酸20是Ala，氨基酸45是Ala，并且氨基酸126是Gly。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Gln，氨基酸45是Ala，并且氨基酸126是Ala。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Lys，氨基酸45是Ala，并且氨基酸126是Ala。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是Arg，氨基酸45是Ala，并且氨基酸126是Ala。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图20中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列，其中氨基酸42是Ala，氨基酸20是His，氨基酸45是Ala，并且氨基酸126是Ala。在一些情况下，变体IL-2多肽的单个拷贝存在于本公开的多聚体多肽中。在一些情况下，本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝，例如，其中所述两个拷贝处于串联，在两个拷贝之间没有接头；或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下，本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的三个拷贝，例如，其中所述三个拷贝处于串联，在三个拷贝之间没有接头；或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下，当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时，所述IL-2多肽在包含HLA I类重链的多肽链上。在一些情况下，当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时，所述IL-2多肽在包含 $\beta$ 2M多肽的多肽链上。在一些情况下，所述变体IL-2多肽或包含所述变体IL-2多肽的synTac对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约

400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0202] F42、D20、Y45、H16和Q126取代

[0203] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸,例如,其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸20是除天冬氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸20是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His或Glu;其中氨基酸45是除酪氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸45是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu;其中氨基酸126是除谷氨酰胺以外的氨基酸,例如其中氨基酸126是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu;并且其中氨基酸16是除组氨酸以外的氨基酸,例如其中氨基酸16是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、Asp或Glu。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸20是Asn、Gln、Lys、Arg或His;其中氨基酸45是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Ala,氨基酸45是Ala,氨基酸126是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸20是Gly,氨基酸45是Gly,氨基酸126是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val,氨基酸20是Ala,氨基酸45是Gly,氨基酸126是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu,氨基酸20是Ala,氨基酸45是Gly,氨基酸126是Val,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile,氨基酸20是Ala,氨基酸45是

Ala, 氨基酸126是Gly, 并且氨基酸16是Ala。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸42是Ala, 氨基酸20是Asn, 氨基酸45是Ala, 氨基酸126是Ala, 并且氨基酸16是Ala。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸42是Ala, 氨基酸20是Gln, 氨基酸45是Ala, 氨基酸126是Ala, 并且氨基酸16是Ala。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸42是Ala, 氨基酸20是Lys, 氨基酸45是Ala, 氨基酸126是Ala, 并且氨基酸16是Ala。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸42是Ala, 氨基酸20是Arg, 氨基酸45是Ala, 氨基酸126是Ala, 并且氨基酸16是Ala。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2P中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸42是Ala, 氨基酸20是His, 氨基酸45是Ala, 氨基酸126是Ala, 并且氨基酸16是Ala。在一些情况下, 变体IL-2多肽的单个拷贝存在于本公开的多聚体多肽中。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝, 例如, 其中所述两个拷贝处于串联, 在两个拷贝之间没有接头; 或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的三个拷贝, 例如, 其中所述三个拷贝处于串联, 在三个拷贝之间没有接头; 或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下, 当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时, 所述IL-2多肽在包含HLA I类重链的多肽链上。在一些情况下, 当本公开的IL-2/synTac包含HLAI类重链和 $\beta$ 2M时, 所述IL-2多肽在包含 $\beta$ 2M多肽的多肽链上。在一些情况下, 所述变体IL-2多肽或包含所述变体IL-2多肽的synTac对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

[0204] F42、Q126和H16取代

[0205] 在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列, 其中氨基酸42是除苯丙氨酸以外的氨基酸, 例如, 其中氨基酸42是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、His、Asp或Glu; 其中氨基酸126是除谷氨酰胺以外的氨基酸, 例如其中氨基酸126是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Lys、Arg、His、Asp或Glu; 并且其中氨基酸16是除组氨酸以外的氨基酸, 例如其中氨基酸16是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Tyr、Trp、Ser、Thr、Cys、Met、Asn、Gln、Lys、Arg、Asp或Glu。在一些情况下, 本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序

列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸126是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala、Gly、Val、Leu或Ile;其中氨基酸126是Asn、Gln、Lys、Arg或His;并且其中氨基酸16是Ala、Gly、Val、Leu或Ile。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸126是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸126是Gly,并且氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Val,氨基酸126是Ala,并且氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Leu,氨基酸126是Ala,并且氨基酸16是Gly。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ile,氨基酸126是Ala,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸126是Asn,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸126是Lys,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸126是Arg,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,本公开的多聚体多肽中存在的变体IL-2多肽包含与图2Q中示出的氨基酸序列具有至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中氨基酸42是Ala,氨基酸126是His,并且氨基酸16是Ala。在一些情况下,变体IL-2多肽的单个拷贝存在于本公开的多聚体多肽中。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝,例如,其中所述两个拷贝处于串联,在两个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含变体IL-2多肽的三个拷贝,例如,其中所述三个拷贝处于串联,在三个拷贝之间没有接头;或者处于串联并且通过接头肽分开。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含HLA I类重链的多肽链上。在一些情况下,当本公开的IL-2/synTac包含HLA I类重链和 $\beta$ 2M时,所述IL-2多肽在包含 $\beta$ 2M多肽的多肽链上。在一些情况下,所述变体IL-2多肽或包含所述变体IL-2

多肽的synTac对IL-2R具有约100nM至150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM、约250nM至约300nM、约300nM至约350nM、约350nM至约400nM、约400nM至约500nM、约500nM至约600nM、约600nM至约700nM、约700nM至约800nM、约800nM至约900nM、约900nM至约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M至约5 $\mu$ M、约5 $\mu$ M至约10 $\mu$ M、约10 $\mu$ M至约15 $\mu$ M、约15 $\mu$ M至约20 $\mu$ M、约20 $\mu$ M至约25 $\mu$ M、约25 $\mu$ M至约50 $\mu$ M、约50 $\mu$ M至约75 $\mu$ M或约75 $\mu$ M至约100 $\mu$ M的结合亲和力。在一些情况下,所述变体IL-2多肽具有133个氨基酸的长度。

#### [0206] 多个免疫调节结构域

[0207] 如上所述,在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含两种或更多种免疫调节多肽,其中所述两种或更多种免疫调节多肽中的至少一种是本公开的变体IL-2多肽。

[0208] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含本公开的变体IL-2多肽的两个或更多个拷贝。在一些情况下,所述两种或更多种变体IL-2多肽位于本公开的多聚体多肽的同一多肽链上。在一些情况下,所述两种或更多种变体IL-2多肽位于本公开的多聚体多肽的单独多肽链上。

[0209] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含第一免疫调节多肽和至少第二免疫调节多肽,其中所述第一免疫调节多肽是本公开的变体IL-2多肽,并且所述第二免疫调节多肽不是IL-2多肽。例如,在一些情况下,所述第二免疫调节多肽是肿瘤坏死因子(TNF)超家族的成员;例如,FasL多肽、4-1BBL多肽、CD40多肽、OX40L多肽、CD30L多肽、CD70多肽等。在一些情况下,本公开的多聚体多肽的第二免疫调节多肽是T-细胞共刺激多肽,并且是免疫球蛋白(Ig)超家族的成员;例如,CD7多肽、CD86多肽、ICAM多肽等。在一些情况下,所述第二免疫调节多肽是4-1BBL、OX40L、ICOS-L、ICAM、PD-L1、CD86、FasL和PD-L2。本公开的多聚体多肽的合适的免疫调节多肽包括例如,CD7、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素 $\beta$ 受体、3/TR6、ILT3、ILT4或HVEM。在一些情况下,所述第二免疫调节多肽是变体(例如,天然存在的4-1BBL的变体),所述变体对T细胞上发现的其对应物共刺激蛋白表现出的亲和力(如上所述测定)与天然存在的共刺激蛋白(免疫调节多肽)对其对应物(同源)共刺激蛋白的亲和力相比降低。在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含第一免疫调节多肽和至少第二免疫调节多肽,其中两者都不是变体IL-2多肽。应当理解,本公开总体上涉及为天然存在的免疫调节多肽的变体的免疫调节多肽的用途,所述变体对对应物共刺激蛋白表现出的亲和力(如上所述测定)与天然存在的共刺激蛋白(免疫调节多肽)对对应物(同源)共刺激蛋白的亲和力相比降低。

[0210] 可包含于本公开的多聚体多肽中的其他T细胞调节结构域(MOD)包括天然存在的或合成的人基因产物(蛋白质);靶向人基因产物的亲和试剂(例如,抗体、抗体片段、单链Fv、适体、纳米抗体),包括但不限于由经典和非经典(例如,FGF2、IL1、S100A4)分泌机制产生的所有分泌蛋白;以及由天然存在的遗传编码的蛋白质区段(单个或多个膜跨度)或翻译后修饰,如GPI键联)锚定的所有细胞表面蛋白的胞外结构域。靶向细胞表面聚糖或其他翻译后修饰(例如,硫酸化)的任何天然存在的或合成的亲和试剂(例如,抗体、抗体片段、单链Fv、适体、纳米抗体、凝集素等)。实例包括但不限于TNF/TNFR家族的成员(OX40L、ICOSL、FASL、LTA、LTB、TRAIL、CD153、TNFSF9、RANKL、TWEAK、TNFSF13、TNFSF13b、TNFSF14、TNFSF15、TNFSF18、CD40LG、CD70)或针对TNF/TNFR家族成员的亲和试剂;免疫球蛋白超家族的成员(VISTA、PD1、PD-L1、PD-L2、B71、B72、CTLA4、CD28、TIM3、CD4、CD8、CD19、T细胞受体链、ICOS、

ICOS配体、HHLA2、嗜乳脂蛋白、BTLA、B7-H3、B7-H4、CD3、CD79a、CD79b、IgSF CAMS（包括CD2、CD58、CD48、CD150、CD229、CD244、ICAM-1）、白细胞免疫球蛋白样受体（LILR）、杀伤细胞免疫球蛋白样受体（KIR）；凝集素超家族成员，选择素、细胞因子/趋化因子和细胞因子/趋化因子受体、生长因子和生长因子受体）；粘附分子（整联蛋白、纤连蛋白、钙粘蛋白）；或多跨整合膜蛋白的胞外结构域；或针对免疫球蛋白超家族和列出的基因产物的亲和试剂。此外，这些基因产物的活性同源物/直向同源物包括但不限于病毒序列（例如，CMV、EBV）、细菌序列、真菌序列、真核病原体（例如，血吸虫属、疟原虫属、巴贝虫属、艾美球虫属、泰勒虫属、弓形虫属、内阿米巴属、利什曼原虫属和锥虫属）以及哺乳动物来源的编码区。此外，MOD可包含靶向人基因产物的小分子药物。

#### [0211] 支架多肽

[0212] 本公开的T细胞调节性多聚体多肽包含Fc多肽或另一种合适的支架多肽。

[0213] 合适的支架多肽包括基于抗体的支架多肽和基于非抗体的支架。基于非抗体的支架包括例如，白蛋白、XTEN（延伸的重组）多肽、转铁蛋白、Fc受体多肽、弹性蛋白样多肽（参见例如，Hassouneh等人（2012）*Methods Enzymol.* 502:215；例如，包含（Val-Pro-Gly-X-Gly；SEQ ID NO:100）的五肽重复单元的多肽，其中X是除脯氨酸以外的任何氨基酸）、白蛋白结合多肽、丝状多肽（参见例如，Valluzzi等人（2002）*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357:165）、丝-弹性蛋白样多肽（SELP；参见例如，Megeed等人（2002）*Adv Drug Deliv Rev.* 54:1075）等。合适的XTEN多肽包括例如在WO 2009/023270、WO 2010/091122、WO 2007/103515、US2010/0189682和US2009/0092582中公开的那些；还参见Schellenberger等人（2009）*Nat Biotechnol.* 27:1186）。合适的白蛋白多肽包括例如人血清白蛋白。

[0214] 在一些情况下，合适的支架多肽将是延长半衰期的多肽。因此，在一些情况下，与缺乏支架多肽的对照多聚体多肽相比，合适的支架多肽增加多聚体多肽的体内半衰期（例如，血清半衰期）。例如，在一些情况下，与缺乏支架多肽的对照多聚体多肽相比，所述支架多肽使多聚体多肽的体内半衰期（例如，血清半衰期）增加至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约50%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约25倍、至少约50倍、至少约100倍或超过100倍。作为一个实例，在一些情况下，与缺乏Fc多肽的对照多聚体多肽相比，所述Fc多肽使多聚体多肽的体内半衰期（例如，血清半衰期）增加至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约50%、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约25倍、至少约50倍、至少约100倍或超过100倍。

#### [0215] Fc多肽

[0216] 在一些情况下，本公开的多聚体多肽的第一和/或第二多肽链包含Fc多肽。本公开的多聚体多肽的Fc多肽可以是人IgG1 Fc、人IgG2 Fc、人IgG3 Fc、人IgG4 Fc等。在一些情况下，所述Fc多肽包含与图4A-C中示出的Fc区的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下，所述Fc区包含与图4A中示出的人IgG1 Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下，所述Fc区包含与图4A中示出的人IgG1 Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列；

并且包含N77的取代；例如，所述Fc多肽包含N77A取代。在一些情况下，所述Fc多肽包含与图4A中示出的人IgG2 Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列；例如，所述Fc多肽包含与图4A中示出的人IgG2 Fc多肽的氨基酸99-325具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下，所述Fc多肽包含与图4A中示出的人IgG3 Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列；例如，所述Fc多肽包含与图4A中示出的人IgG3 Fc多肽的氨基酸19-246具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下，所述Fc多肽包含与图4B中示出的人IgM Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列；例如，所述Fc多肽包含与图4B中示出的人IgM Fc多肽的氨基酸1-276具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下，所述Fc多肽包含与图4C中示出的人IgA Fc多肽具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列；例如，所述Fc多肽包含与图4C中示出的人IgA Fc多肽的氨基酸1-234具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0217] 在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的Fc多肽包含图33A中示出的氨基酸序列(人IgG1 Fc)。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的Fc多肽包含图33A中示出的氨基酸序列(人IgG1 Fc)，除了用除天冬酰胺以外的氨基酸取代N297。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的Fc多肽包含图33C中示出的氨基酸序列(包含N297A取代的人IgG1 Fc)。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的Fc多肽包含图33A中示出的氨基酸序列(人IgG1 Fc)，除了用除亮氨酸以外的氨基酸取代L234。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的Fc多肽包含图33A中示出的氨基酸序列(人IgG1 Fc)，除了用除亮氨酸以外的氨基酸取代L235。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的Fc多肽包含图33D中示出的氨基酸序列(包含L234A取代和L235A取代的人IgG1 Fc)。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的Fc多肽包含图33A中示出的氨基酸序列(人IgG1 Fc)，除了用除脯氨酸以外的氨基酸取代P331；在一些情况下，所述取代是P331S取代。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的Fc多肽包含图33A中示出的氨基酸序列(人IgG1 Fc)，除了用除亮氨酸以外的氨基酸取代L234和L235。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的Fc多肽包含图33A中示出的氨基酸序列(人IgG1Fc)，除了用除亮氨酸以外的氨基酸取代L234和L235，和用除脯氨酸以外的氨基酸取代P331。在一些情况下，本公开的多聚体多肽中存在的Fc多肽包含图33B中示出的氨基酸序列(包含L234F、L235E和P331S取代的人IgG1 Fc)。

#### [0218] 另外的多肽

[0219] 本公开的多聚体多肽的多肽链可包含一种或多种除上述那些以外的多肽。合适的另外多肽包括表位标签和亲和结构域。所述一种或多种另外的多肽可包含在本公开的多聚



体多肽的多肽链的N-末端,本公开的多聚体多肽的多肽链的C-末端,或在本公开的多聚体多肽的多肽链内部。

[0220] 表位标签

[0221] 合适的表位标签包括但不限于,血凝素(HA;例如,YPYDVPDYA(SEQ ID NO:20); FLAG(例如,DYKDDDDK(SEQ ID NO:21);c-myc(例如,EQKLISEEDL;SEQ ID NO:22)等。

[0222] 亲和结构域

[0223] 亲和结构域包括可与结合配偶体相互作用的肽序列,例如,如固定在固体载体上的肽序列,其适用于鉴定或纯化。当与表达的蛋白质融合时,编码多个连续单一氨基酸(如组氨酸)的DNA序列可通过与树脂柱(如镍琼脂糖凝胶)的高亲和力结合用于重组蛋白质的一步纯化。示例性亲和结构域包括His5(HHHHH)(SEQ ID NO:23);HisX6(HHHHHH)(SEQ ID NO:24);C-myc(EQKLISEEDL)(SEQ ID NO:22);Flag(DYKDDDDK)(SEQ ID NO:21);StrepTag(WSHPQFEK)(SEQ ID NO:25);血凝素,例如,HA标签(YPYDVPDYA)(SEQ IDNO:20);谷胱甘肽-S-转移酶(GST);硫氧还蛋白;纤维素结合结构域;RYIRS(SEQ ID NO:26);Phe-His-His-Thr(SEQ ID NO:88);壳多糖结合结构域;S-肽;T7肽;SH2结构域;C-端RNA标签,WEAAAREACCRECCARA(SEQ ID NO:27);金属结合结构域,例如,锌结合结构域或钙结合结构域,如来自钙结合蛋白的那些,例如,钙调蛋白、肌钙蛋白C、钙调磷酸酶B、肌球蛋白轻链、恢复蛋白、S-调控蛋白、视锥蛋白、VILIP、神经钙蛋白、海马钙蛋白、聚集蛋白、钙牵蛋白、钙蛋白酶大亚基、S100蛋白、小清蛋白、钙结合蛋白D9K、钙结合蛋白D28K以及钙网膜蛋白;内含肽;生物素;链霉抗生物素蛋白;MyoD;Id;亮氨酸拉链序列;以及麦芽糖结合蛋白。

[0224] 本公开的多聚体多肽的实例

[0225] 以下是本公开的IL-2/synTac多聚体多肽的非限制性实施方案。

[0226] 在一些情况下,本公开的IL-2/synTac多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)表位;ii)包含图34A中示出的氨基酸序列的 $\beta$ 2-微球蛋白( $\beta$ 2M)多肽;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)本公开的变体IL-2多肽;ii)包含图34C中示出的氨基酸序列的主要组织相容性复合物(MHC)重链多肽;和iii)包含选自N297A、L234A、L235A、L234F、L235E和P331S的一种或多种氨基酸取代的IgG1 Fc多肽。在一些情况下,所述变体IL-2多肽包含H16A和F42A取代。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含N297A取代。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含L234A取代和L235A取代。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含L234F取代和L235E取代。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含L234F取代、L235E取代和P331S取代。在一些情况下,所述第二多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝。在一些情况下,所述第一多肽包含在所述表位与所述 $\beta$ 2M多肽之间的肽接头。在一些情况下,所述第二多肽包含以下中的一者或多者之间的肽接头:a)所述变体IL-2多肽的第一拷贝与所述变体IL-2多肽的第二拷贝;b)所述变体IL-2多肽与所述MHC重链多肽;以及c)所述MHC重链多肽与所述IgG1 Fc多肽之间。在一些情况下,所述肽接头使选自(GGGGS)<sub>3</sub>(SEQ ID NO:89)、(GGGGS)<sub>4</sub>(SEQ ID NO:90)和AAAAGG(SEQ ID NO:28)。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含图33B中示出的氨基酸序列。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含图33C中示出的氨基酸序列。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含图33D中示出的氨基酸序列。

[0227] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至

C-末端依次包含:i)表位;ii)包含图34A中示出的氨基酸序列的 $\beta$ 2-微球蛋白多肽;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)包含图34B中示出的氨基酸序列的变体IL-2多肽;ii)包含图34C中示出的氨基酸序列的主要组织相容性复合物(MHC)重链多肽;和iii)包含选自N297A、L234A、L235A、L234F、L235E和P331S的一种或多种氨基酸取代的IgG1 Fc多肽。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含N297A取代。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含L234A取代和L235A取代。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含L234F取代和L235E取代。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含L234F取代、L235E取代和P331S取代。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含图33B中示出的氨基酸序列。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含图33C中示出的氨基酸序列。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含图33D中示出的氨基酸序列。在一些情况下,所述第二多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝。在一些情况下,所述第一多肽包含在所述表位与所述 $\beta$ 2M多肽之间的肽接头。在一些情况下,所述第二多肽包含以下中的一者或多者之间的肽接头:a)所述变体IL-2多肽的第一拷贝与所述变体IL-2多肽的第二拷贝;b)所述变体IL-2多肽与所述MHC重链多肽;以及c)所述MHC重链多肽与所述IgG1 Fc多肽之间。在一些情况下,所述肽接头使选自 $(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO:89)、 $(GGGGS)_4$ (SEQ ID NO:90)和AAAGG(SEQ ID NO:28)。

[0228] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)包含氨基酸序列YMLDLQPETT(SEQ ID NO:13)的表位;ii)包含图34A中示出的氨基酸序列的 $\beta$ 2-微球蛋白多肽;以及b)第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:i)包含图34B中示出的氨基酸序列的变体IL-2多肽;ii)包含图34C中示出的氨基酸序列的主要组织相容性复合物(MHC)重链多肽;和iii)包含图33A、33B、33C或33D中示出的氨基酸序列的IgG1 Fc多肽。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含图33B中示出的氨基酸序列。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含图33C中示出的氨基酸序列。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含图33D中示出的氨基酸序列。在一些情况下,所述第二多肽包含变体IL-2多肽的两个拷贝。在一些情况下,所述第一多肽包含在所述表位与所述 $\beta$ 2M多肽之间的肽接头。在一些情况下,所述第二多肽包含以下中的一者或多者之间的肽接头:a)所述变体IL-2多肽的第一拷贝与所述变体IL-2多肽的第二拷贝;b)所述变体IL-2多肽与所述MHC重链多肽;以及c)所述MHC重链多肽与所述IgG1 Fc多肽之间。在一些情况下,所述肽接头使选自 $(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO:89)、 $(GGGGS)_4$ (SEQ ID NO:90)和AAAGG(SEQ ID NO:28)。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含图33B中示出的氨基酸序列。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含图33C中示出的氨基酸序列。在一些情况下,所述IgG1 Fc多肽包含图33D中示出的氨基酸序列。

[0229] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)包含图31中示出的氨基酸序列的第一多肽;和b)包含图22中示出的氨基酸序列的第二多肽。

[0230] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)包含图31中示出的氨基酸序列的第一多肽;和b)包含图25中示出的氨基酸序列的第二多肽。

[0231] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽包含:a)包含图31中示出的氨基酸序列的第一多肽;和b)包含图28中示出的氨基酸序列的第二多肽。

[0232] 核酸

[0233] 本公开提供了一种核酸,所述核酸包含编码本公开的变体IL-2多肽的核苷酸序

列。本公开提供了一种核酸,所述核酸包含编码本公开的IL-2融合多肽的核苷酸序列。

[0234] 本公开提供了核酸,所述核酸包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列。在一些情况下,本公开的多聚体多肽的单独多肽链在单独的核酸中编码。在一些情况下,本公开的多聚体多肽的所有多肽链都在单一核酸中编码。在一些情况下,第一核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽的核苷酸序列;第二核酸包含编码本公开多聚体多肽的第二多肽的核苷酸序列。在一些情况下,单一核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽和本公开的多聚体多肽的第二多肽的核苷酸序列。

[0235] 本公开的核酸的非限制性实例示出于图23A、图26A、图29A和图32中。

[0236] 编码多聚体多肽的单独多肽链的单独核酸

[0237] 本公开提供了核酸,所述核酸包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列。如上所述,在一些情况下,本公开的多聚体多肽的单独多肽链在单独的核酸中编码。在一些情况下,编码本公开的多聚体多肽的单独多肽链的核苷酸序列与转录控制元件(例如启动子,如在真核细胞中起作用的启动子)可操作地连接,其中所述启动子可以是组成型启动子或诱导型启动子。

[0238] 本公开提供第一核酸和第二核酸,其中所述第一核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽的核苷酸序列,其中所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)表位(例如,T细胞表位);b)第一种MHC多肽;和c)免疫调节多肽(例如,本公开的变体IL-2多肽);并且其中所述第二核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第二多肽的核苷酸序列,其中所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)第二MHC多肽;和b)Ig Fc多肽。在上文描述了合适的T细胞表位、MHC多肽、免疫调节多肽和Ig Fc多肽。在一些情况下,编码第一和第二多肽的核苷酸序列与转录控制元件可操作地连接。在一些情况下,所述转录控制元件是在真核细胞中起作用的启动子。在一些情况下,所述核酸存在于单独的表达载体中。

[0239] 本公开提供第一核酸和第二核酸,其中所述第一核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽的核苷酸序列,其中所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)表位(例如,T细胞表位);和b)第一MHC多肽;并且其中所述第二核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第二多肽的核苷酸序列,其中所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)免疫调节多肽(例如,本公开的变体IL-2多肽);b)第二MHC多肽;和c)Ig Fc多肽。在上文描述了合适的T细胞表位、MHC多肽、免疫调节多肽和Ig Fc多肽。在一些情况下,编码第一和第二多肽的核苷酸序列与转录控制元件可操作地连接。在一些情况下,所述转录控制元件是在真核细胞中起作用的启动子。在一些情况下,所述核酸存在于单独的表达载体中。

[0240] 编码多聚体多肽中存在的两种或更多种多肽的核酸

[0241] 本公开提供了一种核酸,所述核酸包含至少编码本公开的多聚体多肽的第一多肽和第二多肽的核苷酸序列。在一些情况下,当本公开的多聚体多肽包含第一、第二和第三多肽时,所述核酸包含编码所述第一、第二和第三多肽的核苷酸序列。在一些情况下,编码本公开的多聚体多肽的第一多肽和第二多肽的核苷酸序列包含插入在编码所述第一多肽的核苷酸序列与编码所述第二多肽的核苷酸序列之间的可蛋白水解切割的接头。在一些情况下,编码本公开的多聚体多肽的第一多肽和第二多肽的核苷酸序列包含插入在编码所述第一多肽的核苷酸序列与编码所述第二多肽的核苷酸序列之间的内部核糖体进入位点(IRES)。在一些情况下,编码本公开的多聚体多肽的第一多肽和第二多肽的核苷酸序列包

含插入在编码所述第一多肽的核苷酸序列与编码所述第二多肽的核苷酸序列之间的核糖体跳过信号(或顺式作用水解酶元件,CHYSEL)。下文描述了核酸的实例,其中可蛋白水解切割的接头提供在编码本公开的多聚体多肽的第一多肽和第二多肽的核苷酸序列之间;在这些实施方案中的任一个中,可使用IRES或核糖体跳过信号来代替编码可蛋白水解切割接头的核苷酸序列。

