



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114555128 A

(43) 申请公布日 2022.05.27

(21) 申请号 202080071434.4

M·米拉

(22) 申请日 2020.08.14

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(30) 优先权数据

专利代理师 封新琴

62/887,400 2019.08.15 US

62/903,187 2019.09.20 US

62/962,668 2020.01.17 US

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 47/60 (2017.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/046419 2020.08.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/030706 EN 2021.02.18

(71) 申请人 新索思股份有限公司

地址 美国加利福尼亚

权利要求书6页 说明书227页

(72) 发明人 J·普塔辛 C·E·卡法雷尔

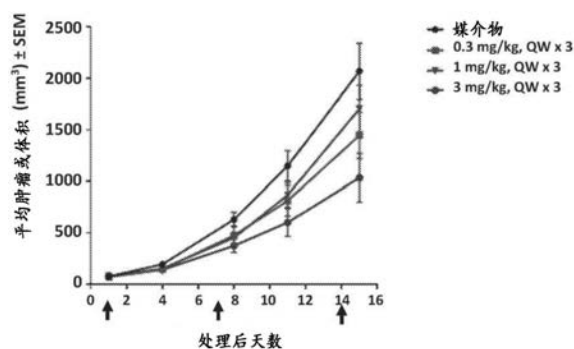
序列表73页 附图33页

(54) 发明名称

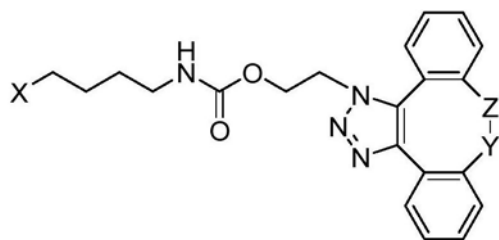
采用IL-2缀合物的免疫肿瘤学组合疗法

(57) 摘要

本文公开了可用于治疗一种或多种适应症、诸如治疗增殖性疾病的包含白介素(IL)缀合物(例如,IL-2缀合物)与其他药剂或方法的组合的组合物、试剂盒和方法。本文还描述了包含一种或多种所述白介素缀合物(例如,IL-2缀合物)的药物组合物和试剂盒。

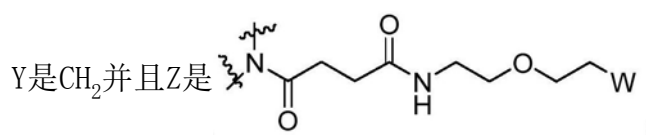
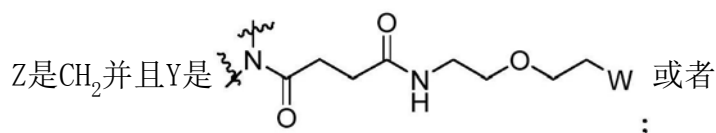
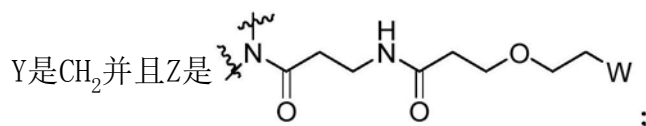
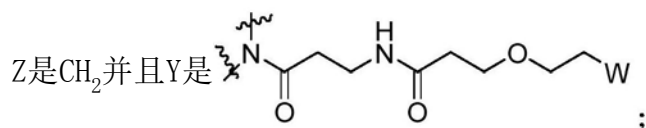


1. 一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2 缀合物和 (b) 一种或多种免疫检查点抑制剂,其中所述 IL-2 缀合物包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列,其中所述 IL-2 缀合物中的至少一个氨基酸残基被式 (I) 的结构替代:



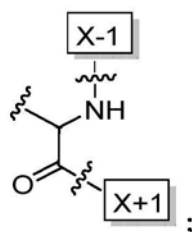
式 (I);

其中:



W 是具有选自 5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa 和 60kDa 的平均分子量的 PEG 基团;

X 具有以下结构:

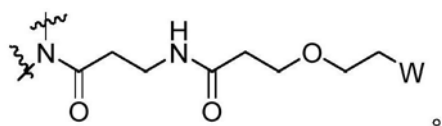


X-1 指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

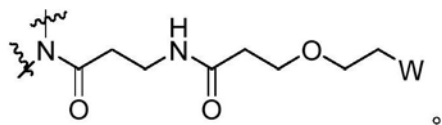
X+1 指示与下一个氨基酸残基的附接点;

其中所述式 (I) 的结构在 SEQ ID NO:3 中的位置选自 K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68 和 L71。

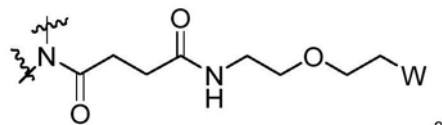
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在所述 IL-2 缀合物中,Z 是 CH_2 并且 Y 是