[0242] 在一些情况下,第一核酸(例如,重组表达载体、mRNA、病毒RNA等)包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽链的核苷酸序列;并且第二核酸(例如,重组表达载体、mRNA、病毒RNA等)包含编码本公开的多聚体多肽的第二多肽链的核苷酸序列。在一些情况下,编码第一多肽的核苷酸序列和编码第二多肽的第二核苷酸序列各自可操作地连接至转录控制元件,例如启动子,如在真核细胞中起作用的启动子,其中所述启动子可以是组成型启动子或诱导型启动子。

[0243] 本公开提供了一种核酸,所述核酸包含编码重组多肽的核苷酸序列,其中所述重组多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)表位(例如,T细胞表位);b)第一MHC多肽;c)免疫调节多肽(例如,本公开的变体IL-2多肽);d)可蛋白水解切割的接头;e)第二MHC多肽;以及f)免疫球蛋白(Ig)Fc多肽。本公开提供了一种核酸,所述核酸包含编码重组多肽的核苷酸序列,其中所述重组多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)第一前导肽;b)所述表位;c)所述第一MHC多肽;d)所述免疫调节多肽(例如,本公开的变体IL-2多肽);e)所述可蛋白水解切割的接头;f)第二前导肽;g)第二MHC多肽;以及h)所述Ig Fc多肽。本公开提供了一种核酸,所述核酸包含编码重组多肽的核苷酸序列,其中所述重组多肽从N-末端至C-末端依次包含:a)表位;b)第一MHC多肽;c)可蛋白水解切割的接头;d)免疫调节多肽(例如,本公开的变体IL-2多肽);e)第二MHC多肽;以及f)Ig Fc多肽。在一些情况下,所述第一前导肽和所述第二前导肽是 $\beta$ 2-M前导肽。在一些情况下,所述核苷酸序列与转录控制元件可操作地连接。在一些情况下,所述转录控制元件是在真核细胞中起作用的启动子。

[0244] 在上文描述了合适的MHC多肽。在一些情况下,所述第一MHC多肽是 $\beta$ 2-微球蛋白多肽;并且其中所述第二MHC多肽是MHC I类重链多肽。在一些情况下,所述 $\beta$ 2-微球蛋白多肽包含与图6中列出的氨基酸序列之一具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,所述MHC I类重链多肽是HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、HLA-K或HLA-L重链。在一些情况下,所述MHC I类重链多肽包含与图5A-5C之一中列出的氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,所述第一MHC多肽是MHC II类 $\alpha$ 链多肽;并且其中所述第二MHC多肽是MHC II类 $\beta$ 链多肽。

[0245] 在上文描述了合适的Fc多肽。在一些情况下,所述Ig Fc多肽是IgG1 Fc多肽、IgG2 Fc多肽、IgG3 Fc多肽、IgG4 Fc多肽、IgA Fc多肽或IgM Fc多肽。在一些情况下,所述Ig Fc多肽包含与图4A-4C中示出的氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0246] 在上文描述了合适的免疫调节多肽。

[0247] 在上文描述了合适的可蛋白水解切割的接头。在一些情况下,所述可蛋白水解切割的接头包含选自以下的氨基酸序列:a)LEVLFQGP (SEQ ID NO:29);b)ENLYTQS (SEQ ID NO:30);c)DDDDK (SEQ ID NO:31);d)LVPR (SEQ ID NO:32);以及e)GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:33)。

[0248] 在一些情况下,所述表位与所述第一MHC多肽之间的接头包含第一Cys残基,并且

所述第二MHC多肽包含氨基酸取代以提供第二Cys残基,以使得所述第一和第二Cys残基提供在所述接头与第二MHC多肽之间的二硫键联。在一些情况下,第一MHC多肽包含氨基酸取代以提供第一Cys残基,并且所述第二MHC多肽包含氨基酸取代以提供第二Cys残基,以使得所述第一Cys残基和第二Cys残基提供在所述第一MHC多肽与第二MHC多肽之间的二硫键联。

#### [0249] 重组表达载体

[0250] 本公开提供了一种重组表达载体,所述重组表达载体包含本公开的核酸。在一些情况下,所述重组表达载体是非病毒载体。在一些实施方案中,所述重组表达载体是病毒构建体,例如重组腺伴随病毒构建体(参见,例如美国专利号7,078,387)、重组腺病毒构建体、重组慢病毒构建体、重组逆转录病毒构建体、非整合病毒载体等。

[0251] 合适的表达载体包括但不限于病毒载体(例如基于以下的病毒载体:牛痘病毒;脊髓灰质炎病毒;腺病毒(参见,例如Li等人,Invest Ophthalmol Vis Sci 35:25432549,1994; Borrás等人,Gene Ther 6:515524,1999;Li和Davidson,PNAS 92:77007704,1995; Sakamoto等人,H Gene Ther 5:10881097,1999;WO 94/12649;WO 93/03769;WO 93/19191; WO 94/28938;WO 95/11984以及WO 95/00655));腺伴随病毒(参见,例如Ali等人,Hum Gene Ther 9:8186,1998;Flannery等人,PNAS 94:69166921,1997;Bennett等人,Invest Ophthalmol Vis Sci 38:28572863,1997;Jomary等人,Gene Ther 4:683690,1997;Rolling等人,Hum Gene Ther 10:641648,1999;Ali等人,Hum Mol Genet 5:591 594,1996; Srivastava的WO 93/09239;Samulski等人,J.Vir. (1989)63:3822-3828;Mendelson等人, Virol. (1988)166:154-165;以及Flotte等人,PNAS(1993)90:10613-10617);SV40;单纯疱疹病毒;人免疫缺陷病毒(参见,例如Miyoshi等,PNAS 94:10319 23,1997;Takahashi等,J Virol 73:7812 7816,1999);逆转录病毒载体(例如,鼠白血病病毒、脾坏死病毒和源自如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒的逆转录病毒的载体、禽白血病病毒、慢病毒、人免疫缺陷病毒、骨髓增生肉瘤病毒以及乳腺肿瘤病毒)等。

[0252] 众多合适的表达载体为本领域技术人员已知并且许多为商业上可获得的。通过举例提供以下载体;对于真核宿主细胞:pXT1、pSG5 (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG和 pSVLSV40(Pharmacia)。然而,可使用任何其他载体,只要所述载体与宿主细胞相容。

[0253] 取决于所使用的宿主/载体系统,可在表达载体中使用任何许多合适的转录和翻译控制元件,包括组成型和诱导型启动子、转录增强子元件、转录终止子等(参见,例如 Bitter等人(1987)Methods in Enzymology,153:516-544)。

[0254] 在一些实施方案中,编码靶向DNA的RNA和/或定点修饰多肽的核苷酸序列可操作地连接至控制元件,例如转录控制元件,如启动子。转录控制元件可在真核细胞,例如哺乳动物细胞中起作用;或在原核细胞(例如细菌或古细菌细胞)中起作用。在一些实施方案中,编码靶向DNA的RNA和/或位点定向修饰多肽的核苷酸序列与多个控制元件可操作地连接,所述控制元件允许在原核细胞和真核细胞中表达所述编码靶向DNA的RNA和/或位点定向修饰多肽的核苷酸序列。

[0255] 合适的真核启动子(在真核细胞中起作用的启动子)的非限制性实例包括来自巨细胞病毒(CMV)立即早期、单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶、早期和晚期SV40、逆转录病毒的长末端重复序列(LTR)以及小鼠金属硫蛋白-I的那些启动子。选择适当的载体和启动子在本

领域普通技术人员的水平内。表达载体还可含有用于翻译起始的核糖体结合位点和转录终止子。表达载体还可包括用于扩增表达的适当序列。

#### [0256] 遗传修饰的宿主细胞

[0257] 本公开提供了一种遗传修饰的宿主细胞,其中所述宿主细胞用本公开的核酸进行遗传修饰。

[0258] 合适的宿主细胞包括真核细胞,如酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述宿主细胞是哺乳动物细胞系的细胞。合适的哺乳动物细胞系包括人细胞系、非人灵长类动物细胞系、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠)细胞系等。合适的哺乳动物细胞系包括但不限于HeLa细胞(例如,美国典型培养物保藏所(ATCC)号CCL-2)、CHO细胞(例如,ATCC号CRL9618、CCL61、CRL9096)、293细胞(例如,ATCC号CRL-1573)、Vero细胞、NIH 3T3细胞(例如,ATCC号CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞(例如,ATCC号CCL10)、PC12细胞(ATCC号CRL1721)、COS细胞、COS-7细胞(ATCC号CRL1651)、RAT1细胞、小鼠L细胞(ATCC号CCLI.3)、人胚肾(HEK)细胞(ATCC号CRL1573)、HLHepG2细胞等。

[0259] 在一些情况下,所述宿主细胞是已经遗传修饰以使得其不合成内源性MHC  $\beta$ 2-M的哺乳动物细胞。

#### [0260] 产生多聚体多肽的方法

[0261] 本公开提供了产生本公开的多聚体多肽的方法。所述方法通常涉及在培养基中培养用包含编码多聚体多肽的核苷酸序列的重组表达载体进行遗传修饰的宿主细胞;以及从所述遗传修饰的宿主细胞和/或所述培养基中分离所述多聚体多肽。用包含编码多聚体多肽的核苷酸序列的重组表达载体进行遗传修饰的宿主细胞也称为“表达宿主”。如上所述,在一些情况下,本公开的多聚体多肽的单独多肽链在单独的重组表达载体中编码。在一些情况下,本公开的多聚体多肽的所有多肽链都在单一重组表达载体中编码。

[0262] 可使用标准蛋白质纯化方法来从表达宿主细胞(例如,从表达宿主细胞的溶解产物)和/或培养所述宿主细胞的培养基中分离多聚体多肽。

[0263] 例如,可由表达宿主制备溶解产物,并且使用高效液相色谱法(HPLC)、排阻色谱法、凝胶电泳、亲和色谱法或其他纯化技术来纯化溶解产物。或者,当多聚体多肽从表达宿主细胞分泌到培养基中时,可使用HPLC、排阻色谱法、凝胶电泳、亲和色谱法或其他纯化技术从培养基中纯化多聚体多肽。在一些情况下,所使用的组合物包含相对于与产物制备及其纯化的方法相关的污染物至少80重量%的所需产物、至少约85重量%、至少约95重量%或至少约99.5重量%。所述百分比可基于总蛋白质。

[0264] 在一些情况下,例如,在多聚体多肽包含亲和标签的情况下,可使用所述亲和标签的固定化结合配偶体来纯化多聚体多肽。

#### [0265] 组合物

[0266] 本公开提供了组合物,包括药物组合物,所述组合物包含本公开的变体IL-2多肽。本公开提供了组合物,包括药物组合物,所述组合物包含本公开的多聚体多肽。本公开提供了组合物,包括药物组合物,所述组合物包含本公开的核酸或重组表达载体。

#### [0267] 包含多聚体多肽的组合物

[0268] 本公开的组合物可包含除了本公开的多聚体多肽以外的以下中的一种或多种:盐,例如NaCl、MgCl<sub>2</sub>、KCl、MgSO<sub>4</sub>等;缓冲剂,例如Tris缓冲液、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙

磺酸) (HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)等;增溶剂;去污剂,例如非离子型去污剂如吐温-20等;蛋白酶抑制剂;甘油等。

[0269] 所述组合物可包含药学上可接受的赋形剂,各种药学上可接受的赋形剂是本领域已知的并且无需在本文中详细讨论。药学上可接受的赋形剂已充分描述于多种出版物中,所述出版物包括例如“Remington:The Science and Practice of Pharmacy”,第19版(1995),或最新版本,Mack Publishing Co;A.Gennaro(2000)”Remington:The Science and Practice of Pharmacy”,第20版,Lippincott,Williams,&Wilkins;Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems(1999)H.C.Ansel等人编,第7版,Lippincott,Williams,&Wilkins;以及Handbook of Pharmaceutical Excipients(2000)A.H.Kibbe等人编,第3版Amer.Pharmaceutical Assoc。

[0270] 药物组合物可包含本公开的多聚体多肽和药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,主题药物组合物将适于施用至受试者,例如将是无菌的。例如,在一些实施方案中,例如当主题药物组合物为无菌的并且不含可检测的热原和/或其他毒素时,所述组合物将适于施用至人受试者。

[0271] 蛋白质组合物可包含其他组分,如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、镁、碳酸盐等。所述组合物可含有模拟生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如,乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠、盐酸盐、硫酸盐、溶剂化物(例如,混合离子盐、水、有机物)、水合物(例如,水)等。

[0272] 例如,组合物可包括水溶液、粉末形式、颗粒、片剂、丸剂、栓剂、胶囊、悬浮液、喷雾剂等。可根据下文描述的各种施用途径来配制组合物。

[0273] 当本公开的多聚体多肽作为可注射剂(例如皮下、腹膜内、肌内和/或静脉内)直接施用到组织中时,制剂可作为可立即使用的剂型提供,或者作为非水性形式(例如可重构的储存稳定的粉末)或水性形式(如由药学上可接受的载体和赋形剂组成的液体)提供。还可提供含蛋白质的制剂,以便在施用后增强主题蛋白质的血清半衰期。例如,蛋白质可以脂质体制剂形式提供,制备成胶体,或用于延长血清半衰期的其他常规技术。多种方法可用于制备脂质体,如在例如Szoka等人1980Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467、美国专利号4,235,871、4,501,728和4,837,028中所描述。所述制剂也可以控释或缓释形式提供。

[0274] 适于肠胃外施用的制剂的其他实例包括等渗无菌注射溶液、抗氧化剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质、悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂以及防腐剂。例如,主题药物组合物可存在于容器,例如无菌容器,如注射器中。所述制剂可以单剂量或多剂量密封容器,如安瓿和小瓶形式呈现,并且可储存于冷冻干燥(冻干)的条件下,仅需在使用前即刻添加无菌液体赋形剂(例如水)以供注射。临时注射溶液和悬浮液可由无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0275] 制剂中本公开的多聚体多肽的浓度可广泛变化(例如,从小于约0.1重量%,通常在或至少约2重量%至多至20重量%至50重量%或更多)并且将通常根据所选择的特定施用方式和患者的需要,主要基于流体体积、粘度和基于患者的因素来选择。

[0276] 本公开提供了一种容器,所述容器包括本公开的组合物,例如液体组合物。所述容

器可以是例如注射器、安瓿等。在一些情况下,所述容器是无菌的。在一些情况下,所述容器和组合物两者均是无菌的。

[0277] 本公开提供了组合物,包括药物组合物,所述组合物包含本公开的变体IL-2多肽。组合物可包含:a)本公开的变体IL-2多肽;和b)赋形剂,如上文针对多聚体多肽所描述。在一些情况下,所述赋形剂是药学上可接受的赋形剂。

[0278] 包含核酸或重组表达载体的组合物

[0279] 本公开提供了组合物,例如药物组合物,所述组合物包含本公开的核酸或重组表达载体。多种多样的药学上可接受的赋形剂在本领域中是已知的且无需在本文中详细论述。药学上可接受的赋形剂已充分描述于多种出版物中,所述出版物包括例如A.Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 第20版, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel等编, 第7版, Lippincott, Williams, & Wilkins; 以及 Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A.H. Kibbe等编, 第3版 Amer. Pharmaceutical Assoc.

[0280] 本公开的组合物可包含:a)主题核酸或重组表达载体;和b)以下中的一种或多种:缓冲剂、表面活性剂、抗氧化剂、亲水性聚合物、糊精、螯合剂、悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂、抑菌剂、润湿剂以及防腐剂。合适的缓冲剂包括但不限于(如N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES)、双(2-羟乙基)氨基-三(羟甲基)甲烷(BIS-Tris)、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'3-丙磺酸(EPPS或HEPPS)、甘氨酸甘氨酸、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、哌嗪-N,N'-双(2-乙烷-磺酸)(PIPES)、碳酸氢钠、3-(N-三(羟甲基)-甲基-氨基)-2-羟基-丙磺酸(TAPSO)、(N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸(TES)、N-三(羟甲基)甲基-甘氨酸(Tricine)、三(羟甲基)-氨基甲烷(Tris)等)。合适的盐包括例如,NaCl、MgCl<sub>2</sub>、KCl、MgSO<sub>4</sub>等。

[0281] 本公开的药物制剂可包含约0.001%至约90%(w/w)的量的本公开的核酸或重组表达载体。在下文的制剂描述中,“主题核酸或重组表达载体”应理解为包括本公开的核酸或重组表达载体。例如,在一些实施方案中,主题制剂包含本公开的核酸或重组表达载体。

[0282] 可将主题核酸或重组表达载体与其他化合物或化合物的混合物混合、包封、缀合或以其他方式缔合;此类化合物可包括例如脂质体或受体靶向分子。主题核酸或重组表达载体可与一种或多种有助于摄取、分布和/或吸收的组分组合在制剂中。

[0283] 主题核酸或重组表达载体组合物可被配制成任何许多可能的剂型,如但不限于片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆剂、软凝胶、栓剂以及灌肠剂。主题核酸或重组表达载体组合物也可被配制成水性、非水性或混合介质中的悬浮液。水性悬浮液还可包含增加该悬浮液的粘度的物质,这样的物质包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。悬浮液还可含有稳定剂。

[0284] 包含主题核酸或重组表达载体的制剂可以是脂质体制剂。如本文所用,术语“脂质体”是指由以一个或多个球形双层形式排列的两性脂质构成的囊泡。脂质体是具有由亲脂性材料形成的膜和含有待递送的组合物水性内部的单层或多层囊泡。阳离子脂质体是与带负电荷的DNA分子相互作用以形成稳定复合物的带正电荷的脂质体。认为pH值敏感性或带负电荷的脂质体囊封DNA而非与其复合。阳离子脂质体和非阳离子脂质体两者均可用于递送主题核酸或重组表达载体。



[0285] 脂质体还包括“空间稳定的”脂质体,其是如本文所用的指包含一种或多种专门化脂质的脂质体的术语,当并入脂质体中时所述脂质导致相对于缺少此类专门化脂质的脂质体而言的增加的循环寿命。空间稳定脂质体的实例是脂质体的囊泡形成脂质部分中的一部分包含一种或多种糖脂或者利用一种或多种亲水性聚合物(如聚乙二醇(PEG)部分)衍生化的脂质体。脂质体及其用途进一步描述于美国专利号6,287,860中,所述美国专利以引用的方式整体并入本文。

[0286] 本公开的制剂和组合物还可包含表面活性剂。在药物产品、制剂和乳液中使用表面活性剂是本领域熟知的。表面活性剂及其用途进一步描述于美国专利号6,287,860中。

[0287] 在一个实施方案中,包含各种渗透增强剂以实现核酸的有效递送。除了帮助非亲脂药物扩散穿过细胞膜以外,渗透增强剂还增强亲脂药物的渗透性。渗透增强剂可归类为属于以下物种广泛类别中的一种:即,表面活性剂、脂肪酸、胆汁盐、螯合剂和非螯合非表面活性剂。渗透增强剂及其用途进一步描述于美国专利号6,287,860中,所述美国专利以引用的方式整体并入本文。

[0288] 用于口服施用的组合物和制剂包括粉末或颗粒、微粒、纳米颗粒、于水或非水性介质中的悬浮液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、囊剂、片剂或小片剂。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或结合剂可为需要的。合适的口服制剂包括其中主题反义核酸与一种或多种渗透增强剂、表面活性剂和螯合剂结合施用的那些。合适的表面活性剂包括但不限于脂肪酸和/或其酯或盐、胆汁酸和/或其盐。合适的胆汁酸/盐和脂肪酸及其用途进一步描述于美国专利号6,287,860中。同样合适的是渗透增强剂(例如脂肪酸/盐)与胆汁酸/盐组合的组合。一种示例性的合适组合是月桂酸、癸酸和UDCA的钠盐。其他渗透增强剂包括但不限于聚氧乙烯-9-月桂基醚和聚氧乙烯-20-鲸蜡醚。合适的渗透增强剂还包括丙二醇、二甲亚砜、三乙醇胺、N,N-二甲基乙酰胺、N,N-二甲基甲酰胺、2-吡咯烷酮及其衍生物、四氢糠醇以及AZONE™。

[0289] 调节T细胞活性的方法

[0290] 本公开提供了一种选择性地调节表位特异性T细胞的活性的方法,所述方法包括使所述T细胞与本公开的多聚体多肽接触,其中使所述T细胞与本公开的多聚体多肽接触选择性地调节所述表位特异性T细胞的活性。在一些情况下,所述接触在体外发生。在一些情况下,所述接触在体内发生。在一些情况下,所述接触离体发生。

[0291] 在一些情况下,例如,当靶T细胞是CD8<sup>+</sup>T细胞时,所述多聚体多肽包含I类MHC多肽(例如, $\beta$ 2-微球蛋白和I类MHC重链)。在一些情况下,例如,当靶T细胞是CD4<sup>+</sup>T细胞时,所述多聚体多肽包含II类MHC多肽(例如,II类MHC $\alpha$ 链;II类MHC $\beta$ 链)。

[0292] 当本公开的多聚体多肽包含为活化多肽的免疫调节多肽时,使T细胞与多聚体多肽接触活化表位特异性T细胞。在一些情况下,所述表位特异性T细胞是对癌细胞上存在的表位有特异性的T细胞,并且使所述表位特异性T细胞与多聚体多肽接触增加T细胞针对癌细胞的细胞毒性活性。在一些情况下,所述表位特异性T细胞是对癌细胞上存在的表位有特异性的T细胞,并且使所述表位特异性T细胞与多聚体多肽接触增加所述表位特异性T细胞的数量。

[0293] 在一些情况下,所述表位特异性T细胞是对病毒感染的细胞上存在的表位有特异性的T细胞,并且使所述表位特异性T细胞与多聚体多肽接触增加T细胞针对所述病毒感染

的细胞的细胞毒性活性。在一些情况下,所述表位特异性T细胞是对病毒感染的细胞上存在的表位有特异性的T细胞,并且使所述表位特异性T细胞与多聚体多肽接触增加所述表位特异性T细胞的数量。

[0294] 当本公开的多聚体多肽包含为抑制性多肽的免疫调节多肽时,使T细胞与多聚体接触抑制表位特异性T细胞。在一些情况下,所述表位特异性T细胞是对自身抗原中存在的表位有特异性的自身反应性T细胞,并且所述接触降低自身反应性T细胞的数量。

[0295] 选择性地递送共刺激多肽(例如,IL-2)的方法

[0296] 本公开提供了一种例如以使得靶向对给定表位有特异性的TCR的方式将共刺激多肽(如IL-2)或天然存在的共刺激多肽的亲和力降低的变体(如本文公开的IL-2变体)递送至选定T细胞或选定T细胞群体的方法。本公开提供了一种将共刺激多肽(如IL-2)或天然存在的共刺激多肽的亲和力降低的变体(如本文公开的IL-2变体)选择性地递送至携带对存在于本公开的多聚体多肽中的表位有特异性的TCR的靶T细胞的方法。所述方法包括使T细胞群体与本公开的多聚体多肽接触。所述T细胞群体可以是混合群体,所述混合群体包含:i)靶T细胞;ii)对所述表位不具特异性的非靶T细胞(例如,对所述表位特异性T细胞所结合的表位以外的表位有特异性的T细胞)。表位特异性T细胞对多聚体多肽中存在的表位呈递肽具有特异性,并且结合至由所述多聚体多肽提供的肽HLA复合物或肽MHC复合物。使T细胞群体与多聚体多肽接触将多聚体多肽中存在的共刺激多肽(例如,IL-2或IL-2的亲和力降低的变体)选择性地递送至对存在于多聚体多肽中的表位有特异性的T细胞。

[0297] 因此,本公开提供了一种将共刺激多肽(如IL-2)或天然存在的共刺激多肽的亲和力降低的变体(如本文公开的IL-2变体)或两者的组合选择性地递送至靶T细胞的方法,所述方法包括使混合T细胞群体与本公开的多聚体多肽接触。所述混合T细胞群体包含靶T细胞和非靶T细胞。靶T细胞对多聚体多肽内存在的表位有特异性。使所述混合T细胞群体与本公开的多聚体多肽接触将存在于多聚体多肽内的共刺激多肽递送至靶T细胞。

[0298] 例如,将本公开的多聚体多肽与T细胞群体接触,所述T细胞群体包含:i)对存在于所述多聚体多肽中的表位有特异性的靶T细胞;和ii)非靶T细胞,例如对第二表位有特异性的T细胞,所述第二表位不是存在于多聚体多肽中的表位。与所述群体接触使得存在于多聚体多肽中的共刺激多肽(例如,天然存在的共刺激多肽(例如,天然存在的IL-2)或天然存在的共刺激多肽的亲和力降低的变体(例如,本文公开的IL-2变体))选择性递送至靶细胞。因此,例如,少于50%、少于40%、少于30%、少于25%、少于20%、少于15%、少于10%、少于5%或少于4%、3%、2%或1%的非靶T细胞结合多聚体多肽,并且结果,所述共刺激多肽(例如,IL-2或IL-2变体)不被递送至非靶T细胞。

[0299] 在一些情况下,所述T细胞群体是在体外。在一些情况下,所述T细胞群体是在体外,并且靶T细胞群体对本公开的多聚体多肽的生物应答(例如,T细胞活化和/或扩增和/或表型分化)是在体外培养的背景下引发。例如,可从个体获得混合T细胞群体,并且可在体外与多聚体多肽接触。这种接触可包括T细胞群体的单次或多次暴露至限定的剂量和/或暴露时间表。在一些情况下,所述接触使得在T细胞群体内选择性结合/活化和/或扩增靶T细胞,并使得产生活化和/或扩增的靶T细胞群体。例如,混合T细胞群体可以是外周血单核细胞(PBMC)。例如,在标准淋巴细胞培养条件下暴露于0.1-1000nM的本公开的多聚体多肽之前,可通过标准抽血和PBMC富集技术获得来自患者的PBMC。在以限定的剂量和时间表暴露混合

T细胞群体之前、期间和之后的时间点,可通过特异性肽-MHC多聚体和/或表型标志物或功能活性(例如细胞因子ELISpot测定)监测体外培养物中靶T细胞的丰度。在一些情况下,在体外实现抗原特异性细胞的最佳丰度和/或表型后,将活化的和/或扩增的靶T细胞群体的全部或部分施用至个体(自其获得混合T细胞群体的个体)。