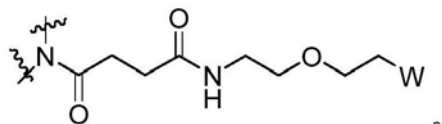
3. 根据权利要求1所述的方法, 其中在所述IL-2缀合物中, Y是CH₂并且Z是



4. 根据权利要求1所述的方法, 其中在所述IL-2缀合物中, Z是CH₂并且Y是



5. 根据权利要求1所述的方法, 其中在所述IL-2缀合物中, Y是CH₂并且Z是

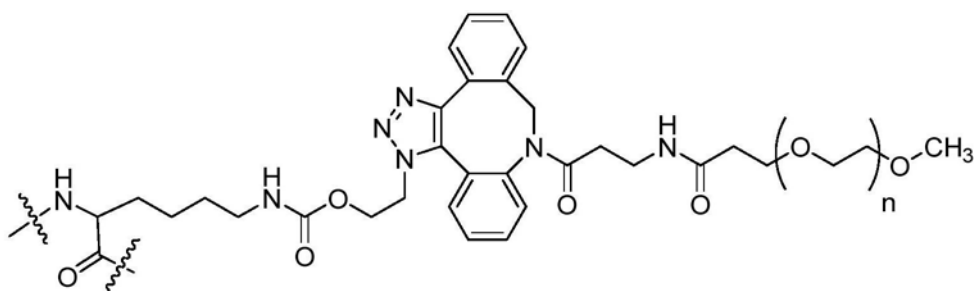


6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法, 其中在所述IL-2缀合物中, 所述PEG基团具有25kDa、30kDa或35kDa的平均分子量。

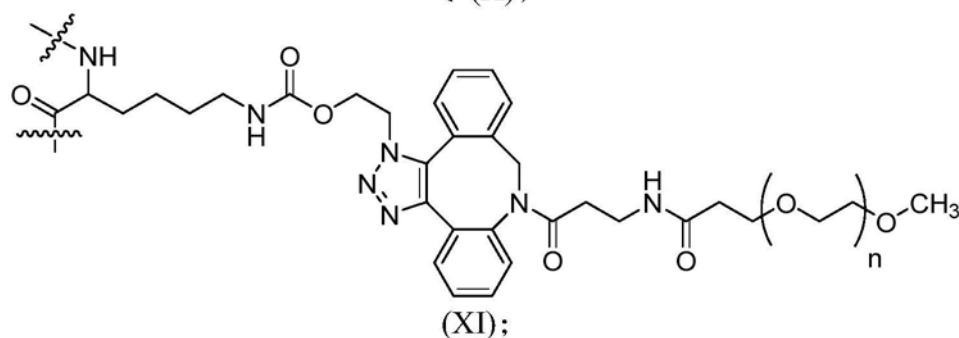
7. 根据权利要求6所述的方法, 其中在所述IL-2缀合物中, 所述PEG基团具有30kDa的平均分子量。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法, 其中在所述IL-2缀合物中, 所述式(I)的结构在SEQ ID NO:3中的位置是P64。

9. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述式(I)的结构具有式(X)或式(XI)的结构, 或者是式(X)和式(XI)的混合物:



式 (X);



(XI);

其中:

n是在从约2至约5000范围内的整数; 并且

波浪线指示与SEQ ID NO:3内未被替代的氨基酸残基的共价键。

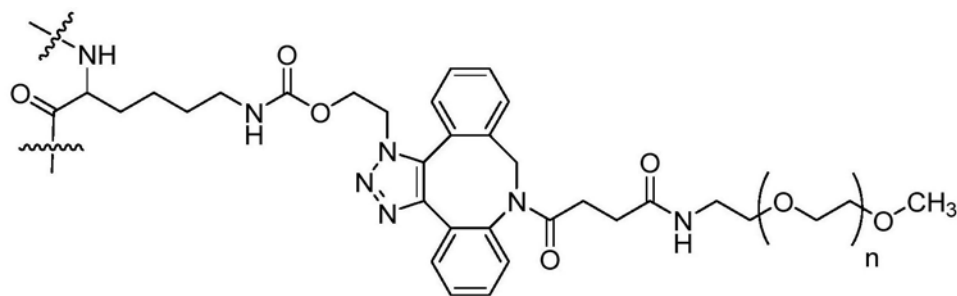
10. 根据权利要求9所述的方法, 其中在所述IL-2缀合物中, 所述式(X)或式(XI)的结构