[0300] 在一些情况下,所述T细胞群体是在体外。例如,从个体获得混合T细胞群替,并在体外与本公开的多聚体多肽接触。在体外细胞培养的情况下,可包括T细胞单次或多次暴露于限定剂量和/或暴露时间表的这种接触可用于确定混合T细胞群体包含对由所述多聚体多肽呈递的表位有特异性的T细胞。可通过测定包含混合T细胞群体的样品来确定对多聚体多肽的表位有特异性的T细胞的存在,所述T细胞群体包含对所述表位不具特异性的T细胞(非靶T细胞)并且可包含对所述表位有特异性的T细胞(靶T细胞)。已知测定可用于检测靶T细胞的活化和/或增殖,从而提供可确定特定多聚体多肽(synTac)是否具有结合至个体中存在的T细胞的表位的离体测定,并且因此所述多聚体多肽是否具有用作所述个体的治疗组合物的潜力。用于检测靶T细胞的活化和/或增殖的合适的已知测定法包括例如T细胞表型和/或抗原特异性和/或增殖的流式细胞术表征。这种检测表位特异性T细胞的存在测定(例如伴随诊断)可进一步包括另外的测定(例如效应细胞因子ELISpot测定)和/或适当的对照(例如抗原特异性和抗原非特异性多聚体肽-HLA染色试剂)以确定所述多聚体多肽是否选择性地结合/活化和/或扩增靶T细胞。因此,例如,本公开提供了一种在从个体获得的混合T细胞群体中检测结合目标表位的靶T细胞的存在的方法,所述方法包括:a)使所述混合T细胞群体与本公开的多聚体多肽在体外接触,其中所述多聚体多肽包含所述目标表位;和b)检测对所述接触作出反应的T细胞的活化和/或增殖,其中活化和/或增殖的T细胞指示靶T细胞的存在。或者和/或另外,如果使用多聚体多肽获得所需T细胞群体的活化和/或扩增(增殖),则包含所述活化/扩增的T细胞的T细胞群体的全部或一部分可作为疗法施用回至个体。

[0301] 在一些情况下,所述T细胞群体在个体体内。在此类情况下,本公开的用于将共刺激多肽(例如,IL-2或降低亲和力的IL-2)选择性地递送至表位特异性T细胞的方法包括将所述多聚体多肽施用至个体。

[0302] 向其选择性地递送共刺激多肽(例如,IL-2或降低亲和力的IL-2)的表位特异性T细胞在本文中也称为“靶T细胞”。在一些情况下,靶T细胞是调控性T细胞(Treg)。在一些情况下,所述Treg抑制或遏制自身反应性T细胞的活性。

[0303] 在一些情况下,所述靶T细胞是细胞毒性T细胞。例如,所述靶T细胞可以是对癌症表位有特异性的细胞毒性T细胞(例如,由癌细胞呈递的表位)。

[0304] 治疗方法

[0305] 本公开提供了一种在个体中选择性地调节表位特异性T细胞的活性的方法,所述方法包括向所述个体施用可有效选择性地调节个体中的表位特异性T细胞的活性的量的本公开的多聚体多肽或一种或多种编码所述多聚体多肽的核酸。在一些情况下,本公开的治疗方法包括向有此需要的个体施用一种或多种重组表达载体,所述重组表达载体包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列。在一些情况下,本公开的治疗方法包括向有需要的个体施用一种或多种mRNA分子,所述mRNA分子包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列。在一些情况下,本公开的治疗方法包括向有需要的个体施用本公开的多聚体多肽。

[0306] 本公开提供了一种选择性地调节个体中的表位特异性T细胞的活性的方法,所述方法包括向个体施用有效量的本公开的多聚体多肽或一种或多种核酸(例如,表达载体;mRNA等),所述核酸包含编码所述多聚体多肽的核苷酸序列,其中所述多聚体多肽选择性地调节所述个体中的表位特异性T细胞的活性。选择性地调节表位特异性T细胞的活性可治疗个体的疾病或病症。因此,本公开提供了一种治疗方法,所述治疗方法包括向有需要的个体施用有效量的本公开的多聚体多肽。

[0307] 在一些情况下,免疫调节多肽是活化多肽,并且所述多聚体多肽活化表位特异性T细胞。在一些情况下,所述表位是癌症相关表位,并且所述多聚体多肽增加对所述癌症相关表位有特异性的T细胞的活性。

[0308] 本公开提供了一种治疗个体的癌症的方法,所述方法包括向个体施用有效量的本公开的多聚体多肽或一种或多种核酸(例如,表达载体;mRNA等),所述核酸包含编码所述多聚体多肽的核苷酸序列,其中所述多聚体多肽包含为癌症表位的T细胞表位,并且其中所述多聚体多肽包含如本文所述的一种或多种刺激性免疫调节多肽。在一些情况下,多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时减少所述个体中的癌细胞的数量的量。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时,与在施用所述多聚体多肽之前或在不施用所述多聚体多肽的情况下所述个体中的癌细胞的数量相比,使所述个体中的癌细胞的数量减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的量。在一些情况下,本公开的多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时使个体中的癌细胞的数量减少至不可检测水平的量。在一些情况下,本公开的多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时降低所述个体中的肿瘤质量的量。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时,与在施用所述多聚体多肽之前或在不施用所述多聚体多肽的情况下所述个体中的肿瘤质量相比,使所述个体中的肿瘤质量减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的量。在一些情况下,本公开的多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时增加所述个体的存活时间的量。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时,与不施用所述多聚体多肽的个体的预期存活时间相比,使所述个体的存活时间增加至少1个月、至少2个月、至少3个月、3个月至6个月、6个月至1年、1年至2年、2年至5年、5年至10年或超过10年的量。

[0309] 在一些情况下,所述表位特异性T细胞是对病毒感染的细胞上存在的表位有特异性的T细胞,并且使所述表位特异性T细胞与多聚体多肽接触增加T细胞针对所述病毒感染的细胞的细胞毒性活性。在一些情况下,所述表位特异性T细胞是对病毒感染的细胞上存在的表位有特异性的T细胞,并且使所述表位特异性T细胞与多聚体多肽接触增加所述表位特异性T细胞的数量。

[0310] 因此,本公开提供了一种治疗个体中的病毒感染的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本公开的多聚体多肽或一种或多种包含编码所述多聚体多肽的核苷酸序列的核酸,其中所述多聚体多肽包含为病毒表位的T细胞表位,并且其中所述多聚体多肽包

含如本文所述的一种或多种刺激性免疫调节多肽。在一些情况下,多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时减少所述个体中的病毒感染的细胞的数量。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时,与在施用所述多聚体多肽之前或在不施用所述多聚体多肽的情况下所述个体中的病毒感染的细胞的数量相比,使所述个体中的病毒感染的细胞的数量减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的量。在一些情况下,本公开的多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时使个体中的病毒感染的细胞的数量减少至不可检测水平的量。

[0311] 因此,本公开提供了一种治疗个体中的感染的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本公开的多聚体多肽或一种或多种包含编码所述多聚体多肽的核苷酸序列的核酸,其中所述多聚体多肽包含为病原体相关表位的T细胞表位,并且其中所述多聚体多肽包含如本文所述的一种或多种刺激性免疫调节多肽。在一些情况下,多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时减少所述个体中的病原体的数量的量。例如,在一些情况下,本公开的多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时,与在施用所述多聚体多肽之前或在不施用所述多聚体多肽的情况下所述个体中的病原体的数量相比,使所述个体中的病原体的数量减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的量。在一些情况下,本公开的多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时使个体中的病原体的数量减少至不可检测水平的量。病原体包括病毒、细菌、原生动物等。

[0312] 在一些情况下,所述免疫调节多肽是抑制性多肽,并且所述多聚体多肽抑制所述表位特异性T细胞的活性。在一些情况下,所述表位是自身表位,并且所述多聚体多肽选择性地抑制对所述自身表位有特异性的T细胞的活性。

[0313] 本公开提供了一种治疗个体中的自身免疫病症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本公开的多聚体多肽或一种或多种包含编码所述多聚体多肽的核苷酸序列的核酸,其中所述多聚体多肽包含为自身表位的T细胞表位,并且其中所述多聚体多肽包含抑制性免疫调节多肽。在一些情况下,多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时,与在施用所述多聚体多肽之前或在不施用所述多聚体多肽的情况下所述个体中的自身反应性T细胞的数量相比,使自身反应性T细胞的数量减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的量。在一些情况下,多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时减少所述个体中的Th2细胞因子的产生的量。在一些情况下,多聚体多肽的“有效量”是当以一个或多个剂量施用至有需要的个体时,改善所述个体中与自身免疫疾病相关的一种或多种症状的量。

[0314] 如上所述,在一些情况下,在实施主题治疗方法中,将本公开的多聚体多肽作为多肽本身施用至有需要的个体。在其他情况下,在实施主题治疗方法中,将一种或多种包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列的核酸施用至有需要的个体。因此,在其他情况下,将本公开的一种或多种核酸,例如本公开的一种或多种重组表达载体施用至有需要的个体。

### [0315] 制剂

[0316] 在上文描述了合适的制剂,其中合适的制剂包含药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,合适的制剂包含:a)本公开的多聚体多肽;和b)药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,合适的制剂包含:a)核酸,所述核酸包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列;和b)药学上可接受的赋形剂;在一些情况下,所述核酸是mRNA。在一些情况下,合适的制剂包含:a)第一核酸,所述第一核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽的核苷酸序列;b)第二核酸,所述第二核酸包含编码本公开的多聚体多肽的第二多肽的核苷酸序列;以及c)药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,合适的制剂包含:a)重组表达载体,所述重组表达载体包含编码本公开的多聚体多肽的核苷酸序列;和b)药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,合适的制剂包含:a)第一重组表达载体,所述第一重组表达载体包含编码本公开的多聚体多肽的第一多肽的核苷酸序列;b)第二重组表达载体,所述第二重组表达载体包含编码本公开的多聚体多肽的第二多肽的核苷酸序列;以及c)药学上可接受的赋形剂。

[0317] 在上文描述了合适的药学上可接受的赋形剂。

### [0318] 剂量

[0319] 合适的剂量可由主治医师或其他合格的医务人员基于各种临床因素而确定。如在医学领域中众所周知,用于任一个患者的剂量取决于许多因素,包括患者的大小、体表面积、年龄、待施用的具体多肽或核酸、患者的性别、施用时间和途径、一般健康状况以及目前正在施用的其他药物。本公开的多聚体多肽可以每个剂量介于1ng/kg体重与20mg/kg体重之间,例如介于0.1mg/kg体重至10mg/kg体重之间,例如介于0.5mg/kg体重至5mg/kg体重之间的量施用;然而,设想低于或高于此示例性范围的剂量,特别是考虑到上述因素。如果方案是连续输注,那么其也可在每分钟每千克体重1 $\mu$ g至10mg的范围内。本公开的多聚体多肽可以约1mg/kg体重至50mg/kg体重,例如约1mg/kg体重至约5mg/kg体重、约5mg/kg体重至约10mg/kg体重、约10mg/kg体重至约15mg/kg体重、约15mg/kg体重至约20mg/kg体重、约20mg/kg体重至约25mg/kg体重、约25mg/kg体重至约30mg/kg体重、约30mg/kg体重至约35mg/kg体重、约35mg/kg体重至约40mg/kg体重或约40mg/kg体重至约50mg/kg体重的量施用。

[0320] 在一些情况下,本公开的多聚体多肽的合适剂量是0.01 $\mu$ g至100g/kg体重、0.1 $\mu$ g至10g/kg体重、1 $\mu$ g至1g/kg体重、10 $\mu$ g至100mg/kg体重、100 $\mu$ g至10mg/kg体重或100 $\mu$ g至1mg/kg体重。本领域的普通技术人员可基于所测量的施用的药剂在体液或组织中的滞留时间和浓度容易地估算出给药的重复率。在成功治疗后,可能希望使患者进行维持疗法以预防疾病状态的复发,其中本公开的多聚体多肽以维持剂量施用,所述维持剂量在0.01 $\mu$ g至100g/kg体重、0.1 $\mu$ g至10g/kg体重、1 $\mu$ g至1g/kg体重、10 $\mu$ g至100mg/kg体重、100 $\mu$ g至10mg/kg体重或100 $\mu$ g至1mg/kg体重的范围内。

[0321] 技术人员将易于了解剂量水平可随特定多聚体多肽、症状的严重程度和受试者对副作用的敏感性而变。给定化合物的优选剂量可由本领域的技术人员通过多种方式容易地确定。

[0322] 在一些实施方案中,施用多剂量的本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体的施用频率可根据多种因素(例如症状的严重程度等)中的任一种而变化。例如,在一些实施方案中,每月一次、每月两次、每月三次、每隔一周(qow)、每周一次(qw)、每周两次(biw)、每周三次

(tiw)、每周四次、每周五次、每周六次、每隔一天(qod)、每天(qd)、每天两次(qid)或每天三次(tid)施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。

[0323] 本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体的施用持续时间,例如,施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体的时间段可根据多种因素(例如患者反应等)中的任一种而变化。例如,可在约一天至约一周、约两周至约四周、约一个月至约两个月、约两个月至约四个月、约四个月至约六个月、约六个月至约八个月、约八个月至约1年、约1年至约2年或约2年至约4年或更长范围内的时间段内施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。

#### [0324] 施用途径

[0325] 使用适合于药物递送的任何可用的方法和途径(包括体内和离体方法以及全身和局部施用途径)来将活性剂(本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体)施用至个体。

[0326] 常规和药理学上可接受的施用途径包括肿瘤内、肿瘤周围、肌内、气管内、颅内、皮下、皮内、局部施加、静脉内、动脉内、直肠、鼻、口服和其他肠内和肠胃外施用途径。如果需要,可将施用途径组合,或根据多聚体多肽和/或所需作用进行调整。可以单剂量或多剂量施用本公开的多聚体多肽或本公开的核酸或重组表达载体。

[0327] 在一些实施方案中,静脉内施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。在一些实施方案中,肌内施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。在一些实施方案中,局部施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。在一些实施方案中,肿瘤内施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。在一些实施方案中,肿瘤周围施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。在一些实施方案中,颅内施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。在一些实施方案中,皮下施用本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体。

[0328] 在一些实施方案中,静脉内施用本公开的多聚体多肽。在一些实施方案中,肌内施用本公开的多聚体多肽。在一些实施方案中,局部施用本公开的多聚体多肽。在一些实施方案中,肿瘤内施用本公开的多聚体多肽。在一些实施方案中,肿瘤周围施用本公开的多聚体多肽。在一些实施方案中,颅内施用本公开的多聚体多肽。在一些实施方案中,皮下施用多聚体多肽。

[0329] 可使用任何可用的常规方法和适于递送常规药物的途径(包括全身或局部途径)将本公开的多聚体多肽,本公开的核酸或本公开的重组表达载体施用至宿主。一般来讲,考虑用于本公开的方法的施用途径包括但不必限于肠内、肠胃外和吸入途径。

[0330] 除了吸入施用以外的肠胃外施用途径包括但不必限于局部、透皮、皮下、肌内、眶内、囊内、脊柱内、胸骨内、肿瘤内、肿瘤周围和静脉内途径,即除了通过消化道以外的任何施用途径。可进行肠胃外施用以实现本公开的多聚体多肽、本公开的核酸或本公开的重组表达载体的全身或局部递送。当希望全身性递送时,施用通常涉及药物制剂的侵入性或全身性吸收的局部或粘膜施用。

#### [0331] 适于治疗的受试者

[0332] 适于用本公开的方法治疗的受试者包括患有癌症的个体,包括已被诊断为患有癌

症的个体、已针对癌症治疗但未能对所述治疗有反应的个体以及已针对癌症治疗并且最初有反应、但随后对所述治疗变得难治的个体。适于用本公开的方法治疗的受试者包括具有感染的个体(例如,病原体感染,如细菌、病毒、原生动物等),包括已被诊断为具有感染的个体和已针对感染治疗但未能对所述治疗有反应的个体。适于用本公开的方法治疗的受试者包括具有细菌感染的个体,包括已被诊断为具有细菌感染的个体,以及已针对细菌感染治疗但未能对所述治疗有反应的个体。适于用本公开的方法治疗的受试者包括具有病毒感染的个体,包括已被诊断为具有病毒感染的个体,以及已针对病毒感染治疗但未能对所述治疗有反应的个体。适于用本公开的方法治疗的受试者包括患有自身免疫疾病的个体,包括已被诊断患有自身免疫疾病的个体,以及已针对自身免疫疾病治疗但未能对所述治疗有反应的个体。

[0333] 在一些情况下,例如,当表位是HPV表位时,适合用本公开的方法治疗的受试者是已被诊断为患有HPV相关癌症或HPV可归因癌症的个体。HPV相关和HPV可归因癌症包括例如头颈癌;宫颈癌;和生殖癌症。

[0334] 本公开的非限制性方面的实例

[0335] 上述主题的方面(包括实施方案)可单独或与一个或多个其他方面或实施方案组合有益。在不限制前述描述的情况下,下文提供了编号1-132的本公开的某些非限制性方面。对于本领域技术人员在阅读本公开内容时将显而易见的是,每个单独编号的方面可与任一前面或后面单独编号的方面一起使用或组合。这意图为方面的所有此类组合提供支持,并且不限于下文明确提供的方面的组合:

[0336] 方面1.一种变体IL-2多肽,其包含与SEQ ID NO:1中列出的具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列,其中所述变体IL-2多肽具有相对于SEQ ID NO:1列出的一个或多个氨基酸取代,并且其中所述变体IL-2多肽对包含具有图3A-3C中示出的氨基酸序列的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 多肽的IL-2受体(IL-2R)表现出的结合亲和力与SEQ ID NO:1之一中列出的IL-2氨基酸序列对所述IL-2R的结合亲和力相比降低。

[0337] 方面2.方面1所述的变体IL-2多肽,其中所述变体包含E15、H16、D20、F42、Y45和Q126中的一个或多个的取代。

[0338] 方面3.方面1或方面2所述的变体IL-2多肽,其中所述变体免疫调节多肽对所述IL2R表现出的结合亲和力低于SEQ ID NO:1中列出的所述IL-2氨基酸序列对所述IL-2R表现出的结合亲和力的10%至50%。

[0339] 方面4.方面1-3中任一项所述的变体IL-2多肽,其中所述变体包含用Ala、Gly、Val、Ile或Leu进行的F42的取代。

[0340] 方面5.方面1-3中任一项所述的变体IL-2多肽,其中所述变体包含F42和D20的取代或F42和H16的取代。

[0341] 方面6.方面1-3中任一项所述的变体IL-2多肽,其中所述变体包含F42、D20和Y45的取代;或者其中所述变体包含F42、H16和Q126的取代。

[0342] 方面7.一种多聚体多肽,其包含:

[0343] a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:

[0344] i) 表位;

[0345] ii) 第一主要组织相容性复合物(MHC)多肽;以及



- [0346] b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:
- [0347] i) 第二MHC多肽;以及
- [0348] ii) 任选的免疫球蛋白(Ig)Fc多肽或非Ig支架,
- [0349] 其中所述多聚体多肽包含一个或多个免疫调节结构域,其中所述一个或多个免疫调节结构域是:
- [0350] A) 在所述第一多肽的所述C-末端;
- [0351] B) 在所述第二多肽的所述N-末端;
- [0352] C) 在所述第二多肽的所述C-末端;或
- [0353] D) 在所述第一多肽的所述C-末端且在所述第二多肽的所述N-末端,并且
- [0354] 其中所述免疫调节结构域中的至少一个是天然存在的共刺激蛋白的变体,并且其中所述变体对其对应物共刺激蛋白表现出的亲和力与所述天然存在的共刺激蛋白对所述对应物共刺激蛋白的亲和力相比降低。
- [0355] 方面8. 一种多聚体多肽,其包含:
- [0356] a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:
- [0357] i) 表位;
- [0358] ii) 第一主要组织相容性复合物(MHC)多肽;以及
- [0359] b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:
- [0360] i) 第二MHC多肽;以及
- [0361] ii) 任选的免疫球蛋白(Ig)Fc多肽或非Ig支架,
- [0362] 其中所述多聚体多肽包含一个或多个免疫调节结构域,其中所述一个或多个免疫调节结构域是:
- [0363] A) 在所述第一多肽的所述C-末端;
- [0364] B) 在所述第二多肽的所述N-末端;
- [0365] C) 在所述第二多肽的所述C-末端;或
- [0366] D) 在所述第一多肽的所述C-末端且在所述第二多肽的所述N-末端,
- [0367] 其中所述一个或多个免疫调节结构域中的至少一个是方面1-6中任一项所述的变体IL-2多肽;并且
- [0368] 其中所述多聚体多肽对包含具有图3A-3C中示出的氨基酸序列的 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 多肽的IL-2受体(IL-2R)表现出的结合亲和力与包含SEQ ID NO:1中列出的所述IL-2氨基酸序列的对照多聚体多肽对所述IL-2R多肽的结合亲和力相比降低。
- [0369] 方面9. 方面8所述的多聚体多肽,其中:
- [0370] a) 所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:
- [0371] i) 所述表位;
- [0372] ii) 所述第一MHC多肽;以及
- [0373] iii) 所述变体IL-2多肽;并且
- [0374] b) 所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:
- [0375] i) 所述第二MHC多肽;以及
- [0376] ii) 所述Ig Fc多肽。
- [0377] 方面10. 方面8所述的多聚体多肽,其中:

- [0378] a) 所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含：
- [0379] i) 所述表位；以及
- [0380] ii) 所述第一MHC多肽；并且
- [0381] b) 所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含：
- [0382] i) 所述变体IL-2多肽；
- [0383] ii) 所述第二MHC多肽；以及
- [0384] iii) 所述Ig Fc多肽。
- [0385] 方面11. 方面8所述的多聚体多肽，其中：
- [0386] a) 所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含：
- [0387] i) 所述表位；以及
- [0388] ii) 所述第一MHC多肽；并且
- [0389] b) 所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含：
- [0390] i) 所述第二MHC多肽；以及
- [0391] ii) 所述变体IL-2多肽。
- [0392] 方面12. 方面8所述的多聚体多肽，其中：
- [0393] a) 所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含：
- [0394] i) 所述表位；以及
- [0395] ii) 所述第一MHC多肽；并且
- [0396] b) 第二多肽从N-末端至C-末端依次包含：
- [0397] i) 所述变体IL-2多肽；以及
- [0398] ii) 所述第二MHC多肽。
- [0399] 方面13. 方面8所述的多聚体多肽，其中：
- [0400] a) 所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含：
- [0401] i) 所述表位；
- [0402] ii) 所述第一MHC多肽；以及
- [0403] iii) 所述变体IL-2多肽；并且
- [0404] b) 所述第二多肽包含所述第二MHC多肽。
- [0405] 方面14. 方面7或8所述的多聚体多肽，其中所述非Ig支架是XTEN多肽、转铁蛋白多肽、弹性蛋白样多肽、丝状多肽或丝-弹性蛋白样多肽。
- [0406] 方面15. 方面7-14中任一项所述的多聚体多肽，其中所述第一MHC多肽是 $\beta$ 2-微球蛋白多肽；并且其中所述第二MHC多肽是MHC I类重链多肽。
- [0407] 方面16. 方面15所述的多聚体多肽，其中所述 $\beta$ 2-微球蛋白多肽包含与图6中列出的氨基酸序列之一具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。
- [0408] 方面17. 方面15所述的多聚体多肽，其中所述MHC I类重链多肽是HLA-A、HLA-B或HLA-C重链。
- [0409] 方面18. 方面15所述的多聚体多肽，其中所述MHC I类重链多肽包含与图5A-5C之一中列出的氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。
- [0410] 方面19. 方面7-14中任一项所述的多聚体多肽，其中所述第一MHC多肽是MHC II类 $\alpha$ 链多肽；并且其中所述第二MHC多肽是MHC II类 $\beta$ 链多肽。

- [0411] 方面20.方面7-19中任一项所述的多聚体多肽,其中所述表位是T细胞表位。
- [0412] 方面21.方面7-13和15-20中任一项所述的多聚体多肽,其中所述多聚体多肽包含Fc多肽,并且其中所述Ig Fc多肽是IgG1 Fc多肽、IgG2 Fc多肽、IgG3 Fc多肽、IgG4 Fc多肽、IgA Fc多肽或IgM Fc多肽。
- [0413] 方面22.方面21所述的多聚体多肽,其中所述Ig Fc多肽包含与图4A-4C中示出的氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。
- [0414] 方面23.方面7-22中任一项所述的多聚体多肽,其中所述第一多肽和所述第二多肽是非共价缔合的。
- [0415] 方面24.方面7-22中任一项所述的多聚体多肽,其中所述第一多肽和所述第二多肽彼此共价连接。
- [0416] 方面25.方面24所述的多聚体多肽,其中共价键联是经由二硫键。
- [0417] 方面26.方面25所述的多聚体多肽,其中所述第一MHC多肽或所述表位与所述第一MHC多肽之间的接头包含氨基酸取代以提供第一Cys残基,并且所述第二MHC多肽包含氨基酸取代以提供第二Cys残基,并且其中所述二硫键联位于所述第一Cys残基与所述第二Cys残基之间。
- [0418] 方面27.方面7-26中任一项所述的多聚体多肽,其包含插入在所述表位与所述第一MHC多肽之间的接头。
- [0419] 方面28.方面7-26中任一项所述的多聚体多肽,其包含插入在所述MHC多肽与所述免疫调节多肽之间的接头。
- [0420] 方面29.方面7-28中任一项所述的多聚体多肽,其包含2种变体IL-2多肽。
- [0421] 方面30.方面8-28中任一项所述的多聚体多肽,其包含3种变体IL-2多肽。
- [0422] 方面31.方面29或方面30所述的多聚体多肽,其中所述2种或3种变体IL-2多肽处于串联,并且其中所述多聚体多肽包含所述变体IL-2多肽之间的接头。
- [0423] 方面32.方面8-31中任一项所述的多聚体多肽,其中所述变体IL-2包含E15、H16、D20、F42、Y45和Q126中的一个或多个的取代。
- [0424] 方面33.方面8-32中任一项所述的多聚体多肽,其中所述变体IL-2包含用Ala、Gly、Val、Ile或Leu进行的F42的取代。
- [0425] 方面34.方面33所述的多聚体多肽,其中所述变体IL-2包含F42和D20的取代或F42和H16的取代。
- [0426] 方面35.方面33所述的多聚体多肽,其中所述变体IL-2包含F42、D20和Y45的取代;或者其中所述变体IL-2包含F42、H16和Q126的取代。
- [0427] 方面36.一种核酸,其包含编码重组多肽的核苷酸序列,
- [0428] i) 其中所述重组多肽从N-末端至C-末端依次包含:
- [0429] a) 表位;
- [0430] b) 第一主要组织相容性复合物(MHC)多肽;
- [0431] c) 免疫调节多肽;
- [0432] d) 可蛋白水解切割的接头或核糖体跳过信号;
- [0433] e) 第二MHC多肽;以及
- [0434] f) 免疫球蛋白(Ig)Fc多肽;