在SEQ ID NO:3中的位置是P64。

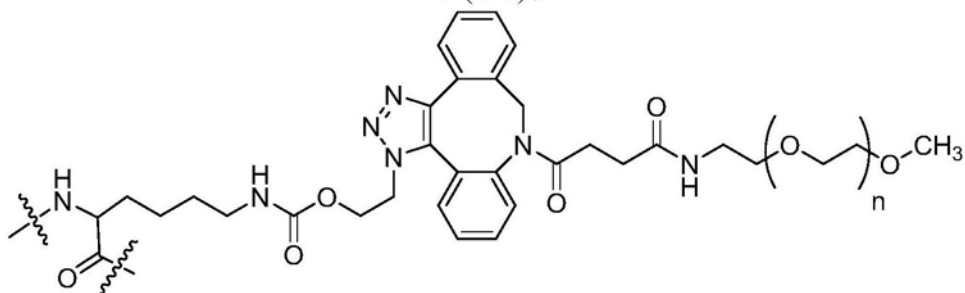
11. 根据权利要求9或10所述的方法, 其中在所述IL-2缀合物中, n 是使得 $-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ 具有约25kDa、30kDa或35kDa的分子量的整数。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中在所述IL-2缀合物中, n 是使得 $-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ 具有约30kDa的分子量的整数。

13. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述式(I)的结构具有式(XII)或式(XIII)的结构, 或者是式(XII)和式(XIII)的混合物:



式 (XII);



(XIII);

其中:

n 是在从约2至约5000范围内的整数; 并且

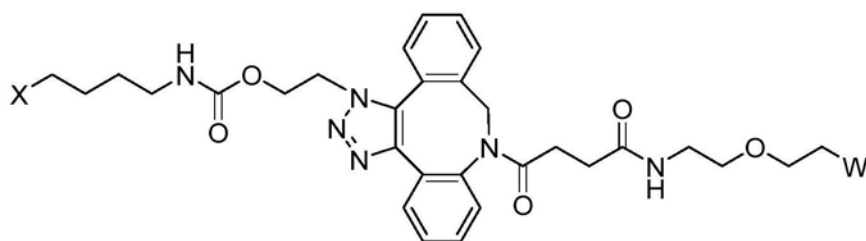
波浪线指示与SEQ ID NO:3内未被替代的氨基酸残基的共价键。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中在所述IL-2缀合物中, 所述式(XII)或式(XIII)的结构在SEQ ID NO:3中的位置是P64。

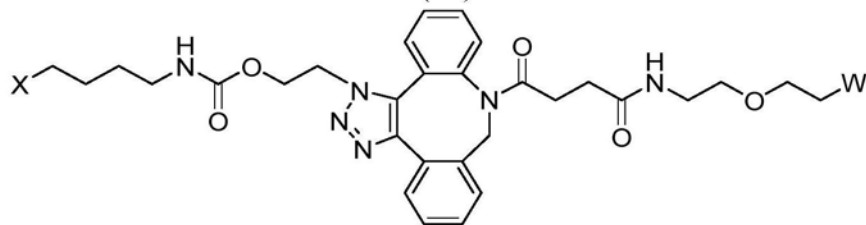
15. 根据权利要求13或14所述的方法, 其中在所述IL-2缀合物中, n 是使得 $-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ 具有约25kDa、30kDa或35kDa的分子量的整数。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中在所述IL-2缀合物中, n 是使得 $-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ 具有约30kDa的分子量的整数。

17. 一种治疗有需要的受试者的癌症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种免疫检查点抑制剂, 其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列, 其中[AzK_L1_PEG30kD]具有式(IV)或式(V)的结构, 或者是式(IV)和式(V)的结构的混合物:



式 (IV);

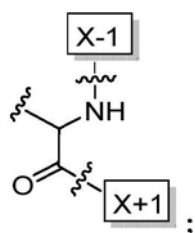


式 (V);

其中：

W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团；

X具有以下结构:



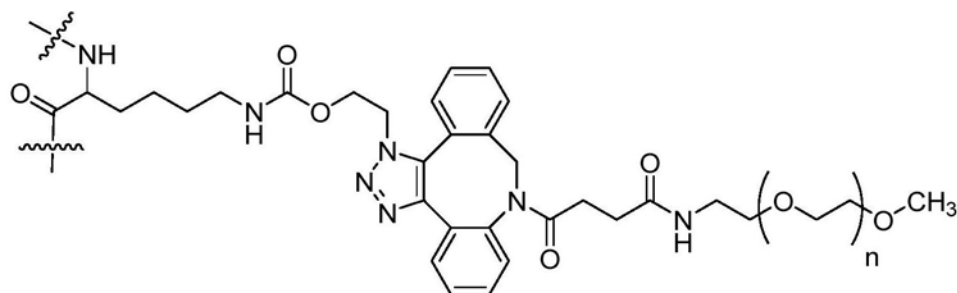
X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