[0435] 其中所述免疫调节多肽是天然存在的共刺激蛋白的变体,并且其中所述变体对其对应物共刺激蛋白表现出的亲和力与所述天然存在的共刺激蛋白对所述对应物共刺激蛋白的亲和力相比降低;或

[0436] ii) 其中所述重组多肽从N-末端至C-末端依次包含:

[0437] a) 表位;

[0438] b) 第一MHC多肽;

[0439] c) 可蛋白水解切割的接头或核糖体跳过信号;

[0440] d) 免疫调节多肽

[0441] e) 第二MHC多肽;以及

[0442] f) Ig Fc多肽,

[0443] 其中所述免疫调节多肽是天然存在的共刺激蛋白的变体,并且其中所述变体对其对应物共刺激蛋白表现出的亲和力与所述天然存在的共刺激蛋白对所述对应物共刺激蛋白的亲和力相比降低。

[0444] 方面37. 一种核酸,其包含编码重组多肽的核苷酸序列,

[0445] i) 其中所述重组多肽从N-末端至C-末端依次包含:

[0446] a) 表位;

[0447] b) 第一主要组织相容性复合物(MHC)多肽;

[0448] c) 免疫调节多肽;

[0449] d) 可蛋白水解切割的接头或核糖体跳过信号;

[0450] e) 第二MHC多肽;以及

[0451] f) 免疫球蛋白(Ig)Fc多肽;

[0452] 其中所述免疫调节多肽是方面1-6中任一项所述的变体免疫调节多肽;或

[0453] ii) 其中所述重组多肽从N-末端至C-末端依次包含:

[0454] a) 表位;

[0455] b) 第一MHC多肽;

[0456] c) 可蛋白水解切割的接头或核糖体跳过信号;

[0457] d) 免疫调节多肽

[0458] e) 第二MHC多肽;以及

[0459] f) Ig Fc多肽,

[0460] 其中所述免疫调节多肽是方面1-6中任一项所述的变体免疫调节多肽。

[0461] 方面38. 方面36或37所述的核酸,其中所述第一MHC多肽是 $\beta$ 2-微球蛋白多肽;并且其中所述第二MHC多肽是MHC I类重链多肽。

[0462] 方面39. 方面38所述的核酸,其中所述 $\beta$ 2-微球蛋白多肽包含与图6中列出的氨基酸序列之一具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0463] 方面40. 方面38所述的核酸,其中所述MHC I类重链多肽是HLA-A、HLA-B或HLA-C重链。

[0464] 方面41. 方面40所述的核酸,其中所述MHC I类重链多肽包含与图5A-5C中的任一个中列出的氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0465] 方面42. 方面36或37所述的核酸,其中所述第一MHC多肽是MHC II类 $\alpha$ 链多肽;并且

其中所述第二MHC多肽是MHC II类 $\beta$ 链多肽。

[0466] 方面43.方面36-42中任一项所述的核酸,其中所述表位是T细胞表位。

[0467] 方面44.方面36-43中任一项所述的核酸,其中所述Ig Fc多肽是IgG1 Fc多肽、IgG2 Fc多肽、IgG3 Fc多肽、IgG4 Fc多肽、IgA Fc多肽或IgM Fc多肽。

[0468] 方面45.方面44所述的核酸,其中所述Ig Fc多肽包含与图4A-4C中示出的氨基酸序列具有至少85%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0469] 方面46.方面37-45中任一项所述的核酸,其中所述变体IL-2免疫调节多肽包含E15、H16、D20、F42、Y45和Q126中的一个或多个的取代。

[0470] 方面47.方面36-46中任一项所述的核酸,其中所述多聚体多肽包含选自CD7、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素 $\beta$ 受体、3/TR6、ILT3、ILT4以及HVEM的第二免疫调节多肽。

[0471] 方面48.方面36-47中任一项所述的核酸,其中所述可蛋白水解切割的接头或核糖体跳过信号包含选自以下的氨基酸序列:

[0472] a) LEVLFQGP (SEQ ID NO:29);

[0473] b) ENLYTQS (SEQ ID NO:30);

[0474] c) 弗林蛋白酶切割位点;

[0475] d) LVPR (SEQ ID NO:32);

[0476] e) GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:33);

[0477] f) GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP (SEQ ID NO:34);

[0478] g) GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:35);以及

[0479] h) GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:36)。

[0480] 方面49.方面36-48所述的核酸,其中所述重组多肽从N-末端至C-末端依次包含:

[0481] a) 第一前导肽;

[0482] b) 所述表位;

[0483] c) 所述第一MHC多肽;

[0484] d) 所述免疫调节多肽;

[0485] e) 所述可蛋白水解切割的接头或核糖体跳过信号;

[0486] f) 第二前导肽;

[0487] g) 所述第二MHC多肽;以及

[0488] h) 所述免疫球蛋白(Ig)Fc多肽。

[0489] 方面50.方面49所述的核酸,其中所述第一前导肽和所述第二前导肽是 $\beta$ 2-M前导肽。

[0490] 方面51.方面36-50中任一项所述的核酸,其中所述核苷酸序列与转录控制元件可操作地连接。

[0491] 方面52.方面51所述的核酸,其中所述转录控制元件是在真核细胞中起作用的启动子。

[0492] 方面53.方面36-52中任一项所述的核酸,其中所述第一MHC多肽或所述表位与所述第一MHC多肽之间的接头包含氨基酸取代以提供第一Cys残基,并且所述第二MHC多肽包含氨基酸取代以提供第二Cys残基,并且其中所述第一Cys残基和所述第二Cys残基提供在

所述第一MHC多肽与所述第二MHC多肽之间的二硫键联。

[0493] 方面54.一种重组表达载体,其包含方面36-52中任一项所述的核酸,并且其中所述载体任选地是病毒载体或非病毒载体。

[0494] 方面55.一种用方面54所述的重组表达载体进行遗传修饰的宿主细胞。

[0495] 方面56.方面55所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是在体外,并且其中任选地对所述宿主细胞进行遗传修饰以使得所述细胞不产生内源性MHC  $\beta$ 2-微球蛋白多肽。

[0496] 方面57.一种组合物,其包含:

[0497] a) 第一核酸,所述第一核酸包含编码第一多肽的核苷酸序列,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:

[0498] i) 表位;

[0499] i) 第一MHC多肽;以及

[0500] iii) 免疫调节结构域,

[0501] 其中所述免疫调节多肽是天然存在的共刺激蛋白的变体,并且其中所述变体对其对应物共刺激蛋白表现出的亲和力与所述天然存在的共刺激蛋白对所述对应物共刺激蛋白的亲和力相比降低;以及

[0502] b) 第一核酸,所述第一核酸包含编码第二多肽的核苷酸序列,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:

[0503] i) 第二MHC多肽;以及

[0504] ii) Ig Fc多肽。

[0505] 方面58.一种组合物,其包含:

[0506] a) 第一核酸,所述第一核酸包含编码第一多肽的核苷酸序列,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:

[0507] i) 表位;以及

[0508] ii) 第一MHC多肽;以及

[0509] b) 第一核酸,所述第一核酸包含编码第二多肽的核苷酸序列,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:

[0510] i) 免疫调节结构域,其中所述免疫调节结构域是天然存在的共刺激蛋白的变体,并且其中所述变体对其对应物共刺激蛋白表现出的亲和力与所述天然存在的共刺激蛋白对所述对应物共刺激蛋白的亲和力相比降低;

[0511] ii) 第二MHC多肽;以及

[0512] iii) Ig Fc多肽。

[0513] 方面59.一种组合物,其包含:

[0514] a) 第一核酸,所述第一核酸包含编码第一多肽的核苷酸序列,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:

[0515] i) 表位;

[0516] i) 第一MHC多肽;以及

[0517] iii) 免疫调节结构域,

[0518] 其中所述免疫调节结构域是方面1-6中任一项所述的变体IL-2多肽;以及

[0519] b) 第一核酸,所述第一核酸包含编码第二多肽的核苷酸序列,所述第二多肽从N-

末端至C-末端依次包含：

[0520] i) 第二MHC多肽；以及

[0521] ii) Ig Fc多肽。

[0522] 方面60. 一种组合物，其包含：

[0523] a) 第一核酸，所述第一核酸包含编码第一多肽的核苷酸序列，所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含：

[0524] i) 表位；以及

[0525] ii) 第一MHC多肽；以及

[0526] b) 第一核酸，所述第一核酸包含编码第二多肽的核苷酸序列，所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含：

[0527] i) 免疫调节结构域，其中所述免疫调节结构域是方面1-6中任一项所述的变体IL-2多肽；

[0528] ii) 第二MHC多肽；以及

[0529] iii) Ig Fc多肽。

[0530] 方面61. 方面57-60中任一项所述的组合物，其中所述第一核酸和/或所述第二核酸存在于重组表达载体中。

[0531] 方面62. 一种宿主细胞，其用方面57-61中任一项所述的组合物进行遗传修饰。

[0532] 方面63. 一种产生方面7-36中任一项所述的多聚体多肽的方法，所述方法包括：

[0533] a) 在体外在培养基中在使得方面55、56和62中任一项所述的宿主细胞合成所述多聚体多肽的条件下培养所述宿主细胞；以及

[0534] b) 从所述宿主细胞和/或从所述培养基中分离所述多聚体多肽。

[0535] 方面64. 方面63所述的方法，其中所述第二多肽包含亲和和标签，并且其中所述分离包括使由所述细胞产生的所述多聚体多肽与所述亲和和标签的结合配偶体接触，其中所述结合配偶体被固定，从而固定所述多聚体多肽。

[0536] 方面65. 方面64所述的方法，其包括洗脱所述固定的多聚体多肽。

[0537] 方面66. 一种选择性地活化表位特异性T细胞的方法，所述方法包括使所述T细胞与方面7-35中任一项所述的多聚体多肽接触，其中所述接触选择性地活化所述表位特异性T细胞。

[0538] 方面67. 方面66所述的方法，其中所述接触是在体外。

[0539] 方面68. 方面66所述的方法，其中所述接触是在体内。

[0540] 方面69. 方面66所述的方法，其中所述表位是癌症相关表位，并且其中所述施用选择性地增加对所述癌症相关表位有特异性的T细胞的活性。

[0541] 方面70. 一种治疗个体的癌症的方法，所述方法包括向所述个体施用有效量的：

[0542] a) 方面7-35中任一项所述的多聚体多肽；或

[0543] b) 一种或多种重组表达载体，所述一种或多种重组表达载体包含编码方面7-35中任一项所述的多聚体多肽的核苷酸序列；或

[0544] c) 一种或多种mRNA，所述一种或多种mRNA包含编码方面7-35中任一项所述的多聚体多肽的核苷酸序列，

[0545] 其中所述表位是癌症相关表位，并且其中所述施用有效选择性地活化个体中的癌

症表位特异性T细胞。

[0546] 方面71.方面70所述的方法,其中所述施用是皮下施用。

[0547] 方面72.方面70所述的方法,其中所述施用是静脉内施用。

[0548] 方面73.方面70所述的方法,其中所述施用是肿瘤周围施用。

[0549] 方面74.方面70所述的方法,其中所述施用是全身施用。

[0550] 方面75.方面70所述的方法,其中所述施用是在治疗部位的远端施用。

[0551] 方面76.方面70所述的方法,其中所述施用是局部施用。

[0552] 方面77.方面70所述的方法,其中所述施用是在治疗部位处或附近施用。

[0553] 方面78.一种组合物,其包含:

[0554] a) 方面7-35中任一项所述的多聚体多肽;以及

[0555] b) 药学上可接受的赋形剂。

[0556] 方面79.一种组合物,其包含:

[0557] a) 方面36-53中任一项所述的核酸或方面54所述的重组表达载体;以及

[0558] b) 药学上可接受的赋形剂。

[0559] 方面80.一种多聚体多肽,其包含:

[0560] a) 第一多肽,所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含:

[0561] i) 表位;

[0562] ii) 包含图34A中示出的氨基酸序列的 $\beta$ 2-微球蛋白( $\beta$ 2M)多肽;以及

[0563] b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:

[0564] i) 天然存在的共刺激蛋白的变体,并且其中所述变体对其对应物共刺激蛋白表现出的亲和力与所述天然存在的共刺激蛋白对所述对应物共刺激蛋白的亲和力相比降低,所述变体任选地可以是方面1-6中任一项所述的变体IL-2多肽;

[0565] ii) 包含图34C中示出的氨基酸序列的主要组织相容性复合物(MHC)重链多肽;以及

[0566] iii) IgG1 Fc多肽,所述IgG1 Fc多肽包含选自N297A、L234A、L235A、L234F、L235E和P331S(基于图33A中示出的氨基酸编号分别N77A、L14A、L15A、L14F、L15E和P111S)。

[0567] 方面81.方面80所述的多聚体多肽,其中所述IgG1 Fc多肽包含N297A取代(基于图33A中示出的氨基酸编号N77A)。

[0568] 方面82.方面80所述的多聚体多肽,其中所述IgG1 Fc多肽包含L234A取代和L235A取代(基于图33A中示出的氨基酸编号L14A和L15A)。

[0569] 方面83.方面80所述的多聚体多肽,其中所述IgG1 Fc多肽包含L234F取代和L235E取代(基于图33A中示出的氨基酸编号L14F和L15E)。

[0570] 方面84.方面80所述的多聚体多肽,其中所述IgG1 Fc多肽包含L234F取代、L235E取代和P331S(基于图33A中示出的氨基酸编号L14F、L15E和P111S取代)。

[0571] 方面85.方面80-84中任一项所述的多聚体多肽,其中所述第二多肽包含所述变体IL-2多肽的两个拷贝。

[0572] 方面86.方面80-85中任一项所述的多聚体多肽,其中所述第一多肽包含在所述表位与所述 $\beta$ 2M多肽之间的肽接头。

[0573] 方面87.方面80-86中任一项所述的多聚体多肽,其中所述第二多肽包含介于以下



中的一者或多者之间的肽接头：

[0574] a) 所述变体IL-2多肽的第一拷贝与所述变体IL-2多肽的第二拷贝；

[0575] b) 所述变体IL-2多肽与所述MHC重链多肽；以及

[0576] c) 所述MHC重链多肽与所述IgG1 Fc多肽之间。

[0577] 方面88. 方面86或方面87所述的多聚体多肽，其中所述肽接头选自 (GGGGS)<sub>3</sub>、(GGGGS)<sub>4</sub>和AAAGG。

[0578] 方面89. 一种多聚体多肽，其包含：

[0579] a) 第一多肽，所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含：

[0580] i) 表位；

[0581] ii) 包含图34A中示出的氨基酸序列的β2-微球蛋白多肽；以及

[0582] b) 第二多肽，所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含：

[0583] i) 包含图34B中示出的氨基酸序列的变体IL-2多肽；

[0584] ii) 包含图34C中示出的氨基酸序列的主要组织相容性复合物 (MHC) 重链多肽；以及

[0585] iii) IgG1 Fc多肽，所述IgG1 Fc多肽包含选自N297A、L234A、L235A、L234F、L235E和P331S(基于图33A中示出的氨基酸编号分别N77A、L14A、L15A、L14F、L15E和P111S)。

[0586] 方面90. 方面89所述的多聚体多肽，其中所述IgG1 Fc多肽包含N297A取代(基于图33A中示出的氨基酸编号N77A)。

[0587] 方面91. 方面89所述的多聚体多肽，其中所述IgG1 Fc多肽包含L234A取代和L235A取代(基于图33A中示出的氨基酸编号L14A和L15A)。

[0588] 方面92. 方面89所述的多聚体多肽，其中所述IgG1 Fc多肽包含L234F取代和L235E取代(基于图33A中示出的氨基酸编号L14F和L15E)。

[0589] 方面93. 方面89所述的多聚体多肽，其中所述IgG1 Fc多肽包含L234F取代、L235E取代和P331S取代(基于图33A中示出的氨基酸编号L14F、L15E和P111S)。

[0590] 方面94. 方面89-93中任一项所述的多聚体多肽，其中所述第二多肽包含所述变体IL-2多肽的两个拷贝。

[0591] 方面95. 方面89-94中任一项所述的多聚体多肽，其中所述第一多肽包含在所述表位与所述β2M多肽之间的肽接头。

[0592] 方面96. 方面89-95中任一项所述的多聚体多肽，其中所述第二多肽包含介于以下中的一者或多者之间的肽接头：

[0593] a) 所述变体IL-2多肽的第一拷贝与所述变体IL-2多肽的第二拷贝；

[0594] b) 所述变体IL-2多肽与所述MHC重链多肽；以及

[0595] c) 所述MHC重链多肽与所述IgG1 Fc多肽。

[0596] 方面97. 方面95或方面96所述的多聚体多肽，其中所述肽接头选自 (GGGGS)<sub>3</sub>、(GGGGS)<sub>4</sub>和AAAGG。

[0597] 方面98. 一种多聚体多肽，其包含：

[0598] a) 第一多肽，所述第一多肽从N-末端至C-末端依次包含：

[0599] i) 表位，所述表位包含氨基酸序列YMLDLQPETT (SEQ ID NO:13)；

[0600] ii) 包含图34A中示出的氨基酸序列的β2-微球蛋白多肽；以及

- [0601] b) 第二多肽,所述第二多肽从N-末端至C-末端依次包含:
- [0602] i) 包含图34B中示出的氨基酸序列的变体IL-2多肽;
- [0603] ii) 包含图34C中示出的氨基酸序列的主要组织相容性复合物(MHC)重链多肽;以及
- [0604] iii) 包含图33A、33B、33C或33D中示出的氨基酸序列的IgG1Fc多肽。
- [0605] 方面99.方面98所述的多聚体多肽,其中所述IgG1 Fc多肽包含图33B中示出的氨基酸序列。
- [0606] 方面100.方面98所述的多聚体多肽,其中所述IgG1 Fc多肽包含图33C中示出的氨基酸序列。
- [0607] 方面101.方面98所述的多聚体多肽,其中所述IgG1 Fc多肽包含图33D中示出的氨基酸序列。
- [0608] 方面102.方面98-101中任一项所述的多聚体多肽,其中所述第二多肽包含所述变体IL-2多肽的两个拷贝。
- [0609] 方面103.方面98-102中任一项所述的多聚体多肽,其中所述第一多肽包含在所述表位与所述 $\beta$ 2M多肽之间的肽接头。
- [0610] 方面104.方面98-103中任一项所述的多聚体多肽,其中所述第二多肽包含介于以下中的一者或多者之间的肽接头:
- [0611] a) 所述变体IL-2多肽的第一拷贝与所述变体IL-2多肽的第二拷贝;
- [0612] b) 所述变体IL-2多肽与所述MHC重链多肽;以及
- [0613] c) 所述MHC重链多肽与所述IgG1 Fc多肽。
- [0614] 方面105.方面103或方面104所述的多聚体多肽,其中所述肽接头选自 $(GGGGS)_3$ 、 $(GGGGS)_4$ 和AAAGG。
- [0615] 方面106.一种多聚体多肽,其包含:
- [0616] a) 第一多肽,所述第一多肽包含图31中示出的氨基酸序列;
- [0617] b) 第二多肽,所述第二多肽包含图22中示出的氨基酸序列。
- [0618] 方面107.一种多聚体多肽,其包含:
- [0619] a) 第一多肽,所述第一多肽包含图31中示出的氨基酸序列;
- [0620] b) 第二多肽,所述第二多肽包含图25中示出的氨基酸序列。
- [0621] 方面108.一种多聚体多肽,其包含:
- [0622] a) 第一多肽,所述第一多肽包含图31中示出的氨基酸序列;
- [0623] b) 第二多肽,所述第二多肽包含图28中示出的氨基酸序列。
- [0624] 方面109.一种药物组合物,其包含:
- [0625] a) 根据方面80-108中任一项所述的多聚体多肽;以及
- [0626] b) 药学上可接受的赋形剂。
- [0627] 方面110.一种或多种核酸,其包含编码根据方面80-108中任一项所述的多聚体多肽的所述第一多肽和/或所述第二多肽的核苷酸序列。
- [0628] 方面111.方面110所述的一种或多种核酸,其中所述一种或多种核酸存在于重组表达载体中。
- [0629] 方面112.一种选择性地活化表位特异性T细胞的方法,所述方法包括使所述T细胞

与方面80-108中任一项所述的多聚体多肽接触,其中所述接触选择性地活化所述表位特异性T细胞。

[0630] 方面113.方面112所述的方法,其中所述接触是在体外。

[0631] 方面114.方面112所述的方法,其中所述接触是在体内。

[0632] 方面115.一种方法,其包括向个体施用有效量的:

[0633] a) 方面80-108中任一项所述的多聚体多肽;或

[0634] b) 一种或多种重组表达载体,所述一种或多种重组表达载体包含编码方面80-108中任一项所述的多聚体多肽的核苷酸序列;或

[0635] c) 一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA包含编码方面80-108中任一项所述的多聚体多肽的核苷酸序列,其中所述施用诱导对所述个体中的表位的T细胞应答。

[0636] 方面116.方面115所述的方法,其中所述施用是皮下施用。

[0637] 方面117.方面115所述的方法,其中所述施用是静脉内施用。

[0638] 方面118.方面115所述的方法,其中所述施用是全身施用。

[0639] 方面119.方面115所述的方法,其中所述施用是肌肉内施用。

[0640] 方面120.方面115所述的方法,其中所述施用是在治疗部位的远端施用。

[0641] 方面121.方面115所述的方法,其中所述施用是局部施用。

[0642] 方面122.方面115所述的方法,其中所述施用是在治疗部位处或附近施用。

[0643] 方面123.一种将共刺激多肽选择性地递送至靶T细胞的方法,所述方法包括使混合T细胞群体与方面7-35和80-108中任一项所述的多聚体多肽接触,其中所述混合T细胞群体包含所述靶T细胞和非靶T细胞,其中所述靶T细胞对所述多聚体多肽内存在的表位有特异性,并且其中所述接触将所述多聚体多肽内存在的所述共刺激多肽递送至所述靶T细胞。

[0644] 方面124.一种将IL-2或IL-2变体选择性地递送至靶T细胞的方法,所述方法包括使混合T细胞群体与方面8-35和80-108中任一项所述的多聚体多肽接触,其中所述混合T细胞群体包含所述靶T细胞和非靶T细胞,其中所述靶T细胞对所述多聚体多肽内存在的表位有特异性,并且其中所述接触将所述多聚体多肽内存在的所述IL-2或IL-2变体递送至所述靶T细胞。

[0645] 方面125.方面123或124所述的方法,其中所述T细胞群体是在体外。

[0646] 方面126.方面123或124所述的方法,其中所述T细胞群体是在个体体内。

[0647] 方面127.方面126所述的方法,其包括向所述个体施用所述多聚体多肽。

[0648] 方面128.方面123-127中任一项所述的方法,其中所述靶T细胞是调控性T细胞。

[0649] 方面129.方面123-127中任一项所述的方法,其中所述靶T细胞是细胞毒性T细胞。

[0650] 方面130.方面123或124所述的方法,其中所述混合T细胞群体是从个体获得的体外混合T细胞群体,并且其中所述接触导致所述靶T细胞的活化和/或增殖,从而产生活化的和/或增殖的靶T细胞群体。

[0651] 方面131.权利要求130所述的方法,其还包括向所述个体施用所述活化的和/或增殖的靶T细胞群体。

[0652] 方面132.一种在从个体获得的混合T细胞群体中检测结合目标表位的靶T细胞的存在的方法,所述方法包括:a)使所述混合T细胞群体与权利要求7-35和80-108中任一项所述的多聚体多肽在体外接触,其中所述多聚体多肽包含所述目标表位;和b)检测对所述接

触作出反应的T细胞的活化和/或增殖,其中活化的和/或增殖的T细胞指示所述靶T细胞的存在。

#### [0653] 实施例

[0654] 提出以下实施例以便向本领域的普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完全公开和说明,并且不意图限制本发明人看待其发明的范围,也不意图表示以下实验是进行的全部或仅有的实验。虽然已尽力确保所用数字(例如量、温度等)的准确性,但仍应考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是重均分子量,温度以摄氏度计,并且压力在大气压下或接近大气压。可使用标准缩写,例如,bp,碱基对;kb,千碱基;pl,皮升;s或sec,秒;min,分钟;h或hr,小时;aa,氨基酸;kb,千碱基;bp,碱基对;nt,核苷酸;千道尔顿,kDa;i.m.,肌内的(肌内地);i.p.,腹膜内的(腹膜内地);s.c.,皮下的(皮下地)等。

#### [0655] 实施例1:IL-2/synTac的产生

[0656] 分析通过瞬时转染的哺乳动物细胞产生IL-2/synTac。如图7A所示,在瞬时转染细胞后6-7天,两种不同IL-2/synTac的产生水平(以mg/L培养基计)大于90mg/L。

[0657] 纯化通过哺乳动物细胞产生的IL-2/synTac,并进行还原和非还原聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果示出在图7B中。大小以kDa给出。

[0658] 产生IL-2/synTac,其中IL-2多肽处于“轻链”(即,包含MHC I类轻链的多肽;例如 $\beta$ 2M)或“重链”(即,包含MHC I类重链的多肽)中。分析IL-2/synTac的表达水平和稳定性。

[0659] synTac在哺乳动物细胞中产生。如图8A所示,在重链上包含IL-2的IL-2/synTac的产生水平为轻链上包含IL-2的IL-2/synTac的水平约25倍。

[0660] 由哺乳动物细胞产生的IL-2/synTac进行还原和非还原聚丙烯酰胺凝胶电泳;并用考马斯蓝染色凝胶。如图8B所示,在重链上包含IL-2的IL-2/synTac比在轻链上包含IL-2的IL-2/synTac更稳定。大小以kDa给出。