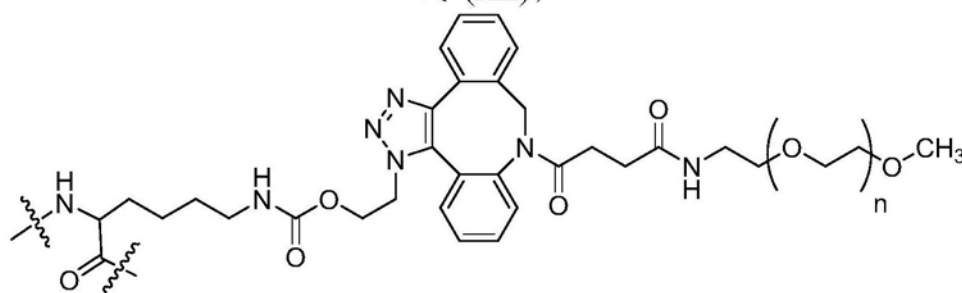
18. 根据权利要求17所述的方法, 其中W是具有选自25kDa、30kDa或35kDa的平均分子量的PEG基团。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

20. 一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2 缀合物和 (b) 一种或多种免疫检查点抑制剂,其中所述 IL-2 缀合物包含 SEQ ID NO:50 的氨基酸序列,其中 [AzK_L1_PEG30kD] 具有式 (XII) 或式 (XIII) 的结构,或者是式 (XII) 和式 (XIII) 的结构的混合物:



式 (XII);



(XIII);

其中:

n 是使得 $-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ 具有约30kDa的分子量的整数;并且

波浪线指示与SEQ ID NO:50内未被替代的氨基酸残基的共价键。

21. 根据权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点抑制剂是一种或多种PD-1抑制剂。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗和西米普利单抗。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗。

24. 根据权利要求22所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是纳武单抗。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述癌症选自肾细胞癌(RCC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、经典型霍奇金淋巴瘤(cHL)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、尿路上皮癌、微卫星不稳定癌、微卫星稳定癌、胃癌、结肠癌、结直肠癌(CRC)、宫颈癌、肝细胞癌(HCC)、梅克尔细胞癌(MCC)、黑色素瘤、小细胞肺癌(SCLC)、食管癌、食管鳞状细胞癌(ESCC)、胶质母细胞瘤、间皮瘤、乳腺癌、三阴性乳腺癌、前列腺癌、去势抵抗性前列腺癌、转移性去势抵抗性前列腺癌、或具有DNA损伤反应(DDR)缺陷的转移性去势抵抗性前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、中度至低度突变负担的肿瘤、皮肤鳞状细胞癌(CSCC)、鳞状细胞皮肤癌(SCSC)、低表达至不表达PD-L1的肿瘤、超出其原发解剖学起源部位的全身性播散至肝脏和CNS的肿瘤以及弥漫性大B细胞淋巴瘤。

26. 根据权利要求1-25中任一项所述的方法,其中将所述IL-2缀合物施用至所述受试者,每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次、每七周一次或每八周一次。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的方法,其中通过静脉内施用将所述IL-2缀合物施用至受试者。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的方法,其中所述IL-2缀合物是药学上可接受的

盐、溶剂化物或水合物。

采用IL-2缀合物的免疫肿瘤学组合疗法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2019年8月15日提交的美国临时申请号62/887,400、2019年9月20日提交的美国临时申请号62/903,187和2020年1月17日提交的美国临时申请号62/962,668的优先权,将其中的每一个的公开内容通过引用以其整体特此并入。

序列表

[0002] 本申请含有已经以ASCII格式电子提交并且通过引用以其整体特此并入的序列表。创建于2020年8月12日的所述ASCII副本被命名为2020-08-12_01183-0073-00PCT_seq_listing.txt,并且大小为128,000字节。

背景技术

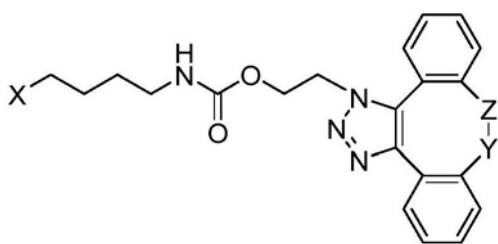
[0003] 不同的T细胞群调节免疫系统以维持免疫稳态和耐受性。例如,调节性T(Treg)细胞通过防止病理性自身反应性来防止免疫系统的不适当反应,而细胞毒性T细胞靶向并破坏受感染的细胞和/或癌细胞。在一些情形下,不同T细胞群的调节为疾病或适应症的治疗提供了选择。在一些情形下,这得益于在组合疗法中存在另外的药剂或方法。