[0661] 评估了包含变体IL-2的IL-2/synTac的表达水平。图9示出IL-2/syn-Tac的表达水平,其中IL-2是野生型(wt)或包含F42A、D20K、Q126A、E15A、Y45A和H16A的各种组合。表达水平被表示为相对于具有野生型IL-2的synTac的表达水平的百分比变化。

[0662] 评价了IL-2/synTac中IL-2的拷贝数对表达水平的影响。IL-2/synTac包含synTac中的一个拷贝(1X)、两个拷贝(2X)或三个拷贝(3X)。在哺乳动物细胞中产生各种IL-2/synTac,并测定表达水平。数据在图10中示出。具有IL-2的一个或两个拷贝的IL-2/synTac表现出相似的表达水平,而具有IL-2的三个拷贝的IL-2/synTac表现出较低的表达水平。表达水平被表示为相对于具有IL-2的单个拷贝的IL-2/synTac的表达水平的倍数变化。

#### [0663] 实施例2:IL-2/synTac的体外活性

[0664] 为了实现通过T细胞受体靶向的最大特异性,共刺激多肽对其配体的亲和力应低于MHC对TCR的亲和力。对TCR的肽/MHC亲和力可为约 $10\mu\text{M}$ 。

[0665] 产生IL-2/synTac,其包含变体IL-2的两个拷贝,所述变体IL-2包含F42A和H16A取代。在抗原特异性 $\text{CD8}^+$ T细胞和非特异性 $\text{CD8}^+$ T细胞上测试由IL-2/synTac诱导的共刺激信号传导。使抗原特异性 $\text{CD8}^+$ T细胞和非特异性 $\text{CD8}^+$ T细胞与各种浓度的IL-2/synTac接触。

[0666] 如图11所示,IL-2/synTac在抗原特异性 $\text{CD8}^+$ T细胞中以比在非特异性 $\text{CD8}^+$ T细胞低得多的浓度诱导共刺激信号传导。

[0667] 测试了IL-2/synTac结合的选择性。从LCMV或OT1小鼠的脾分离CD8<sup>+</sup>T细胞。将CD8<sup>+</sup>T细胞与各种浓度的IL-2/synTac一起孵育,并使其结合20分钟。IL-2/synTac包含IgG2a Fc。使用藻红蛋白(PE)标记的抗-IgG2a抗体检测IL-2/synTac与CD8<sup>+</sup>T细胞的结合。使用流式细胞术检测PE荧光以确定与IL-2/synTac结合的细胞的百分比。

[0668] 如图12所示,IL-2/synTac以抗原特异性方式与LCMV CD8<sup>+</sup>T细胞结合,但不表现出与OT1 CD8<sup>+</sup>T细胞的显著结合。因此,IL-2/synTac选择性地结合至对IL-2/synTac中存在的表位有特异性的CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0669] 确定IL-2/synTac是否选择性地活化靶T细胞。从LCMV或OT1小鼠的脾分离CD8<sup>+</sup>T细胞。使用的IL-2/synTac包含F42A单氨基酸取代,或F42A和H16A取代。用各种浓度的IL-2/synTac刺激CD8<sup>+</sup>T细胞20分钟。然后用PE标记的抗磷酸-STAT5抗体染色细胞。使用流式细胞术检测PE荧光以确定磷酸-STAT5阳性细胞的百分比,其中磷酸-STAT5是活化的标志物。

[0670] 如图13所示,IL-2/synTac在抗原特异性(LCMV) CD8<sup>+</sup>T细胞中以比在非特异性(BL6) CD8<sup>+</sup>T细胞中低得多的浓度诱导CD8<sup>+</sup>刺激(如由teh%磷酸-STAT5阳性细胞所示)。

[0671] 分析了各种IL-2/synTac的特异性活性。包含IL-2的单个拷贝、IL-2的两个拷贝或IL-2的三个拷贝的IL-2/synTac在各种浓度下针对刺激CD8<sup>+</sup>抗原特异性(LCMV)或非特异性(BL6)细胞进行测试,其中所述IL-2包含F42A、D20K、Q126A、E15A、H16A和Y45A取代的各种组合。确定磷酸信号转导和转录活化因子5(pSTAT5)阳性的百分比。数据在图14A-14F中示出。

[0672] 实施例3:IL-2/synTac的体内活性

[0673] 测试了IL-2/synTac的体内活性。在施用磷酸盐缓冲盐水(PBS)、重组IL-2(rIL-2)或本公开的IL-2/synTac后,测试抗原特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的体内倍数变化。数据在图15左图中示出。数据表明IL-2/synTac的效力为rIL-2的10倍。

[0674] 测试了IL-2/synTac的体内特异性。评估在施用PBS、rIL-2或IL-2/synTac后的抗原特异性和非抗原特异性应答。数据表示为在施用PBS、rIL-2或IL-2/synTac后为抗原特异性或抗原非特异性的淋巴结细胞的百分比。如图15右图所示,IL-2/synTac诱导抗原特异性应答(表示为羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)的最大稀释度%,T细胞增殖的指数)。相比之下,由rIL-2诱导的应答不是抗原特异性的。

[0675] 进行剂量反应测定。以4mg/kg、8mg/kg和16mg/kg的浓度腹膜内施用IL-2/synTac(F42A、H16A)。结果在图16A中示出。如图16A所示,以4mg/kg或8mg/kg施用的IL-2/synTac给出相似的结果;以16mg/kg施用的IL-2/synTac诱导最有效的免疫刺激活性。

[0676] 测试了IL-2/synTac的施用途径的作用。IL-2/synTac(F42A、H16A)以4mg/kg皮下(SubQ)或腹膜内(IP)施用。如图16B所示,皮下施用产生比IP施用更有效的免疫刺激活性。

[0677] 测定IL-2拷贝数对功效的影响。将包含IL-2(F42A、H16A)的单个拷贝或IL-2(F42A、H16A)的两个拷贝的IL-2/synTac注射到具有HPV E7表位的肿瘤的小鼠中。包含在IL-2/synTac中的表位是HPV E7表位。如图17A和17B所示,包含IL-2(F42A、H16A)的两个拷贝的IL-2/synTac在减少肿瘤大小方面比仅包含IL-2(F42A、H16A)的单个拷贝的IL-2/synTac更有效。

[0678] 实施例4:IL-2/synTac的PK/PD和稳定性研究

[0679] 进行IL-2/synTac的药代动力学(PK)分析。以10mg/kg IP施用IL-2/synTac(F42A、D20K、H16A)。在施用后的不同时间点,获得血清样品并测量血清样品中IL-2/synTac的水

平。如图18所示,IL-2/synTac的血清半衰期是约4小时。

[0680] 将IL-2/synTac以10mg/kg IP注射到C57BL/6小鼠中,并在注射后两小时收集血清。IL-2/synTac包含His<sub>6</sub>标签。将100ng输入蛋白或40μl当量血清进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),并用抗(His)<sub>6</sub>抗体或抗β-2M抗体探测。图19中示出的结果显示IL-2/synTac在体内保持稳定和完整至少2小时。

[0681] 将IL-2/synTac在4°C或37°C下保持5天。通过尺寸排阻色谱分析0.5mg的每种样品(10mg/ml)。如图20所示,IL-2/synTac在4°C或37°C下稳定且完整至少5天。

[0682] 实施例5:IL-2/synTac介导的人CMV特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的扩增

[0683] 使用IFN-γ酶联免疫斑点(ELISPOT)测定筛选来自人供体的外周血单核细胞(PBMC)对巨细胞病毒(CMV)-肽库的反应性。PBMC通过斑点形成计数(SFC)分类为高、中、低或无CMV前体组。用剂量范围为30nM至2nM的IL-2/synTac(“CUE:IL-2”;包含变体IL-2MOD(包含H16A和F42A取代)的2个拷贝的synTac)刺激来自每个组的PBMC。在第5天,将50%的条件培养基用新鲜培养基替换。在第7天,用一组抗体染色样品并通过流式细胞术分析。靶向CMV肽NLVPMVATV(SEQ ID NO:37)的五聚体染色用于确定抗原特异性CD8<sup>+</sup>细胞的频率。数据在图35中呈现。确定IL-2/synTac的EC<sub>50</sub>在约1nM至约5nM的范围内。图35示出与未处理的对照相比抗原特异性CD8<sup>+</sup>细胞的倍数扩增。X轴上的数值表示每个供体PBMC的SFC计数。误差线表示来自每个数据点的技术重复的平均值±SD值。

[0684] 图35中所示的数据表明IL-2/synTac有效扩增表位特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的数量,其中存在这种表位特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的可测量的(例如通过五聚体染色或通过SFC)前体群体。

[0685] 实施例6:在H16处具有氨基酸取代的IL-2/synTac。

[0686] 产生在H16处具有取代的IL-2/synTac变体。测定表达水平和对IL-2R的亲合力。使用BLI测定IL-2R的亲合力。数据在图36中呈现。

[0687] 实施例7:IL-2/synTac对原代人抗原特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的影响。

[0688] 使变体IL-2/synTac与来自人受试者的原代CD8<sup>+</sup>T细胞接触。变体IL-2/synTac包含:i)HPV16E7(11-20)(YMLDLQPETT;SEQ ID NO:13)作为表位呈递肽;和ii)包含H16A和F42A取代的变体IL-2MOD的2个拷贝)。评估变体IL-2/synTac与对HPV16E7(11-20)具有特异性的CD8<sup>+</sup>T细胞或大量(bulk)CD8<sup>+</sup>T细胞的结合。数据在图37中示出。

[0689] 图37示出如通过流式细胞术检测的本公开的变体IL-2/synTac与原代人HPV16 E7(11-20)特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的结合。结合至对HPV16 E7(11-20)具有特异性的CD8<sup>+</sup>T细胞的EC<sub>50</sub>是2.6nM。因此,变体IL-2/synTac表现出与肿瘤抗原特异性原代人T细胞的高亲和力相互作用。与结合至非靶(大量)CD8<sup>+</sup>T细胞相比,结合对抗原特异性T细胞具有高度选择性。

[0690] 评估了变体IL-2/synTac与原代人HPV16E7(11-20)特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的结合对T细胞受体(TCR)近端标志物SLP76的磷酸化的影响。数据在图38中示出。

[0691] 图38示出变体IL-2/synTac与原代人HPV16 E7(11-20)特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的结合对SLP76的磷酸化的影响。变体IL-2/synTac与原代人HPV16E7(11-20)特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的结合使得SLP76的磷酸化快速增加。作用是有效的(EC<sub>50</sub>=65nM)。所述作用也是选择性的,因为包含CMV肽而不是HPV16 E7(11-20)的对照IL-2/synTac仅产生低水平的SLP76磷酸化。

[0692] 评估T细胞活化和溶细胞活性的关键标志物。将原代人HPV16E7(11-20)特异性T细胞与0nM或100nM变体IL-2/synTac一起孵育2天。变体IL-2/synTac包含:i)HPV16 E7(11-

20) 作为表位呈递肽; 和 ii) 包含H16A和F42A取代的变体IL-2MOD的2个拷贝)。评估了i) CD25 (CD8<sup>+</sup>T细胞活化的标志物); ii) 颗粒酶B (经由颗粒介导的途径的靶细胞死亡的关键介质); 和iii) CD107 $\alpha$  (CD8<sup>+</sup>T细胞上脱粒的标志物)的产生。数据在图39中示出。

[0693] 图39示出变体IL-2/synTac与原代人HPV16 E7 (11-20) 特异性T细胞的结合对CD25、颗粒酶B和CD107 $\alpha$ 的产生的影响。数据表明变体IL-2/synTac与原代人HPV16 E7 (11-20) 特异性T细胞的结合诱导T细胞分化为溶细胞效应细胞, 如通过CD25、颗粒酶B和CD107 $\alpha$ 的表达增加所证明。

[0694] 评估了变体IL-2/synTac与原代人HPV16 E7 (11-20) 特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的结合对IFN- $\gamma$ 的产生的影响。ELISpot测定用于检测IFN- $\gamma$ 产生。数据在图40中示出。

[0695] 图40示出变体IL-2/synTac与原代人HPV16 E7 (11-20) 特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的结合对IFN- $\gamma$ 的产生的影响。数据表明变体IL-2/synTac与原代人HPV16 E7 (11-20) 特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的结合导致IFN- $\gamma$ 的剂量依赖性分泌。用包含CMV肽而不是HPV16 E7 (11-20)的对照IL-2/synTac未观察到IFN- $\gamma$ 产生。

[0696] 虽然本发明已经参考其特定实施方案进行了描述, 但是本领域技术人员应理解, 可在不脱离本发明的真实精神和范围下进行各种变化且可取代等效物。此外, 为了使特定的情况、材料、物质的组合物、方法、方法步骤或步骤适应本发明的目的、精神和范围, 可进行许多改进。所有此类修改均意图处于所附权利要求的范围内。

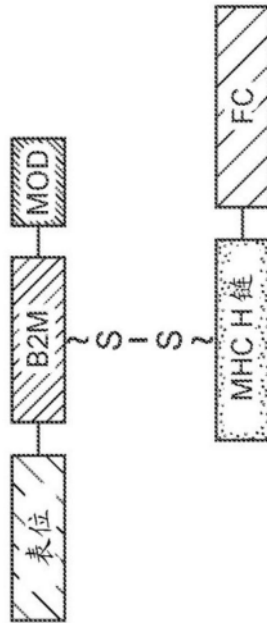


图1A

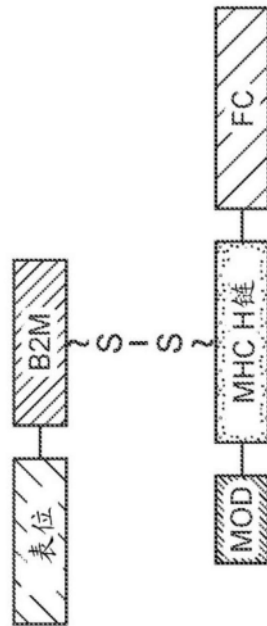


图1B



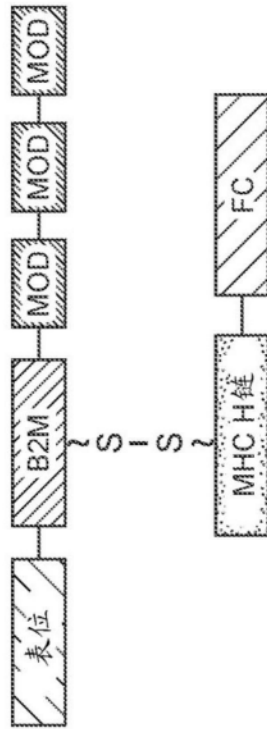


图1C

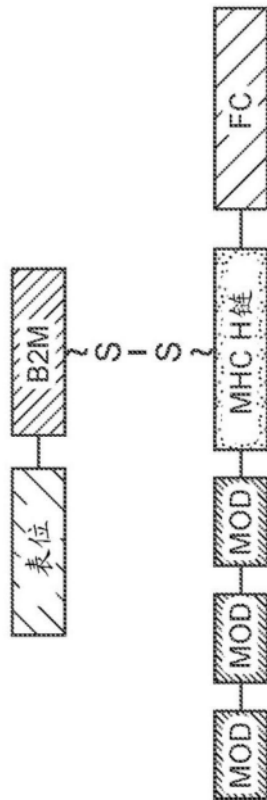


图1D

## IL2-智人

APTSSSTKKT QLQLEEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:1)

图2A

## IL2 (F42X) (SEQ ID NO:38)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCQSIIS TLT

图2B

## IL2 (D20X) (SEQ ID NO:39)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCQSIIS TLT

图2C

## IL2 (E15X) (SEQ ID NO:40)

APTSSSTKKT QLQLXHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCQSIIS TLT

图2D

## IL2 (H16X) (SEQ ID NO:41)

APTSSSTKKT QLQLEXLLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCQSIIS TLT

图2E

## IL2 (Y45X) (SEQ ID NO:42)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFXMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCQSIIS TLT

图2F

## IL2 (Q126X) (SEQ ID NO:43)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCXSIIS TLT

图2G

## IL2 (F42X; H16X) (SEQ ID NO:44)

APTSSSTKKT QLQLEXLLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCQSIIS TLT

图2H

## IL2 (F42X; D20X) (SEQ ID NO: 45)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCQSIIS TLT

图2I

## IL2 (F42X; D20X; E15X) (SEQ ID NO: 46)

APTSSSTKKT QLQLXHLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCQSIIS TLT

图2J

## IL2 (F42X; D20X; H16X) (SEQ ID NO: 47)

APTSSSTKKT QLQLEXLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCQSIIS TLT

图2K

## IL2 (F42X; D20X; Q126X) (SEQ ID NO: 48)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCXSIIS TLT

图2L

IL2 (F42X; D20X; Y45X) (SEQ ID NO:49)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFXMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCQSIIS TLT

图2M

IL2 (F42X; D20X; Y45X; H16X) (SEQ ID NO:50)

APTSSSTKKT QLQLEXLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFXMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCQSIIS TLT

图2N

IL2 (F42X; D20X; Y45X; Q126X) (SEQ ID NO:51)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFXMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCXSIIS TLT

图2O

IL2 (F42X; D20X; Y45X; H16X; Q126X) (SEQ ID NO:52)

APTSSSTKKT QLQLEXLLLX LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFXMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCXSIIS TLT

图2P

IL2 - (F42X, H16X, Q126X) (SEQ ID NO: 53)

APTSSSTKKT QLQLEXLLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TXKFYMPKKA TELKHLQCLE  
EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR  
WITFCXSIIS TLT

图2Q

IL2R- $\alpha$ 链 (SEQ ID NO: 54)  
智人

1 **MDSYLLMWGL LTFIMVPGCQ** AELCDDDDPE IPHATFKAMA YKEGTMLNCE CKRGFRRIKS  
61 GSLYMLCTGN SSHSSWDNQC QCTSSATRNT TKQVTPQPEE QKERKTTEMQ SPMQPVVDQAS  
121 LPGHCREPPP WENEATERIY HFVVGQMVYI QCVQGYRALH RGPAAESVCKM THGKTRWTQP  
181 QLICTGEMET SQFPGEKPKQ ASPEGRPESE TSCLVTTTDF QIQTEMAATM ETSIFTTEYQ  
241 VAVAGCVFLL ISVLLLSGLT WQRRQRKRRR TI

成熟=氨基酸 22-272

图3A

IL2R-β链 (SEQ ID NO: 55)  
智人

1 MAAPALSWRL PLLILLPLA TSWASAVNG TSQFTCFYNS RANISCVWSQ DGALQDTSCQ  
 61 VHAWPDRRRW NQTCELLPVS QASWACNLIL GAPDSQKLT VDIVTLRVL C REGVRWRVMA  
 121 IQDFKPFENL RLMAPISLQ VHVETHRCNI SWEISQASHY FERHLEFEAR TLSPGHTWEE  
 181 APLLTLLKQKQ EWICLETLP DTQYEFQVRV YLLINCRNT GPWLKVKLC NTPDPSKFFS QLSSEHGGDV  
 241 IPWLGHLLVG LSGAFGFIL EISPLEVLER DKVTQLLLQ DKVPEPASLS SNHSLTSCFT  
 301 QKWLSSFFPS SSFSPGGLAP YFTYDFYSEE DPDEGVAGAP TGSSPQPLQP LSGEDDAYCT  
 361 NQYFFFHLP DALEIEACQ PSTAPGGSGA GEERMPPSLQ ERVPRDWDPO PLGPTTPGVP  
 421 FPSRDDLLLF SPSSLGGPSP PDAGPREGVS FPWRRPPGQG EFRALNARLP LNTDAYLSLQ  
 481 DLVDFQPPPE LVLREAGEEV  
 541 ELQGGDPTHL V

成熟=氨基酸27-551

图3B

IL2R- $\gamma$ 链 (SEQ ID NO: 56)  
智人

```

1  MLKPSLPFTS  LLFLQLPLLG  VGLNTHLTP  NGNEDTTADF  FLTTMPTDSL  SVSTLPLPEV
61  QCFVNVVEYM  NCTWNSSEP  QPTNLTLYW  YKNSDNDKVQ  KCSHYLFSEE  ITSGCQLQKK
121  EIHLVQTFVV  QLQDPREFRR  QATQMLKLQN  LVIPWAPENL  TLHKLSESQL  ELNWNRRFLN
181  HCLEHLVQYR  TDWDHSWTEQ  SVDYRHKFSL  PSVDGQKRYT  FRVRSRNFNPL  CGSAQHWSEW
241  SHPIHWGSNT  SKENPFLFAL  EAVVISVGS  GLIISLLCVY  FWLERTMPRI  PTLKNLEDLV
301  TEYHGNFSAW  SGVSKGLAES  LQPDYSERLC  LVSEIIPPVGG  ALGEGPGASP  CNQHSPIYWAP
361  PCYTLKPET

```

成熟=氨基酸 23-369

图3C



GenBank 3S7G\_A (SEQ ID NO: 57)  
 智人 IgG1 Fc  
 227 aa

1 dkthtppcp apellggpsv flfppkpkdt lmsirtpevt cvvvdvshed pevknwyvd  
 61 gvevhnaktk preeqnsty rvsvltvlh qdwlngkeyk ckvsnkalpa piektiskak  
 121 gprepqvyt lppsrdeitk nqsvltclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppvlds  
 181 dgsfflyskl tvdkrwwqgg nvfscsvmhe alhnhytqks lslspgk

GenBank AAN76044 (SEQ ID NO: 58)  
 智人 IgG2 Fc (氨基酸 99-325)  
 227 aa

1 stkgpsvfp1 apcsrstses taalglvkd yfpepvtvsw nsgaltsgvh tfpavlgssg  
 61 lyslssvvtv pssnfgtqty tcnvdhkpsn tkvdktverk ccvecpcpa ppvagpsvf1  
 121 fppkpkdtlm isrtpevtcv vdvshedpe vqfnwyvdgv evhnaktkpr eeqfnstfirv  
 181 vsvltvvhqd wlngkeykck vsnkglpapi ektisctkgq prepqvytlp psreemtknq  
 241 vsltclvkgf ypsdiavewe sngqpennyk ttpmldsdg sfflyskltv dksrwqqgnv  
 301 fscsvmheal hnhytqksls lspgk

GenBank AAW65947 (SEQ ID NO: 59)  
 智人 IgG3 Fc (氨基酸 19-246)  
 238 aa

1 hkpsntkvdk rvelktplgd tthtcpcpa pellggpsvf lfppkpkdtl misrtpevtc  
 61 vvdvshedp evkfnwyvdg vevhnaktkp reeqynstyr vsvltvlhq dwlngkeykc  
 121 kvsnkalpap iektiskakg qprepqvytl ppsrdeltkn qsvltclvkg fypsdiavew  
 181 esngqpenny kttppvlds gsflysklt vdkrwwqgn vfscsvmhea lnhnytqks1  
 241 slspgk

图4A

GenBank AAA52770 (SEQ ID NO: 60)  
 智人 IgD Fc (氨基酸 162-383)  
 222 aa

```

1 ptkapdvfpi isgcrhpkdn spvvlacilit gyhptsvtvt wymgtqsqpq rtfpeiqrdd
61 syymtssqls tplqwrqge ykcvvqhtas kskkeifrwep espkaqassv ptaqpqaegs
121 lakattapat trntgrggee kkekekeeeq eeretktped pshtqplgvy lltpavqdlw
181 lrdkatftcf vvgSDLkdah ltwevagkvp tggveeglle rHsngsqsqh srtltprslw
241 nagtsvtct1 nhpslppqr1 malrepaaga pvklslnlla ssdppeaaasw llcevsqfisp
301 pnillmwled qrevntsgfa parppppqprs ttfwawsvlr vpappspqpa tytcvvsheed
361 srtllnasrs levsyvtDhg pmk

```

GenBank 0308221A (SEQ ID NO: 61)  
 智人 IgM Fc  
 276 aa

```

1 vtstltikzs dwlgesmftc rvdhrgltfq qnassmcvypd qdtairvfai ppsfasiflt
61 kstkltlclvt dltybsvti swtreengav kthtnisesh pnatfsavge asicedbdws
121 gerftctvth tdlpsplkqt isrpkgvalh rpbvylppa rzzlnlresa titclvtgfs
181 padvfvevmq rgeplspqky vtsapmepq apgryfahsi ltvseeewnt ggtytcvvhah
241 ealpnrvter tvdkstgkpt lynvslvmsd tagtcy

```

图4B

GenBank P01876 (SEQ ID NO: 62)  
 智人 **IgA Fc** (氨基酸 120-353)  
 234 aa

```

1  asptspkvfp  lslcstqpdg  nvviaclvqg  ffpqeplsvt  wsesgggvt  rnfppsqdas
61  gdlyttssql  tlpatqclag  ksvtchvkhy  tnpdqdvtp  cpvpstpptp  spstpptpsp
121  scchprlslh  rpaledlllg  seanltctl  glrdasgvtf  twtpssgksa  vggpperdlc
181  gcysvsvslp  gcaepwnhgk  tftctaaype  skpltatls  ksgntfirpev  hllpppseel
241  alnelvtltc  largfspkdv  lvrwlqgsge  lprekyltwa  srqepsqgtt  tfavtsilrv
301  aaedwkkgdt  fscmvgheal  plaftgktid  rlagkpthvn  vsvymaevdg  tcy

```

GenBank 1F6A B (SEQ ID NO: 63)  
 智人 **IgE Fc** (氨基酸 6-222)  
 212 aa

```

1  adpcdsnprg  vsaylsrpsp  fdllfirkcpt  itclvvdlap  skgtvnlts  rasgkpvnhs
61  trkeekgrng  tltvtstlpv  gtrdwieget  yqcrvthphl  pralmrsttk  tsgprrapev
121  yafatpewpg  srdkrtlacl  iqnfmpedis  vqwlhnevql  pdarhsttqp  rktkgsqgffv
181  fsrlevtrae  weqkdeficr  avheaaspsq  tvqravsvnp  gk

```

GenBank P01861 (SEQ ID NO: 64)  
 智人 **IgG4 Fc** (氨基酸 100-327)  
 228 aa

```

1  astkgpsvfp  lapcsrstse  staaalgclvk  dyfpepvtvs  wnsгалtsgv  htfpavlqss
61  glyslssvvt  vpssslgtkt  ytcnvdkhks  ntkvdkrves  kygppcpscp  apeflggpsv
121  flfppkpkt  lmsirtpevt  cvvvdvsqgd  pevqfnwyvd  gvevhnaktk  preeqfnsty
181  rvsvltvlh  qdwlngkeyk  ckvsnkgllps  siektiskak  gqprepqvyt  lppsgeemtk
241  nqvsltclvk  gfypsdiave  wesngqppenn  ykttppvlds  dgsfflysr1  tvdksrwqeg
301  nvfscsvmhe  alhnhytqks  ls1slgk

```

图4C

智人 (SEQ ID NO:65)  
 GenBank NP\_001229687  
 HLA-A  
 氨基酸25-365

```

1  mavmaprtl1 lllsgalalt qtwagshsmr yfftsvsrpg rgeprfiavg yvddtqfvrf
61 dsdaasqkme prapwieqeg peywdqetrn mkahsqtdra nlgtlrlyyn qsedgshtiq
121 imygcdvvpd grflrgyrqd aydgkdyial nedlrswtaa dmaaqitkrk weavhaaeqr
181 rvylegrcvd glrrylengk etlqrdppk thmthpisd heatlrcwal gfyvaeitlt
241 wqrdgedtq dtelvetrpa gdgtfqkwa vvpvsgeegr ytchvqhegl pkpltlrwel
301 ssqptipivg iiaglvllga vitgavvaav mwriksdrk ggsytqaass dsaggsdvs1
361 tackv

```

图5A

智人  
 GenBank NP\_005505 (SEQ ID NO:66)  
 HLA-B  
 氨基酸 25-362

```

1 mlvmaprtvl lllsaalalt etwagshsmr yfytvsrpg rgeprfivg yvddtqfvrf
61 dsdaaspree prapwieqeg peywdrntqi ykagaqtdre slrnlrqyyn qseagshtlq
121 smygcdvpgd grllrghdqy aydgkdyial nedlrswtaa dtaaqitqrk weaareaeqr
181 raylegecve wlrrylengk dkleradppk thvthpisd heatlrcwal gfypaeitlt
241 wqrdgedqtq dtelvetrpa gdrffqkwa vvpvpsgeeqr ytchvqhegl pkppltlrwep
301 ssqstvpivg ivaglavlav vvigavvaav mcrkssggk ggsysqaacs dsaqgsdvs1
361 ta
  
```

图5B

智人  
 GenBank NP\_001229971 (SEQ ID NO:67)  
 HLA-C  
 氨基酸 25-366

```

1  mrvmaprall lllsgglalt etwacshsmr yfdtavsrpg rgeprfisvg yvddtqfvrf
61  dsdaasprge prapwveqeg peywdretqn ykrqaqadr slnlrgyyn qsedgshltlq
121 rmygcdlpgd grllrgydds aydgkdyial nedlrswtaa dtaagitqrk leaaraaeql
181 raylegtcve wlrrylengk etlqraeppk thvthhplsd heatlrcwal gfyphaeitlt
241 wqrdgedqtq dtelvetrpa gdtfqkwa vvpvsggeqr ytchmqhegl qepltlswep
301 ssqptipimg ivaglavlvv lavlgavvta mmcrrkssgg kggscsqaac snsaggsdes
361 litcka

```

图5C



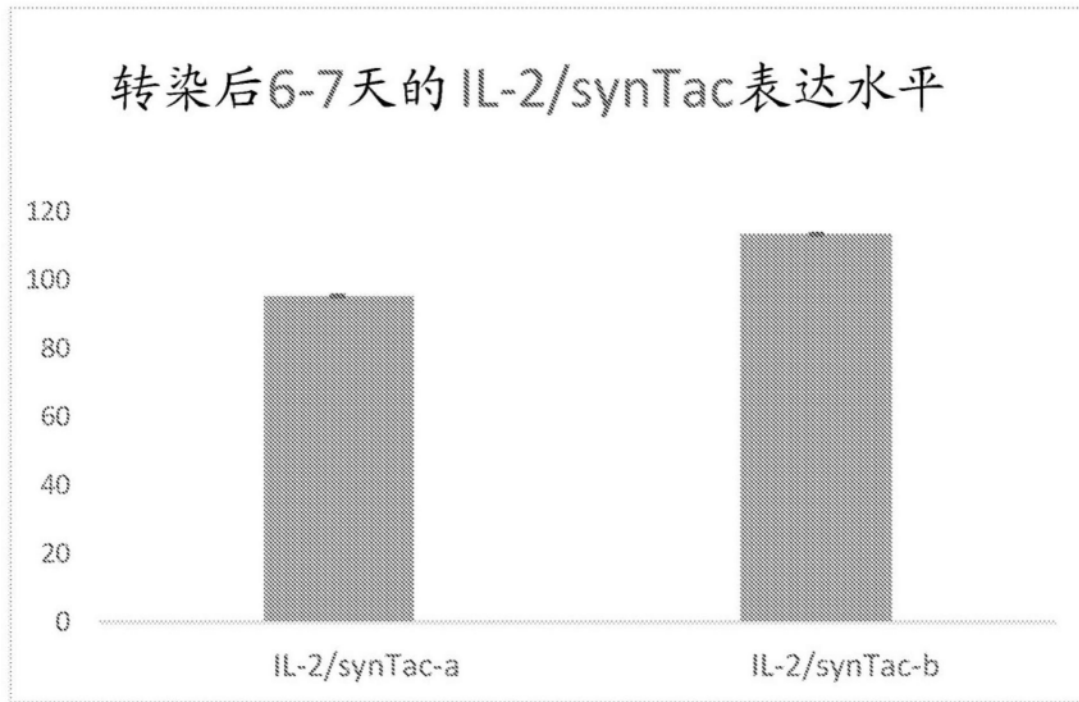


图7A



### 纯化的产物

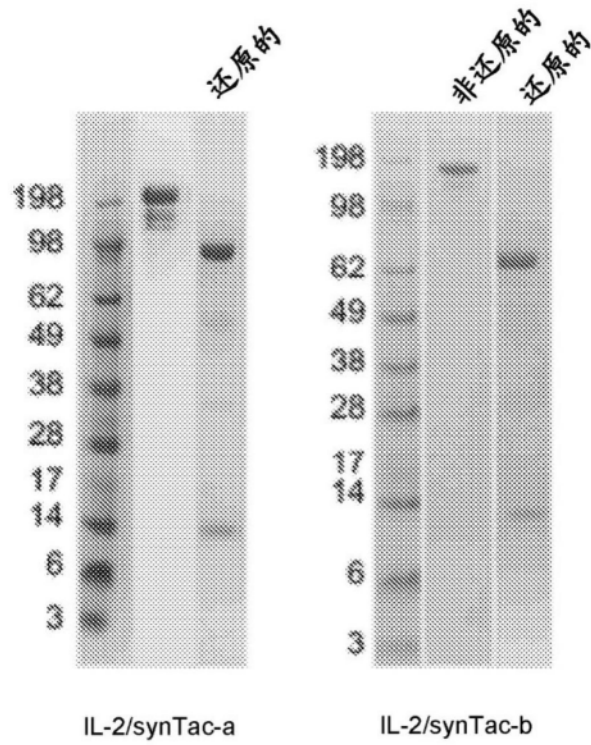


图7B

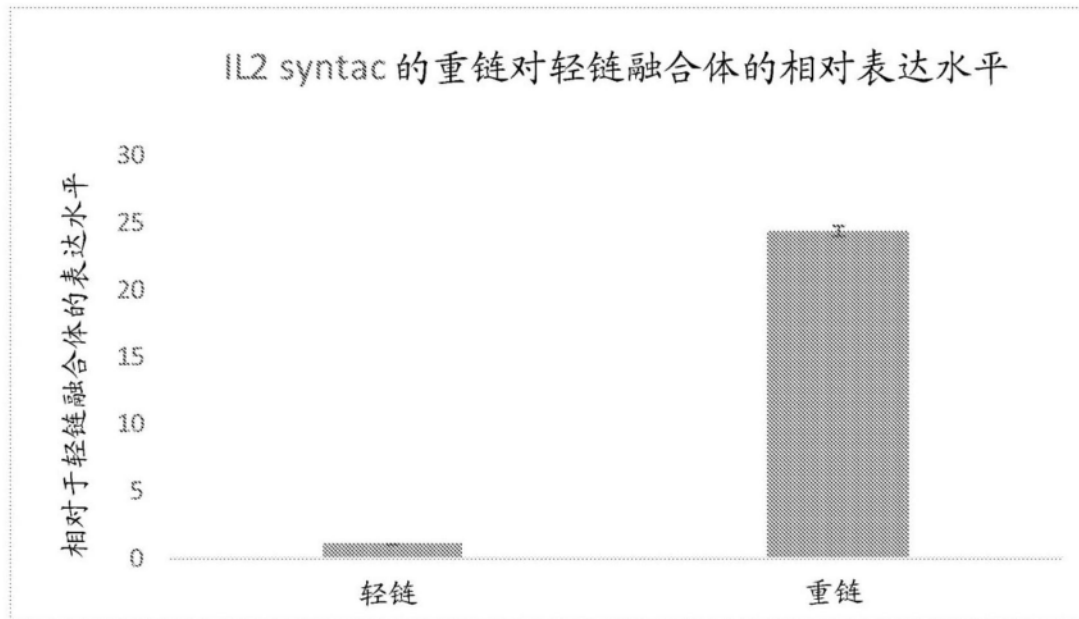


图8A

使用重链融合体的稳定性增加

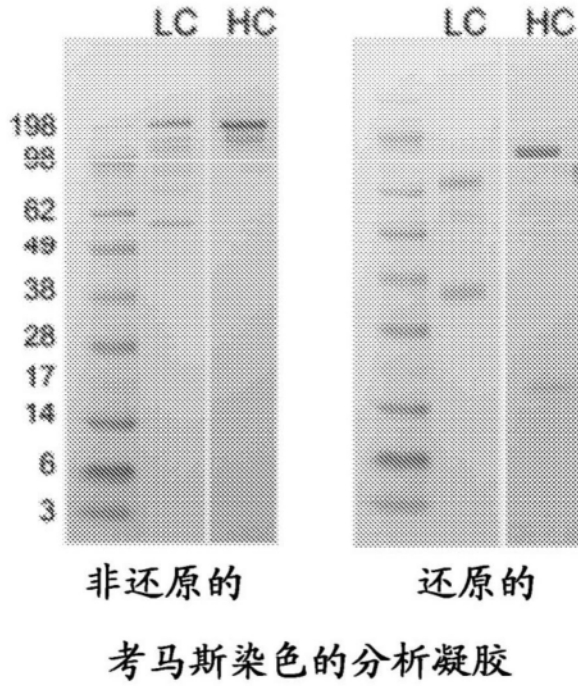


图8B

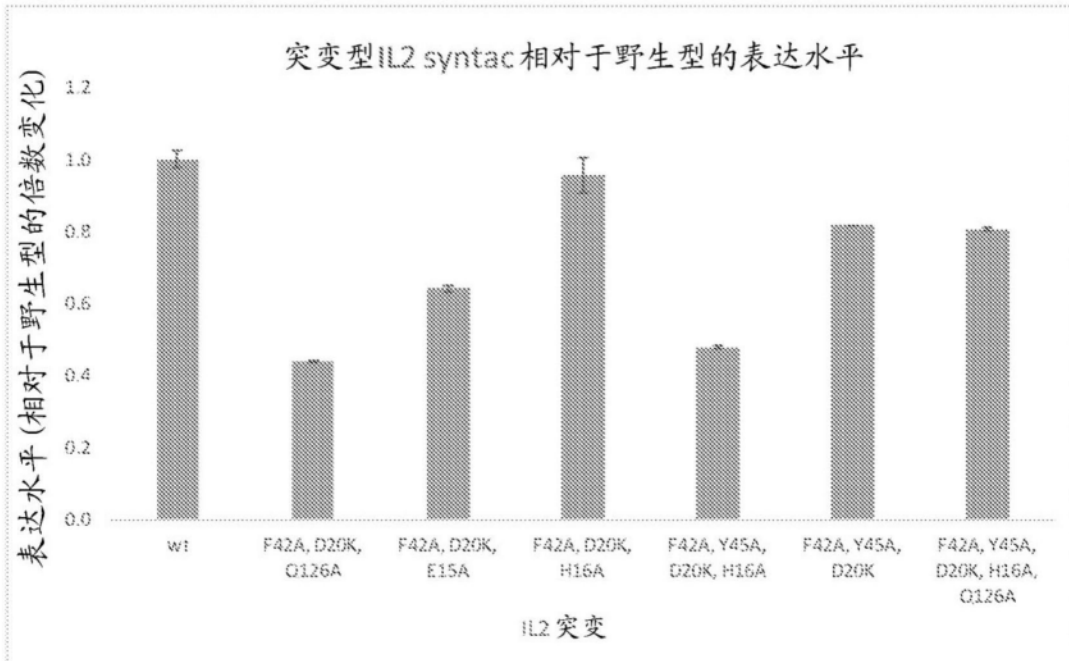


图9

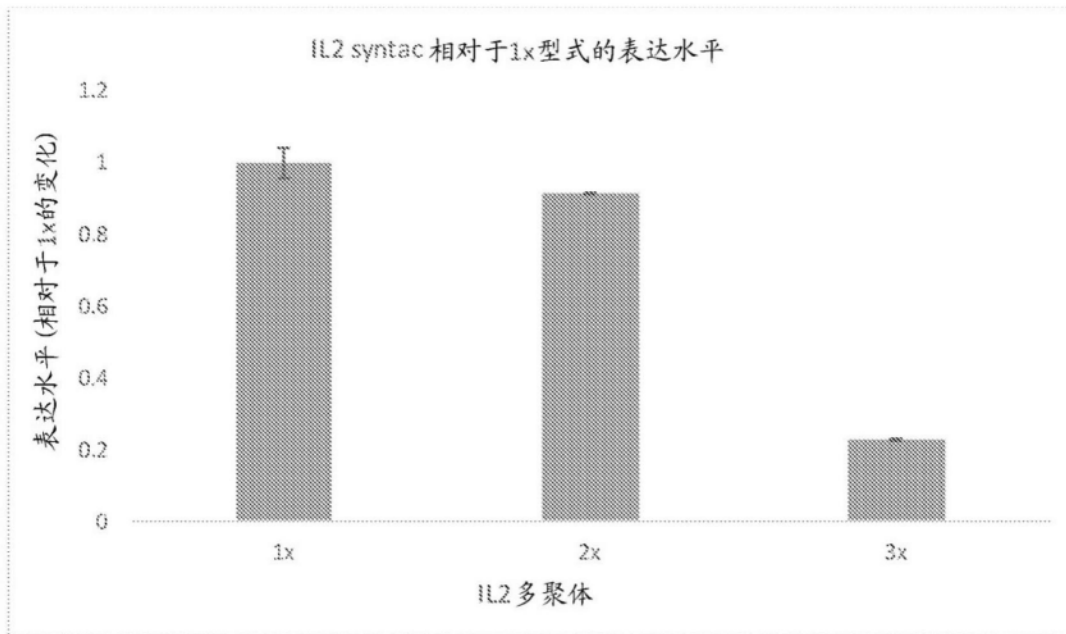


图10

肽-MHC: IL-2<sub>n</sub> (F42A, H16A; n=2)

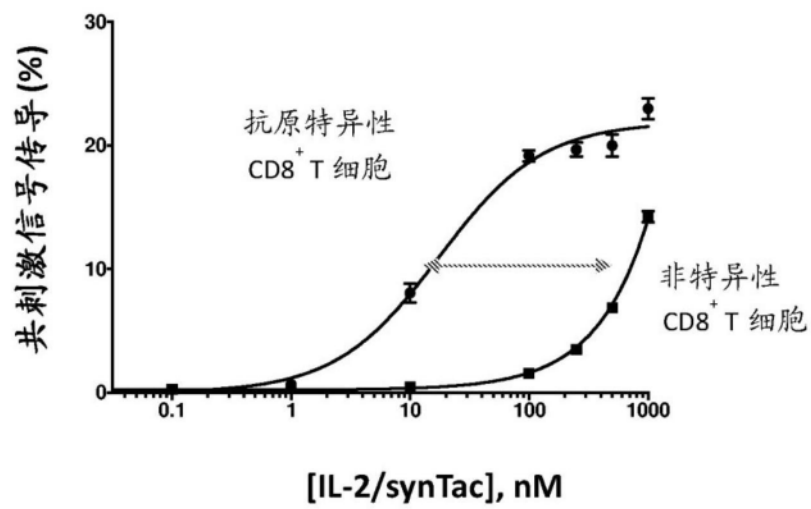


图11

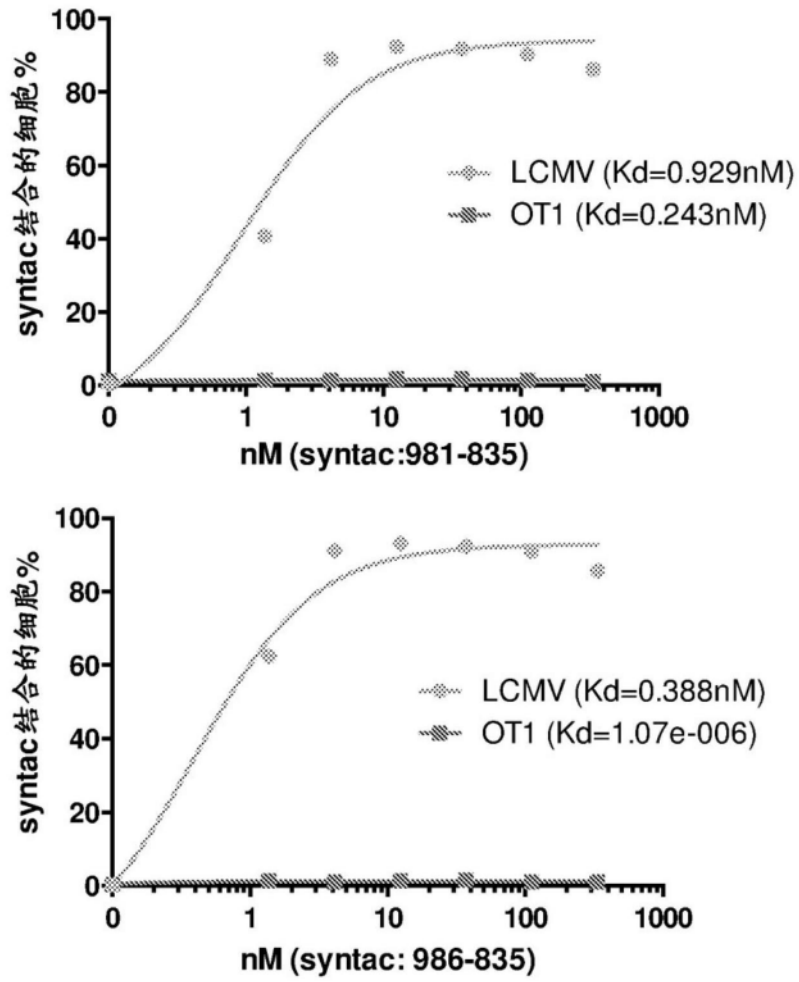


图12

IL-2 重复对突变的数量

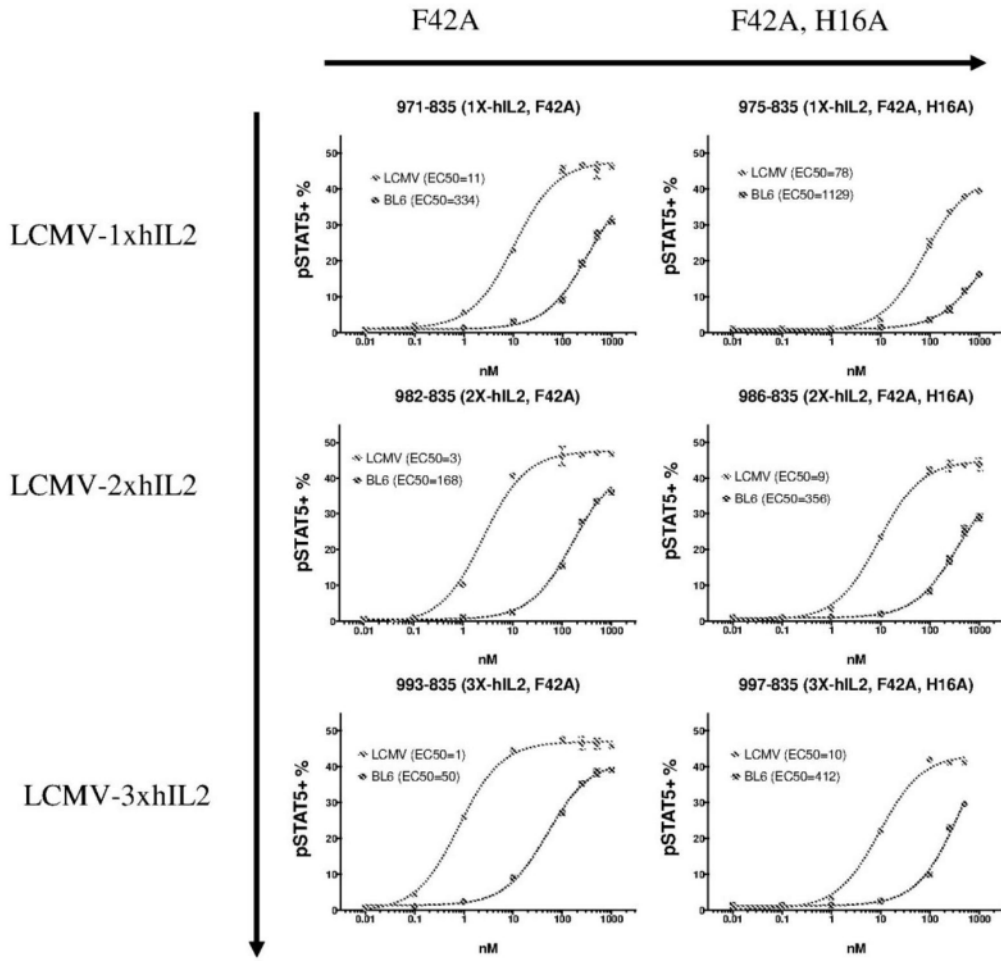
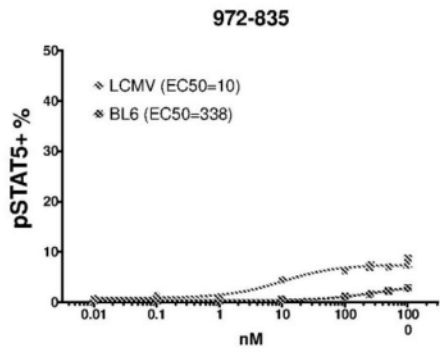


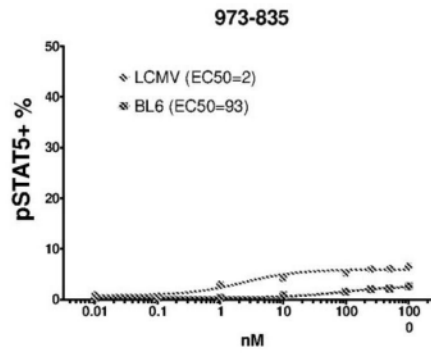
图13

IL-2 的一个拷贝

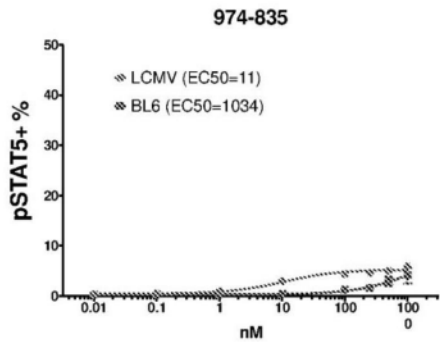
突变: F42A, D20K



突变: F42A, D20K, Q126A



突变: F42A, D20K, E15A



突变: F42A, D20K, H16A

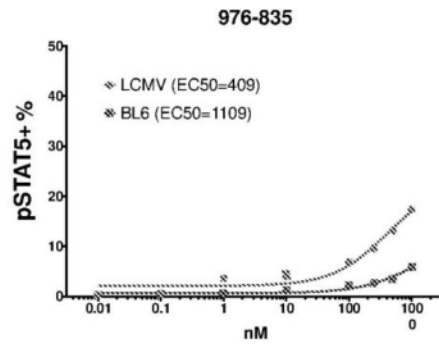
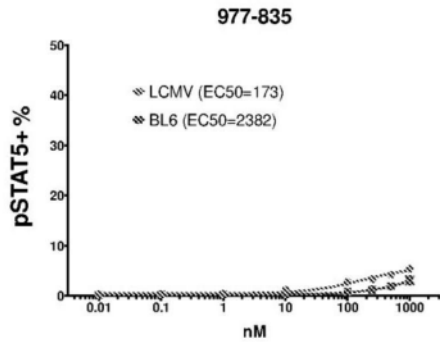


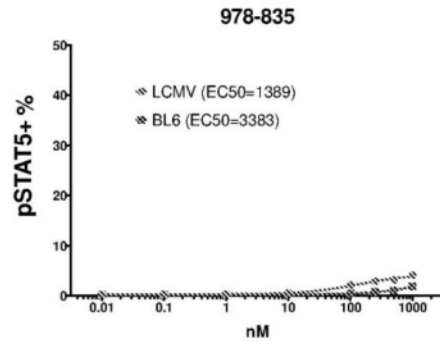
图14A

IL-2 的一个拷贝

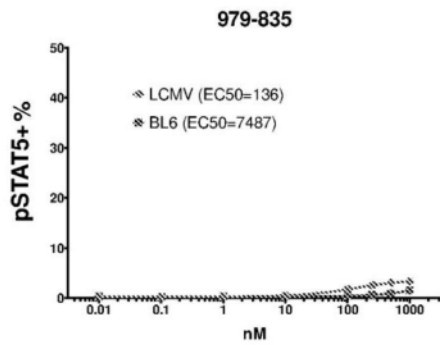
突变: F42A, Y45A, D20K, H16A



突变: F42A, Y45A, D20K



突变: F42A, Y45A, D20K, H16A, Q126A



突变: F42A, Y45A, D20K, Q126A

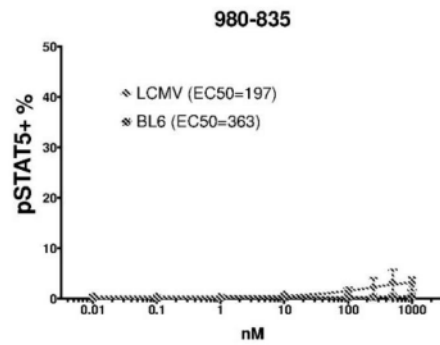
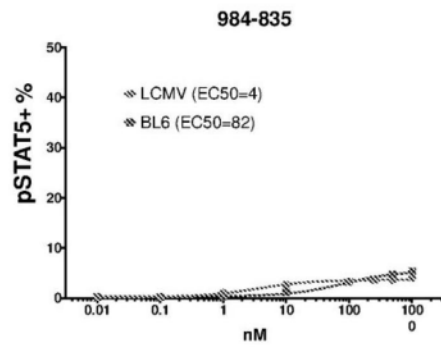
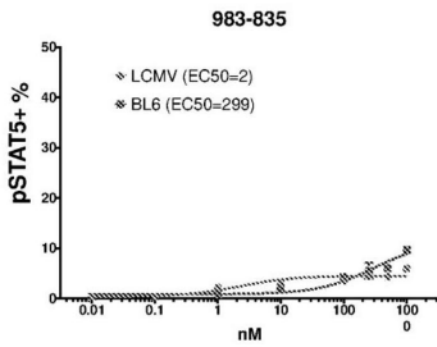