[0004] 因此,在一个方面,本文提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用IL-2缀合物与一种或多种免疫检查点抑制剂的组合。

发明内容

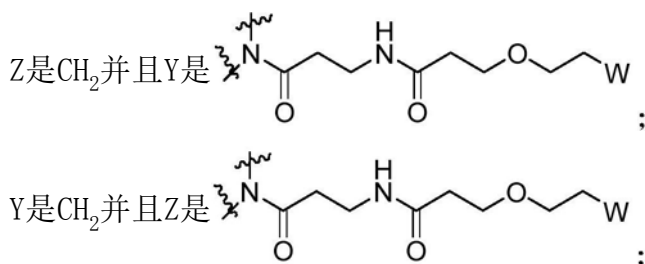
[0005] 在某些实施方案中,本文描述了用于治疗癌症的方法。包括以下实施方案。

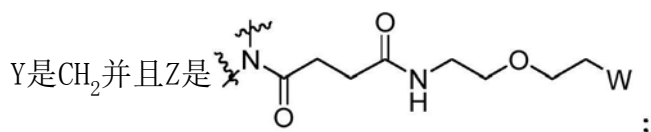
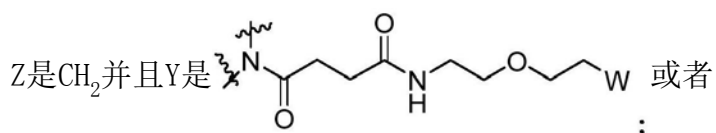
[0006] 实施方案A1是一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b) 一种或多种免疫检查点抑制剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(I)的结构替代:



式 (I);

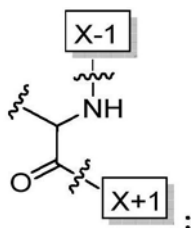
其中:





W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团；

X具有以下结构：

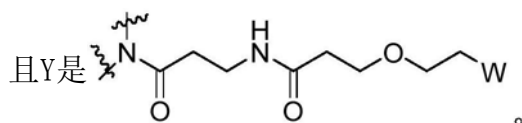


X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点；并且

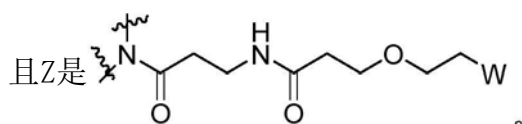
X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点；

其中所述式(I)的结构在SEQ ID NO:3中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71。

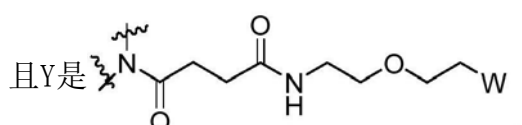
[0007] 实施方案A2是根据实施方案A1所述的方法，其中在所述IL-2缀合物中，Z是CH₂并



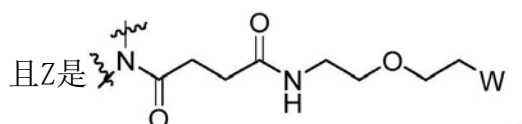
[0008] 实施方案A3是根据实施方案A1所述的方法，其中在所述IL-2缀合物中，Y是CH₂并



[0009] 实施方案A4是根据实施方案A1所述的方法，其中在所述IL-2缀合物中，Z是CH₂并



[0010] 实施方案A5是根据实施方案A1所述的方法，其中在所述IL-2缀合物中，Y是CH₂并



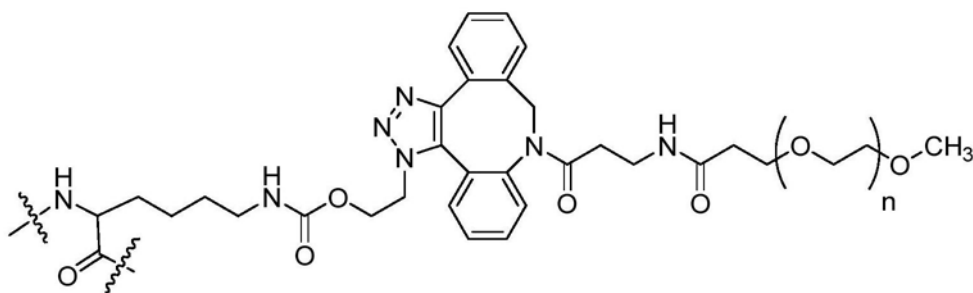
[0011] 实施方案A6是根据实施方案A1-A5中任一项所述的方法，其中在所述IL-2缀合物中，所述PEG基团具有25kDa、30kDa或35kDa的平均分子量。