图14B

IL-2 的两个拷贝

突变: F42A, D20K

突变: F42A, D20K, Q126A



突变: F42A, D20K, H16A

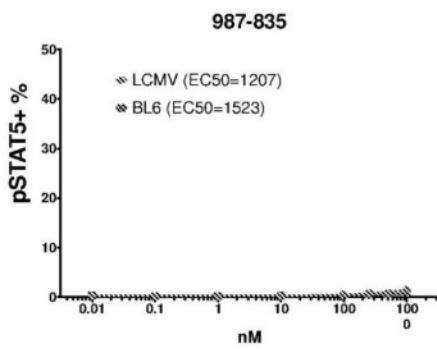
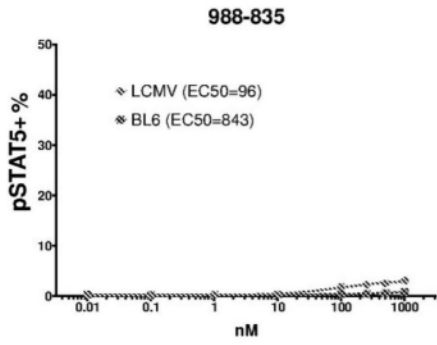


图14C

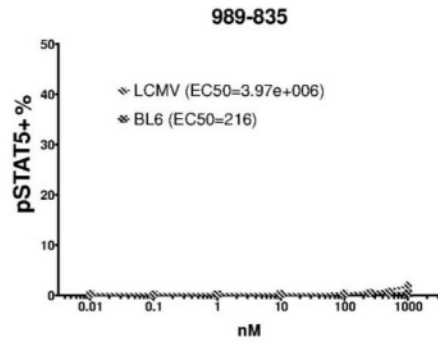


IL-2的两个拷贝

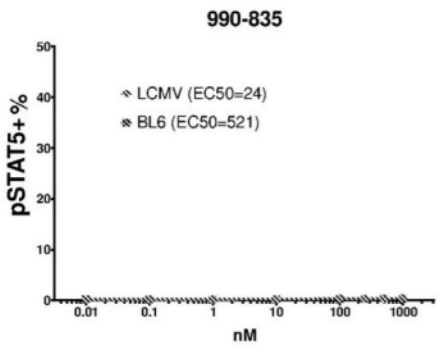
突变: F42A, Y45A, D20K, H16A



突变: F42A, Y45A, D20K



突变: F42A, Y45A, D20K, H16A, Q126A



突变: F42A, Y45A, D20K, Q126A

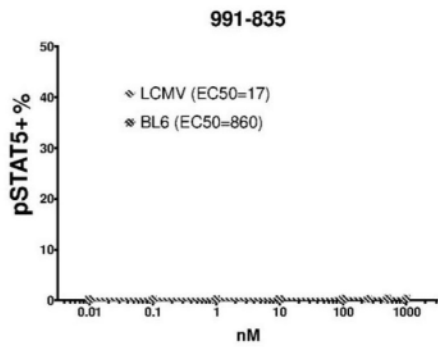
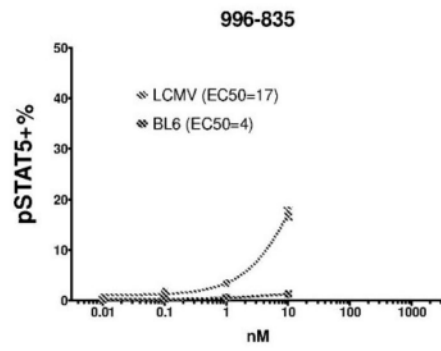
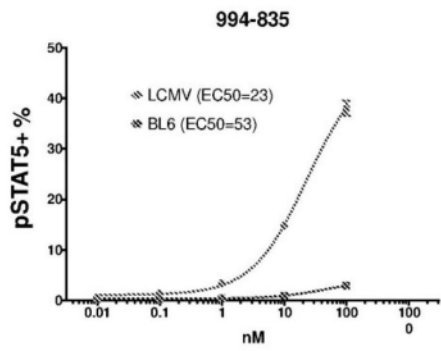


图14D

IL-2 的三个拷贝

突变: F42A, D20K

突变: F42A, D20K, E15A



突变: F42A, D20K, H16A

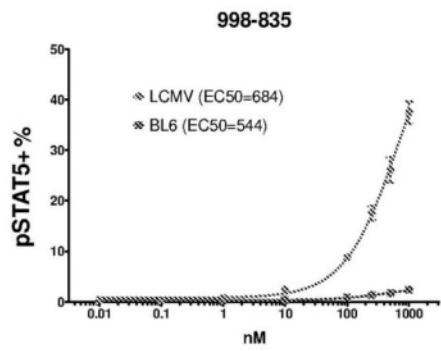
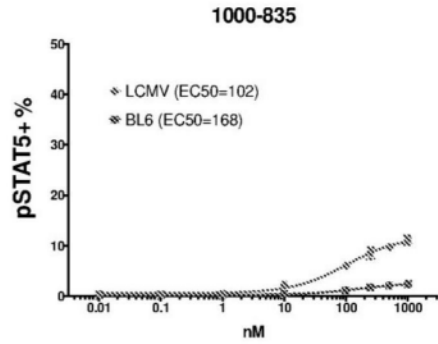
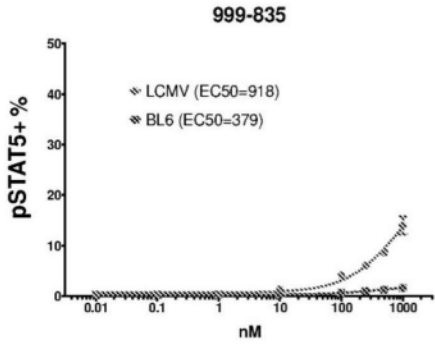


图14E

IL-2的三个拷贝

突变: F42A, Y45A, D20K, H16A

突变: F42A, Y45A, D20K



突变: F42A, Y45A, D20K, H16A, Q126A

突变: F42A, Y45A, D20K, Q126A

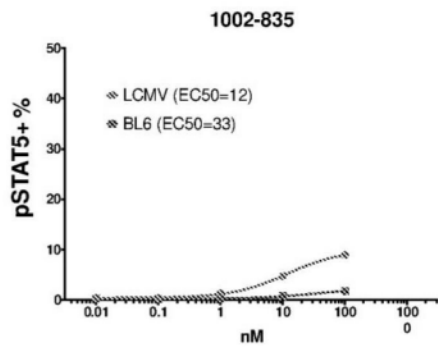
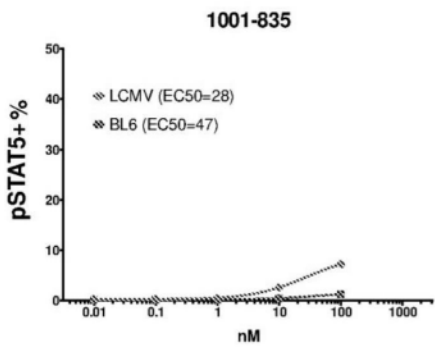


图14F

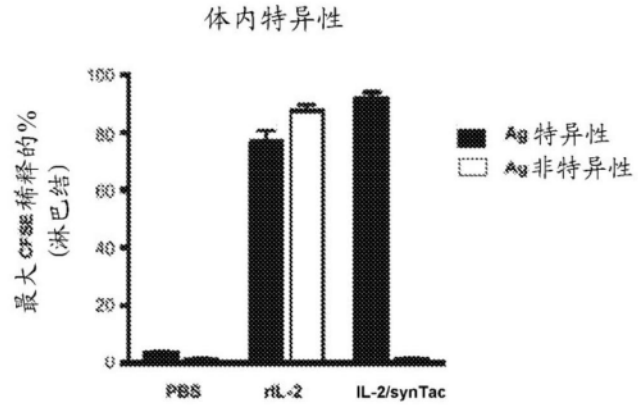
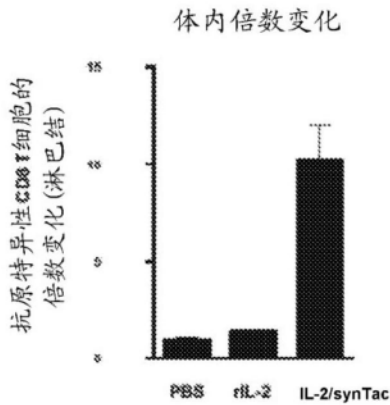
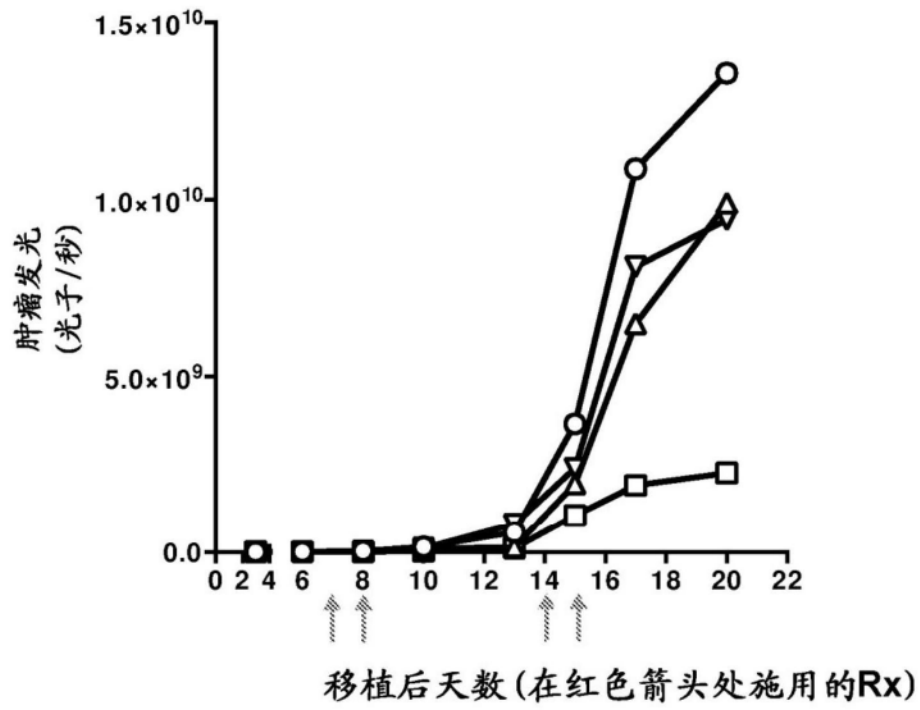
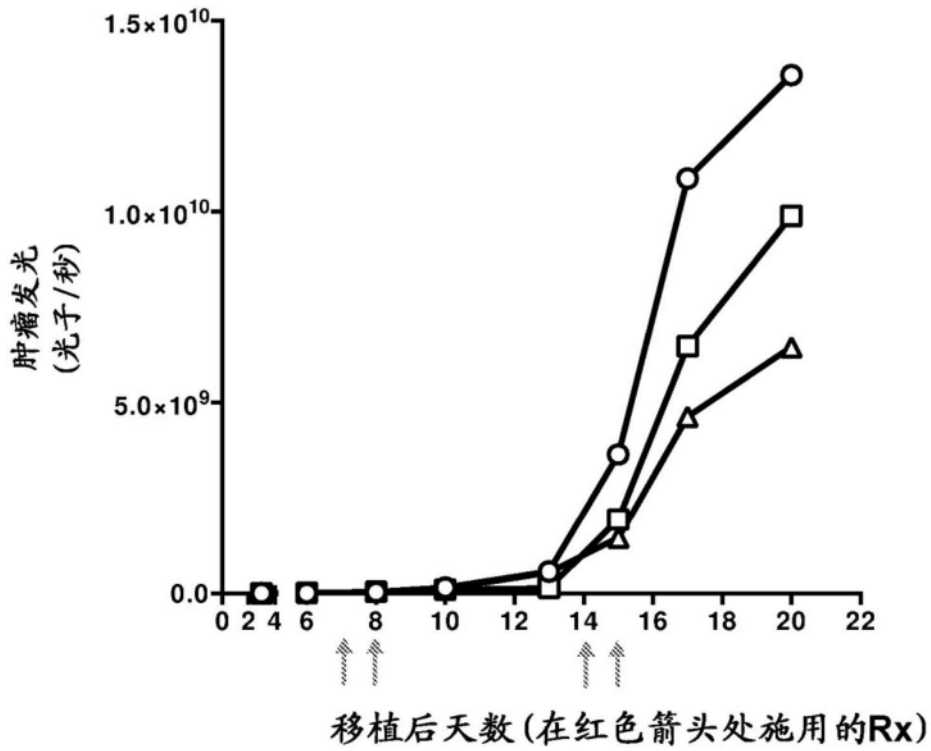


图15



- 具有 250 mM NaCl 的 PBS
- △ 986-635, E7 2x hIL-2 (F42A,H16A) - Fc (LEKK) IP, 4mg/kg
- ▽ 986-635, E7 2x hIL-2 (F42A,H16A) - Fc (LEKK) IP, 8mg/kg
- 986-635, E7 2x hIL-2 (F42A,H16A) - Fc (LEKK) IP, 16mg/kg

图16A



- 具有250 mM NaCl的PBS
- 986-635, E7 2x hIL-2 (F42A,H16A) - Fc (LEKK) IP, 4mg/kg
- △ 986-635, E7 2x hIL-2 (F42A,H16A) - Fc (LEKK) SubQ, 4mg/kg

图16B

### 1X IL-2 (F42A, H16A)-Fc synTac

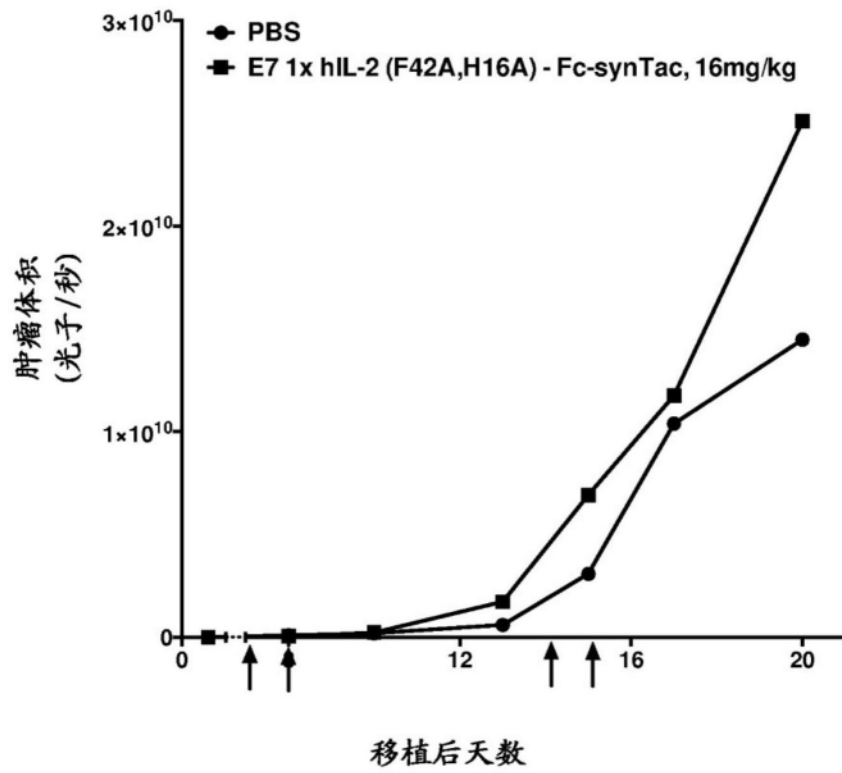


图17A

2X IL-2 (F42A, H16A)-Fc synTac

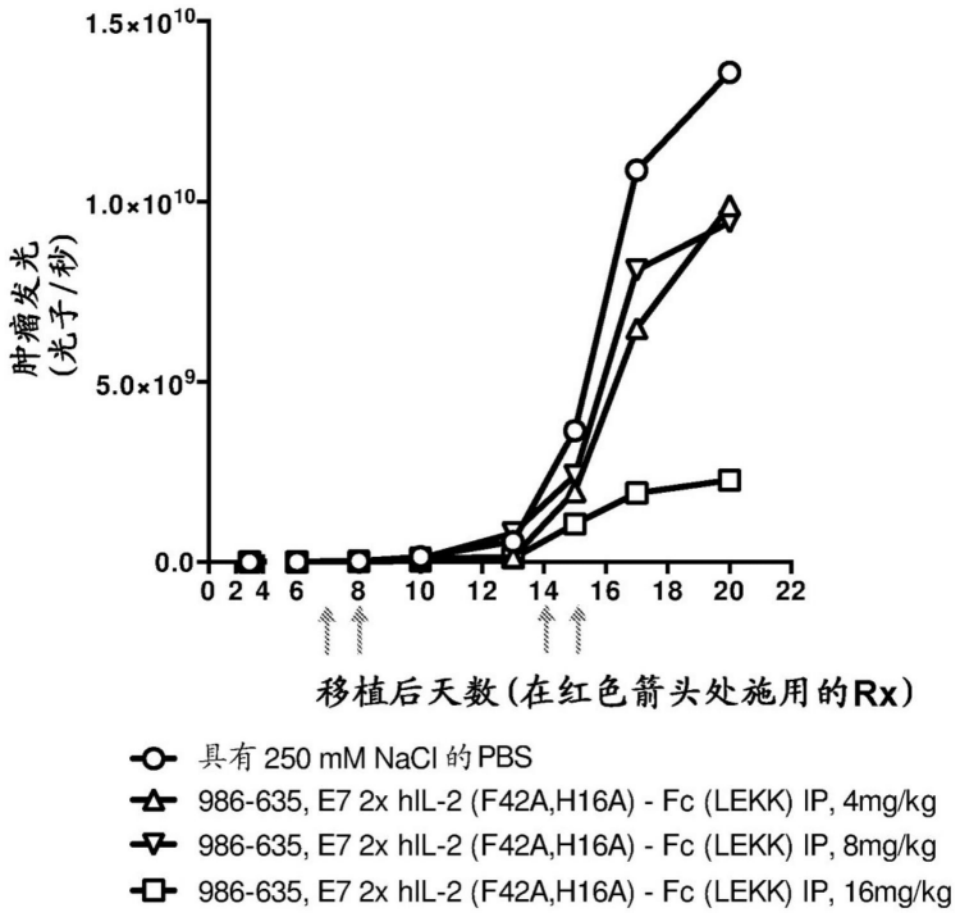


图17B

976-835 LCMV-hIL-2 (F42A, D20K;H16A) (10mg/kg, IP)

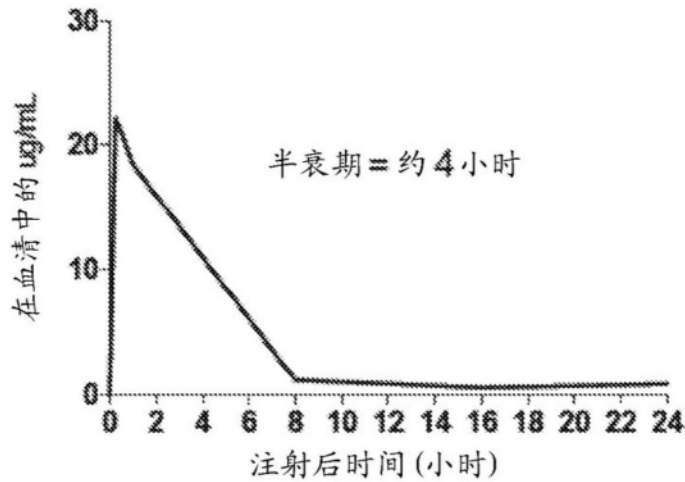
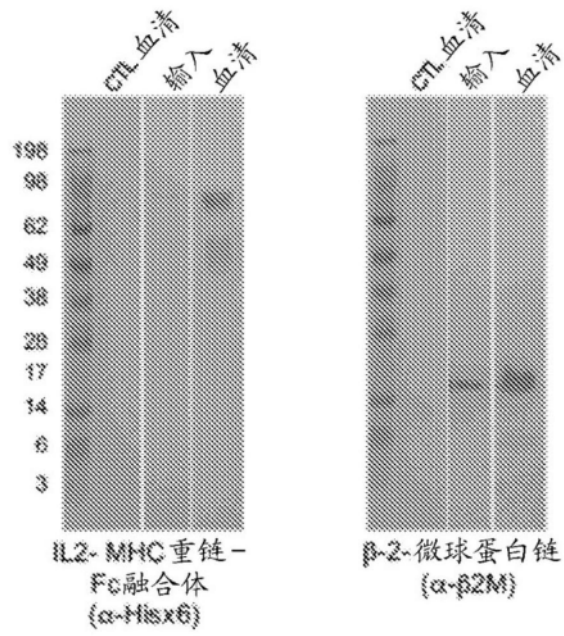


图18



蛋白质印迹分析

图19

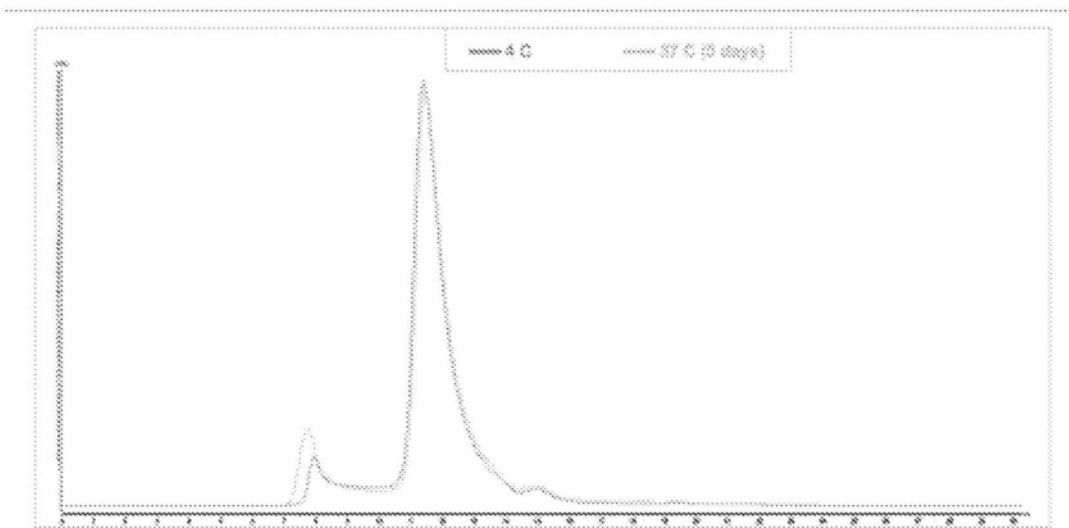


图20



具有前导肽的CUE101-N297A (SEQ ID NO: 68)

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRML  
TAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE  
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSSAPTSSST  
KKTQLQLEALLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLE  
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS  
IISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGSHSMRYFFT SVSRPGRGEP RFI AVGYVDDTQFV  
RFSDAASORMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGAYNOSEAGSHT  
VORMYGCDVGS DWRFLRGYHOYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAE  
QLRAYLEGTCVEWLRRLRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALS FYPAEIT  
LTWORDGEDQTQDTEL VETRPCGDGT FOKWAAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW  
AAAAGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK  
TI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

人 IL2 前导序列-斜体

**IL-2 (H16A/F42A) - 粗体 (其中H16和F42加下划线)**

(G4S)4 接头-加单下划线

**MHC H 链 Y84A; A236C-加双下划线 (其中Y84A和A236C呈粗体)**

**AAAGG 接头-加单下划线**

人 IgG1 Fc; N297A - (粗体且加下划线, 其中N297A未加粗)

图21

无 前导肽的CUE101-N297A (SEQ ID NO: 69)

APTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRML  
TAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE  
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSSAPTSSST  
KKTQLQLEALLLDLQMIILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLE  
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS  
IISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGSHSMRYFFT SVSRPGRGEP RFI AVGYVDDTQFV  
RFSDAASORMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGAYNOSEAGSHT  
VORMYGCDVGS DWRFLRGYHOYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAE  
QLRAYLEGTCVEWLRRLRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALS FYPAEIT  
LTWORDGEDQTQDTEL VETRPCGDGT FOKWAAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW  
AAAAGG DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK  
TI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**IL-2 (H16A/F42A) - 粗体 (其中H16和F42加下划线)**

(G4S)4 接头 - 加单下划线

**MHC H 链 Y84A; A236C-加双下划线 (其中Y84A和A236C呈粗体)**

**AAAGG 接头 - 加单下划线**

人 IgG1 Fc; N297A - (粗体且加下划线, 其中N297A未加粗)

图22

CUE101-N297A (SEQ ID NO:70)

1360:

ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCCTTGTACAAAACAGTGCACCTACTTC  
AAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGGCAATTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATG  
GAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACCTACCAGGATGCTCACAAGCAAGTTTTACATGCCAAGAAG  
GCCACAGAAGTAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTT  
AGCTCAAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGA  
ACTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTC  
TGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTG  
GAGGTTCTGGTGGTGGGGGATCTGGAGGCGGAGGATCTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACA  
CAGCTACAACCTGGAGGCAATTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAAT  
CCCAAACCTACCAGGATGCTCACAAGCAAGTTTTACATGCCAAGAAGGCCACAGAAGTAAACATCTT  
CAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTCA  
CTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAAGTAAAGGGATCTGAAACAA  
CATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTT  
GTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTGGGGGA  
TCTGGAGGCGGAGGATCTGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTTACATCCGTGTCCCGGCCCGCCGCG  
GGGAGCCCCGCTTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCTGTGCGGTTTCGACAGCGACGCCG  
CGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGTCCGGAGTATTGGGACGGGGGA  
GACACGGAAAGTGAAGGCCCACTCACAGACTCACGAGTGGACCTGGGGACCTGCGCGGCCCTACA  
ACCAGAGCGAGGCCGGTTCTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGCTGCGACGTGGGGTTCGGACTGGCGC  
TTCTCCGCGGGTACCACCAGTACGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCGCT  
CTTGACCGCGGGGACATGGCAGCTCAGACCACCAAGCACAAGTGGGAGGCGCCCATGTGGCGGAG  
CAGTTGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGA  
GACGCTGCAGCGCACGGACGCCCCAAAACGCATATGACTCACCACGCTGTCTCTGACCATGAAGCCACC  
CTGAGGTGCTGGGCCCTGAGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGA  
CCAGACCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCCTTGCGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCGG  
CTGTGGTGGTGCCTTCTGGACAGGAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTTTGCCCAAGC  
CCCTCACCTGAGATGGGAGGCAGCTGCGGGTGGCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCA  
CCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCC  
GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG  
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAGCAC  
GTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA  
AGGTCTCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA  
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG  
CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC  
AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG  
ACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCAC  
TACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAGTGA

图23A

人 IL2 前导序列-斜体  
 人 IL2; H16A=GCA; F42A=GCA - 粗体(其中 GCA 加下划线)  
 (G4S)4 接头-加单下划线  
 人 A0201; Y84A=**GCC**; A236C=**TGC**  
 AAAGG 接头-加单下划线  
 人 IgG1 Fc; N297A= GCA; AGG 至 **AGA** (仍然 R) 和 AGC 至 **TCC** (仍然 S)-  
 (粗体且加下划线, 其中 GCA 斜体)  
 终止密码子 (TAGTGA)

图23B

具有前导肽的 CUE101-LALA (SEQ ID NO: 71)

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML  
TAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGS  
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSST  
KKTQLQLEALLLDLQMILNGINYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL  
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS  
IISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFV  
RFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGAYNQSEAGSHT  
VQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAE  
QLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT  
LTWQRDGEDQTDTELVETRPCGDGTFQKWAAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW  
EAAAGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK  
ENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK  
TISKAKGQPREPQVTLPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

前导肽 - 斜体

IL-2 (H16A/F42A)-粗体(其中H16和F42加下划线)  
 (G4S)4 接头-加单下划线  
 MHC H 链 Y84A; A236C-加双下划线(其中Y84A和A236C呈粗体)  
 AAAGG 接头-加单下划线  
 人 IgG1 Fc; L234A; L235A - (粗体且加下划线, 其中L234A和L235A未加粗)

图24

无前导肽的CUE101-LALA (SEQ ID NO:72)

APTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML  
TAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE  
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGGSAPTSSST  
KKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLE  
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI  
IISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFV  
RFSDAASORMEPPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGAYNOSEAGSHT  
VQRMYGCDVGSDWRFLRGYHOYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAE  
QLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLORTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT  
LTWORDGEDOTQDTELVETRPCGDGTFOKWAAVVVPSGQEQRYTCHVOHEGLPKPLTLRW  
AAAAGGDKTHTCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK  
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**IL-2 (H16A/F42A) -粗体(其中H16和F42加下划线)**

**(G4S)4 接头 -加单下划线**

**MHC H链 Y84A; A236C- 加双下划线(其中Y84A和A236C呈粗体)**

**AAAGG 接头 - 加单下划线**

**人 IgG1 Fc; L234A; L235A - (粗体且加下划线, 其中L234A和L235A未加粗)**

图25

(SEQ ID NO:73)

CUE101-LALA: 编码具有前导肽的CUE101-LALA的核苷酸序列

ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACCTTGTACAAAACAGTGCACCTACTTC  
 AAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGGCAATTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATG  
 GAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACCTACCAGGATGCTCACAAGGTTTTACATGCCCAAGAAG  
 GCCACAGAAGTGAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGTAAATTT  
 AGCTCAAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGA  
 ACTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCT  
 TGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGG  
 GAGTTCTGGTGGTGGGGGATCTGGAGGCGGAGGATCTGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACA  
 CAGCTACAACCTGGAGGCAATTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAAT  
 CCCAAACTACCAGGATGCTCACAAGGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAAGTGAACATCTT  
 CAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTCA  
 CTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAAGTAAAGGGATCTGAAACAA  
 CATTTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTT  
 GTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGAGTTCTGGTGGTGGGGGA  
 TCTGGAGGCGGAGGATCTGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTCACATCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCG  
 GGGAGCCCCGCTTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTGACAGCGACGCCG  
 CGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGTCCGGAGTATTGGGACGGGGA  
 GACACGGAAAAGTGAAGGCCCACTCACAGACTCACCGAGTGGACCTGGGGACCCTGCGCGGCCCTACA  
 ACCAGAGCGAGGCGGTTCTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGCTGCGACGTGGGGTTCGGACTGGCGC  
 TTCTCCGCGGGTACCACCAGTACGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACTGCGCT  
 CTTGGACCGCGGCGGACATGGCAGCTCAGACCACCAAGCACAAGTGGGAGGCGGCCCATGTGGCGGAG  
 CAGTTGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGA  
 GACGCTGCAGCGCACGGACGCCCCAAAACGCATATGACTCACCACGCTGTCTTGACCATGAAGCCACC  
 CTGAGGTGCTGGGCCCTGAGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGA  
 CCAGACCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCCCTTGGCGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCGG  
 CTGTGGTGGTGCCTTCTGGACAGGAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTTTGCCCAAGC  
 CCCTCACCTGAGATGGGAGGCAGCTGCGGGTGGCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCA  
 CCTGAAAGGGGGACCCTCAGTCTTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCC  
 GGACCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG  
 GTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACACAGCAC  
 GTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA  
 AGGTCTCAAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA  
 GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG  
 CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC  
 AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGG  
 ACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCAC  
 TACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAGTGA

图26A

人 IL2 前导序列-斜体  
 人 IL2; H16A=GCA; F42A=GCA -粗体(其中GCA 加下划线)  
 (G4S)4 接头-加单下划线  
 人 A0201; Y84A=**GCC**; A236C=**TGC** -加双下划线(其中GCC和TGC呈粗体)  
 AAAGG 接头-加单下划线  
 人 IgG1 Fc; L234A, L235A = GCCGCC  
 N297= AAC; AGG 至 **AGA** (仍然R)和 AGC 至 **TCC** (仍然S) - (粗体且加下划线,  
 其中GCCGCC 斜体)  
 终止密码子(TAGTGA)

图26B

(SEQ ID NO:74)

**具有前导肽的CUE101-TM**

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML  
TAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE  
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSSAPTSSST  
KKTQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE  
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQ  
SIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFV  
RFSDAASORMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLRGAYNQSEAGSHT  
VORMYGCDVGSDWRFLRGYHOYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTKHKWEAAHVAE  
QLRAYLEGTCVEWLRRLYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT  
LTWQRDGEDQTQDTELVETREPCGDGTFQKWAAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRW  
EAAAGGDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSNKALPASIEK  
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**前导肽-斜体**

IL-2 (H16A/F42A) -粗体(其中H16和F42加下划线)  
 (G4S)4 接头-加单下划线  
 MHC H链 Y84A; A236C-加双下划线(其中Y84A和A236C呈粗体)  
 AAAGG 接头-加单下划线  
 人 IgG1 Fc; L234F; L235E; P331S - (粗体且加下划线, 其中L234F、L235E和P331S未加粗)

图27

无前导肽的CUE101-TM (SEQ ID NO:75)

APTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML  
TAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE  
TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGGSAPTSSST  
KKTQLQLEALLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE  
EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS  
IISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGSSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFV  
RFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGAYNQSEAGSHT  
VORMYGCDVGSDWRFLRGYHOYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKKHWEAAHVAE  
QLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLORTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEIT  
LTWORDGEDOTODELVETRPCGDGTFOKWAAVVVPSGOEORYTCHVOEGLPKPLTLRW  
AAAGG DKTHTCPPCPAPEPEGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKFREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK  
TISKAKGQPREPOVYTLPPSREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKT  
PFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IL-2 (H16A/F42A) - 粗体 (其中H16和F42加下划线)

(G4S)4 接头 - 加单下划线

MHC H链 Y84A; A236C - 加双下划线 (其中Y84A 和 A236C 呈粗体)

AAAGG 接头 - 加单下划线

人IgG1 Fc; L234F; L235E; P331S - (粗体且加下划线, 其中L234F、L235E和P331S未加粗)

图28



(SEQ ID NO:76)

CUE101-TM: 编码具有前导肽的CUE101-TM的核苷酸序列

ATGTACAGGATGCAACTCCTGCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTACAAACAGTGCACCTACTTC  
 AAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACCTGGAGGCAATTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATG  
 GAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACCTACCAGGATGCTCACAACAAGTTTTACATGCCAAGAAG  
 GCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTT  
 AGCTCAAAGCAAAAACCTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGA  
 ACTAAAGGGATCTGAAACAACATTATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCT  
 TGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTG  
 GAGGTTCTGGTGGTGGGGGATCTGGAGGCGGAGGATCTGCACCTACTCAAGTTCTACAAAGAAAACA  
 CAGCTACAACCTGGAGGCAATTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAAT  
 CCCAAACTACCAGGATGCTCACAACAAGTTTTACATGCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTT  
 CAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTCA  
 CTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAATAAAGGGATCTGAAACAA  
 CATTATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTT  
 GTCAAAGCATCATCTCAACACTGACTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGAGGTTCTGGTGGTGGGGGA  
 TCTGGAGGCGGAGGATCTGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTCACATCCGTGTCCCGCCCCGGCCGCG  
 GGGAGCCCCGCTTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTTCGTGCGGTTTCGACAGCGACGCCG  
 CGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGTCCGGAGTATTGGGACGGGGGA  
 GACACGGAAAAGTGAAGGCCCACTCACAGACTACCGAGTGGACCTGGGGACCTGCGCGGCCCTACA  
 ACCAGAGCGAGGCCGTTCTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGCTGCGACGTGGGGTCCGACTGGCGC  
 TTCTCCGCGGGTACCACAGTACGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCGCT  
 CTTGGACCGCGGCGGACATGGCAGCTCAGACCACAAGCACAAGTGGGAGGCGGCCCATGTGGCGGAG  
 CAGTTGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGA  
 GACGCTGCAGCGCACGGACGCCCCAAAACGCATATGACTCACCACGCTGTCTCTGACCATGAAGCCACC  
 CTGAGGTGCTGGGCCCTGAGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGA  
 CCAGACCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCCTTGCGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCGG  
 CTGTGGTGGTGCCTTCTGGACAGGAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTTTGCCCAAGC  
 CCTCACCTGAGATGGGAGGCAGCTGCGGGTGGCGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCAGCA  
 CCTGAAATTCGAGGGGGGACCGTCAAGTCTTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCC  
 GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG  
 GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC  
 GTACCGTGTGGTCAAGCTCCTACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA  
 AAGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCAGCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA  
 GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG  
 CCTGGTCAAAGGCTTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC  
 AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG  
 ACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCAC  
 TACACGAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATAGTGA

图29A



人 IL2 前导序列-斜体  
 人 IL2; H16A=GCA; F42A=GCA - 粗体(其中 GCA 加下划线)  
 (G4S)4 接头 - 加单下划线  
 人 A0201; Y84A=GCC; A236C=TGC - 加双下划线(其中 GCC 和 TGC 呈粗体)  
 AAAGG 接头 - 加单下划线  
 人 IgG1 Fc; L234F=TTC; L235E=GAG; P331S=AGC  
 N297= AAC; AGG 至 AGA (仍然 R) 和 AGC 至 TCC (仍然 S) - (粗体且加下划线,  
 其中 TTC、GAG、AAC 和 AGC 斜体)  
 终止密码子 (TAGTGA)

图29B

1274: (SEQ ID NO: 77)  
MSRSVALAVLALLSLSGLEAYMLDLQPETTGGGGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSCHPA  
ENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSEYLLYYTEFTPEK  
DEYACRVNHVTLSPKIVKWRDM

人  $\beta$ 2M 前导序列-斜体  
 E7(11-20) 粗体且加下划线  
 (G4S)3 接头 - 加单下划线  
 人  $\beta$ 2M; R12C - 加双下划线 (R12C 粗体)

图30

无前导肽的 1274 (SEQ ID NO: 78)

YMLDLQPETTGGGGSGGGGSGGGGSIQYMLDLQPETTGGGGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSCH  
PAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSEYLLYYTEFTPEKDEY  
ACRVNHVTLSPKIVKWRDMRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGEPI  
EKVEHSDLSFSKDWSEYLLYYTEFTPEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWRDM

E7(11-20) - 粗体且加下划线 (YMLDLQPETT; SEQ ID NO: 13)  
 (G4S)3 接头 - 加单下划线 (GGGGSGGGGSGGGG; SEQ ID NO: 89)  
 人  $\beta$ 2M; R12C - 加双下划线

图31

(SEQ ID NO:79)

编码具有前导肽的1274的1274核苷酸序列

ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCCTACATGCTCGA  
TTTGCAGCCCCGAAACGACGCGGTGGAGGTGGTTCTGGAGGAGGCGGTTCCGGCGGAGGTGGTAGTATC  
CAGCGTACTCCAAAGATTCAGGTTTACTCATGCCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCAAATTCCTGAATT  
GCTATGTGTCTGGGTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGAAAA  
AGTGGAGCATTGACTTGTCTTTCAGCAAGGACTGGTCTTCTATCTCTTGTATTATACTGAATTCACCCC  
CACTGAAAAAGATGAGTATGCCTGCCGTGTGAACACGCTGACTTTGTCACAGCCCAAGATAGTTAAGTG  
GGATCGAGACATGTAGTGA

人β2M前导序列-斜体

E7(11-20)-粗体且加下划线

(G4S)3接头-加单下划线

人β2M; R12C=TGC-加双下划线 (TGC呈粗体)

终止密码子TAGTGA

图32

WT人IgG1 Fc序列:(SEQ ID NO:80)

DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图33A

人IgG1 Fc突变体:L234F/L235E/P331S(三重突变体“TM”)(SEQ ID NO:81)

DKHTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPSIEKTISKAKGQPREP  
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图33B

人IgG1 Fc突变体:N297A (SEQ ID NO:82)

DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图33C

人IgG1 Fc突变体: L234A/L235A ("LALA") (SEQ ID NO: 83)

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

根据EU索引编号的残基(Kabat编号)

图33D

B2M R12C (SEQ ID NO: 17)

IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSEFYLL  
YYTEFTPTKDEYACRVNHVTLSPKIVKWRDM

图34A

IL-2 (H16A; F42A) (SEQ ID NO: 84)

APTSSSTKKTQLQLEALLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP  
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIS  
TLT

图34B

I类 MHC-H链 A0201 (Y84A; A236C) (SEQ ID NO: 19)

GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPFRFIAVGYVDDTQFVRFSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETR  
KVKAHSQTHRVDLGLTLRGAYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGS DWRFLRGYHQYAYDGKDY IALKEDL  
RSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVS  
DHEATLRCWALSFP AEITLTWQRDGEDQTQDTEL VETRPCGDGTFQKWA AVVVPSGQEQR YTCH  
VQHEGLPKPLTLRWE

图34C

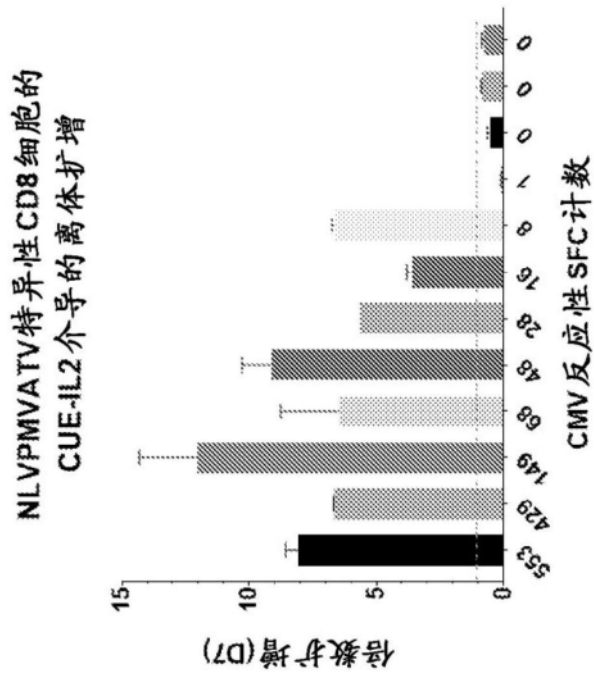


图35

氨基酸	Syntac 编号	表达水平 (mg/L)	Octet 的受体结合 (KD, 以 nM 计)			细胞结合的 EC50, nM		pSTAT5 的 EC50, nM		
			$\alpha\beta$	$\beta\gamma$	$\beta$	LCMV	Black6	LCMV	Black6	B6/LCMV
H	982	77	14.9			0.25	>100	5.019	57.05	11
A	986	89	16.5			0.22	>100	20.09	543.8	27
R	1284	81	ND			0.29	>100	>1000	>1000	ND
N	1285	50	9.0			0.48	>100	35.19	1041	30
D	1286	31	12.3			0.28	>100	0.6365	15.71	25
C	1287	37	7.6			0.50	>100	59.98	1152	19
Q	1288	66	13.8			0.23	>100	21.64	530.1	24
E	1289	66	12.7			0.31	>100	3.899	117.2	30
G	1290									
I	1291	61	8.4			0.31	>100	>1000	>1000	ND
L	1292	50	12.5			0.36	>100	>1000	>1000	ND
K	1293	74	ND			0.27	>100	>1000	>1000	ND
M	1294	81	19.2			0.41	>100	34.88	674.5	19
F	1295	32	19.6			0.46	>100	4.864	69.1	14
P	1296	2								
S	1297	77	21.2			0.28	>100	14.42	113.4	8
T	1298	123	29.5			0.31	>100	29.66	>1000	>34
W	1299	24	18.6			0.59	>100	70.95	>1000	>14
Y	1300	31	29.4			0.49	>100	16.82	188	11
V	1301	87	7.8			0.28	>100	230.4	>1000	>4

图36

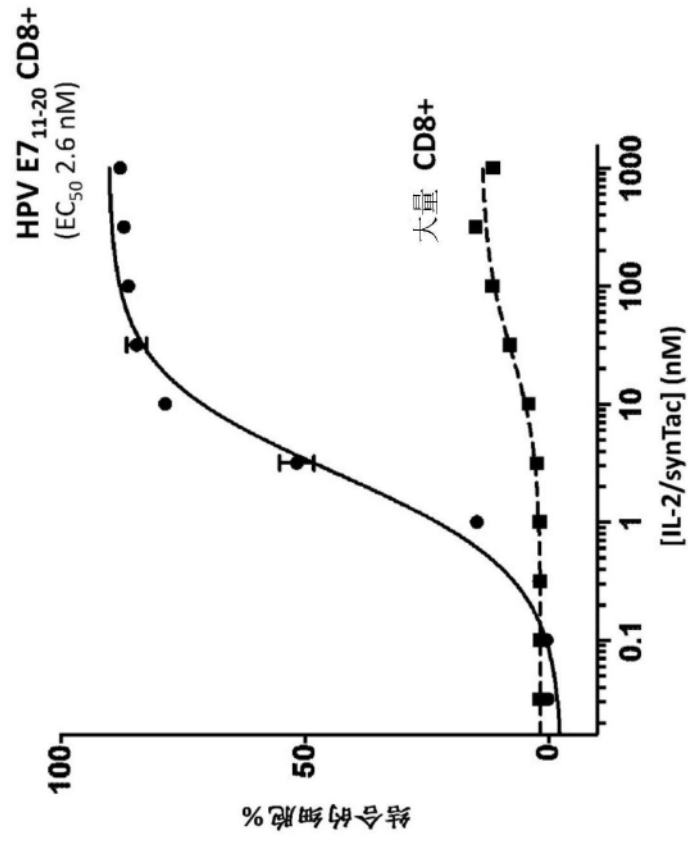


图37

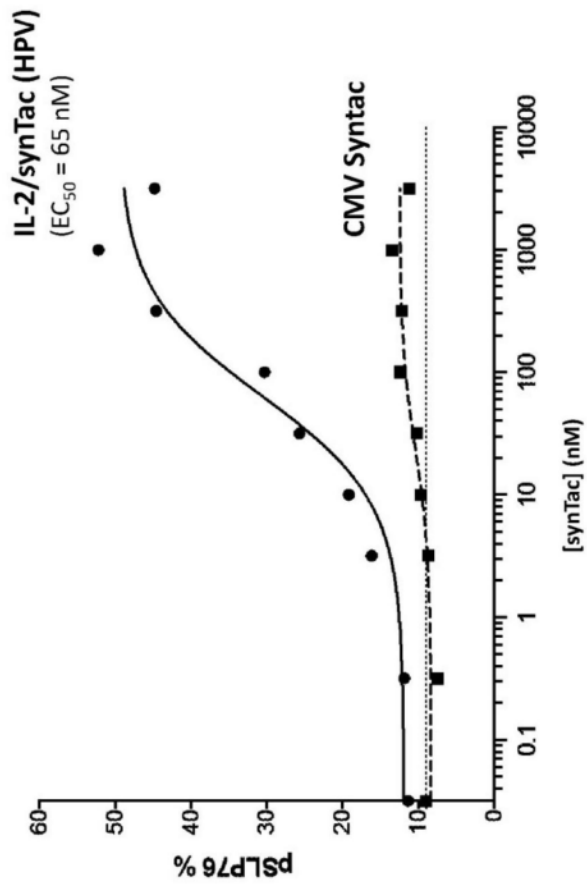
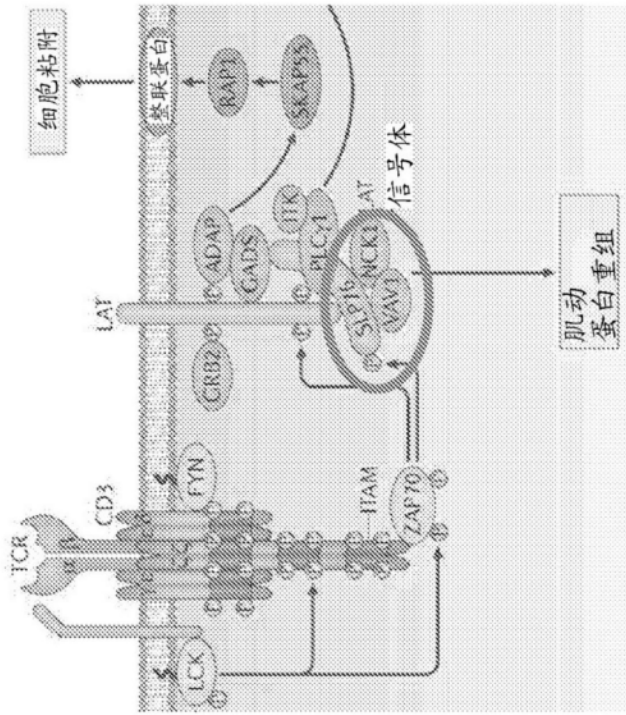


图38

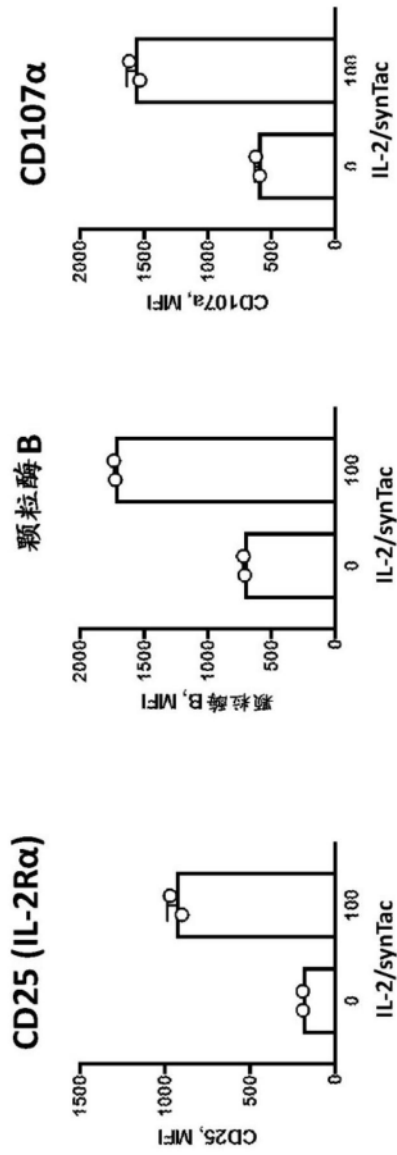


图39



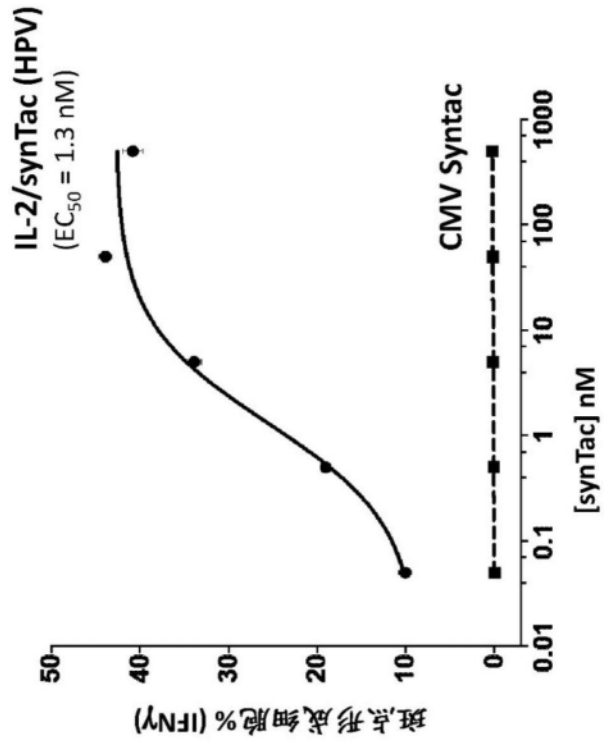


图40