[0012] 实施方案A7是根据实施方案A6所述的方法，其中在所述IL-2缀合物中，所述PEG基团具有30kDa的平均分子量。

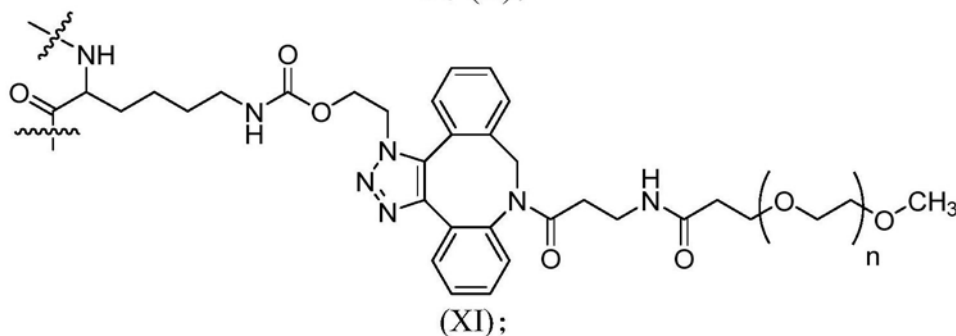
[0013] 实施方案A8是根据实施方案A1-A7中任一项所述的方法，其中在所述IL-2缀合物

中,所述式(I)的结构在SEQ ID NO:3中的位置是P64。

[0014] 实施方案A9是根据实施方案A1所述的方法,其中所述式(I)的结构具有式(X)或式(XI)的结构,或者是式(X)和式(XI)的混合物:



式 (X);



(XI);

其中:

n是在从约2至约5000范围内的整数;并且

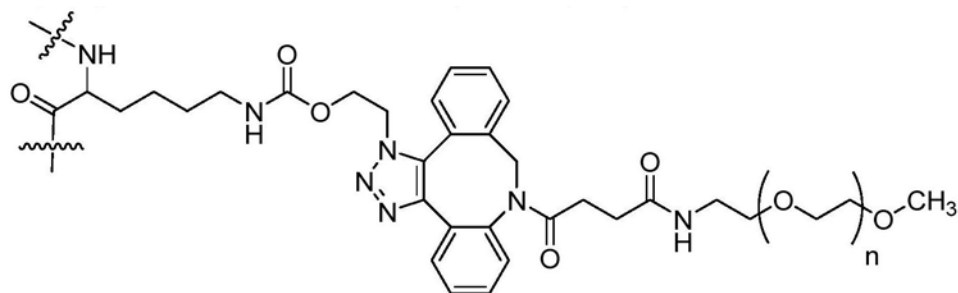
波浪线指示与SEQ ID NO:3内未被替代的氨基酸残基的共价键。

[0015] 实施方案A10是根据实施方案A9所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中,所述式(X)或式(XI)的结构在SEQ ID NO:3中的位置是P64。

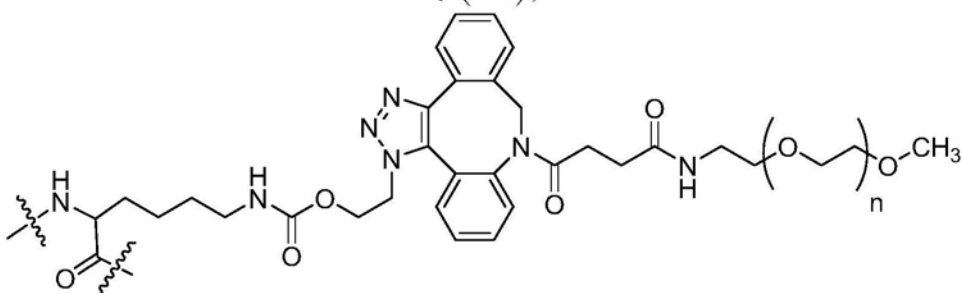
[0016] 实施方案A11是根据实施方案A9或A10所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中,n是使得-(OCH₂CH₂)_n-OCH₃具有约25kDa、30kDa或35kDa的分子量的整数。

[0017] 实施方案A12是根据实施方案A11所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中,n是使得-(OCH₂CH₂)_n-OCH₃具有约30kDa的分子量的整数。

[0018] 实施方案A13是根据实施方案A1所述的方法,其中所述式(I)的结构具有式(XII)或式(XIII)的结构,或者是式(XII)和式(XIII)的混合物:



式 (XII);



(XIII);

其中:

n 是在从约2至约5000范围内的整数;并且

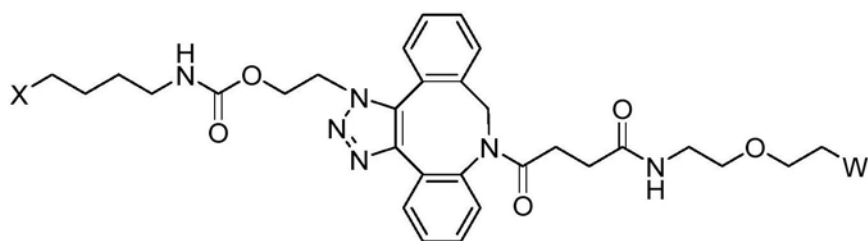
波浪线指示与SEQ ID NO:3内未被替代的氨基酸残基的共价键。

[0019] 实施方案A14是根据实施方案A13所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中,所述式(XII)或式(XIII)的结构在SEQ ID NO:3中的位置是P64。

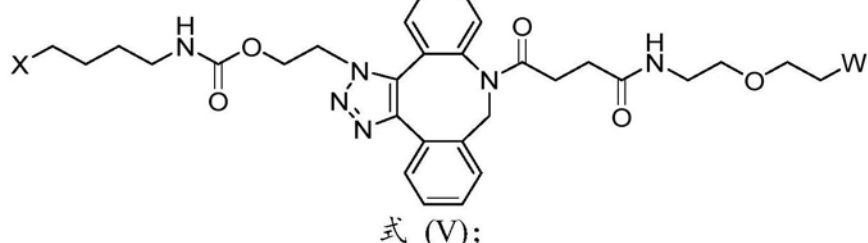
[0020] 实施方案A15是根据实施方案A13或A14所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中, n 是使得 $-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ 具有约25kDa、30kDa或35kDa的分子量的整数。

[0021] 实施方案A16是根据实施方案A15所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中, n 是使得 $-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ 具有约30kDa的分子量的整数。

[0022] 实施方案A17是一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种免疫检查点抑制剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG30kD]具有式(IV)或式(V)的结构,或者是式(IV)和式(V)的结构的混合物:



式 (IV);

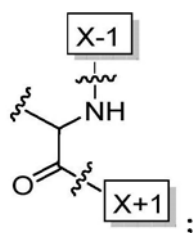


式 (V);

其中:

W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团;

X具有以下结构:



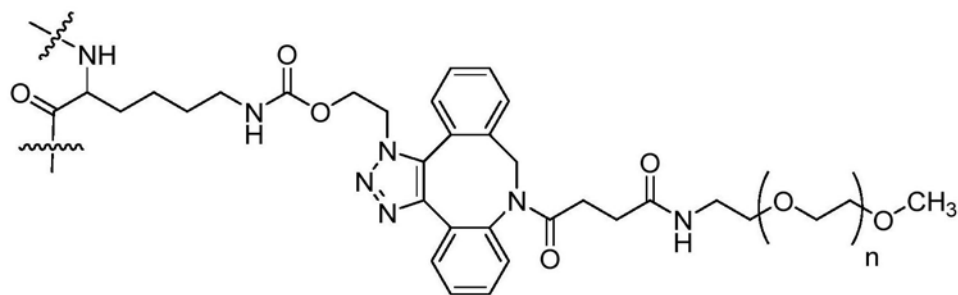
X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

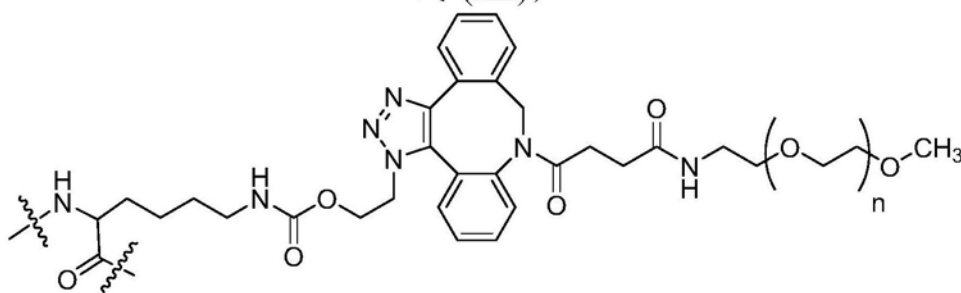
[0023] 实施方案A18是根据实施方案A17所述的方法,其中W是具有选自25kDa、30kDa或35kDa的平均分子量的PEG基团。

[0024] 实施方案A19是根据实施方案A18所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0025] 实施方案A20是一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种免疫检查点抑制剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG30kD]具有式(XII)或式(XIII)的结构,或者是式(XII)和式(XIII)的结构的混合物:



式 (XII);



(XIII);

其中:

n 是使得 $-(OCH_2CH_2)_n-OCH_3$ 具有约30kDa的分子量的整数;并且

波浪线指示与SEQ ID NO:50内未被替代的氨基酸残基的共价键。

[0026] 实施方案A21是根据实施方案A1-A20中任一项所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点抑制剂是一种或多种PD-1抑制剂。

[0027] 实施方案A22是根据实施方案A21所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂选自派姆单抗 (pembrolizumab)、纳武单抗 (nivolumab) 和西米普利单抗 (cemiplimab)。

[0028] 实施方案A23是根据实施方案A22所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗。

[0029] 实施方案A24是根据实施方案A22所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是纳武单抗。

[0030] 实施方案A25是根据实施方案A1-A24中任一项所述的方法,其中所述癌症选自肾细胞癌 (RCC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC)、经典型霍奇金淋巴瘤 (cHL)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤 (PMBCL)、尿路上皮癌、微卫星不稳定癌、微卫星稳定癌、胃癌、结肠癌、结直肠癌 (CRC)、宫颈癌、肝细胞癌 (HCC)、梅克尔细胞癌 (MCC)、黑色素瘤、小细胞肺癌 (SCLC)、食管癌、食管鳞状细胞癌 (ESCC)、胶质母细胞瘤、间皮瘤、乳腺癌、三阴性乳腺癌、前列腺癌、去势抵抗性前列腺癌、转移性去势抵抗性前列腺癌、或具有DNA损伤反应 (DDR) 缺陷的转移性去势抵抗性前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、中度至低度突变负担的肿瘤、皮肤鳞状细胞癌 (CSCC)、鳞状细胞皮肤癌 (SCSC)、低表达至不表达PD-L1的肿瘤、超出其原发解剖学起源部位的全身性播散至肝脏和CNS的肿瘤以及弥漫性大B细胞淋巴瘤。

[0031] 实施方案A26是根据实施方案A1-A25中任一项所述的方法,其中将所述IL-2缀合物施用至所述受试者,每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次、每七周一次或每八周一次。

[0032] 实施方案A27是根据实施方案A1-A26中任一项所述的方法,其中通过静脉内施用

将所述IL-2缀合物施用至受试者。

[0033] 实施方案A28是根据实施方案A1-A27中任一项所述的方法,其中所述IL-2缀合物是药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

附图说明

[0034] 将通过参考阐述了利用本发明原理的说明性实施方案的以下具体实施方式和附图获得对本发明的特征和优点的更好的理解,在所述附图中:

[0035] 图1示出了来自实施例11中的研究1的按QWx3方案IV给药的化合物A的抗肿瘤活性图。黑色箭头表示给药化合物A的天数。

[0036] 图2示出了来自实施例11中的研究1的在按QWx3方案IV给药的化合物A的情况下的肿瘤体积图。

[0037] 图3示出了来自实施例11中的研究1的以QWx3给药化合物A处理的每只动物的处理后第15天的肿瘤体积。黑色箭头表示给药化合物A的天数。

[0038] 图4示出了来自实施例11中的研究1的以Q2Wx2给药化合物A的每只动物的处理后第15天的肿瘤体积。

[0039] 图5示出了来自实施例11的研究2的来自用媒介物、作为单一药剂的6mg/kg化合物A、作为单一药剂的抗PD-1抗体以及6mg/kg化合物A和抗PD-1抗体的组合处理小鼠的平均肿瘤生长曲线。黑色箭头表示给药化合物A的天数。

[0040] 图6示出了来自实施例11的研究2的与用媒介物、单独的化合物A或单独的抗PD-1抗体处理的组相比在用化合物A和抗PD-1抗体的组合处理的组中处理后第15天的%TGI数据图。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, 并且 $***p<0.01$; 相比于媒介物对照。 $^{\dagger}p<0.05$, 相比于抗PD-1抗体。 $\#p<0.05$, 相比于化合物A。数据表示平均肿瘤体积 $\pm$ SEM (14只小鼠/组)。

[0041] 图7示出了来自实施例11的研究2的处理组的卡普兰-迈耶存活曲线图。 $*p<0.05$, 相比于媒介物对照。 $^{\dagger}p<0.05$, 相比于抗PD-1抗体。 $\#p<0.05$, 相比于化合物A。

[0042] 图8表示在实施例11的研究3中当化合物A以1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg和9mg/kg作为单一药剂给药时的平均肿瘤生长曲线。数据表示平均肿瘤体积 $\pm$ SEM (14只小鼠/组;除了9mg/kg化合物A为12只小鼠/组)。黑色箭头表示化合物A给药的天数。

[0043] 图9表示来自实施例11的研究3的处理后第15天的个体肿瘤体积。数据表示个体肿瘤体积;还示出了与媒介物对照相比的平均值 $\pm$ SEM和%TGI。 $***p<0.01$, 相比于媒介物对照。

[0044] 图10示出了用媒介物(对照)、单独的抗PD-1抗体、单独的化合物A以及化合物A和抗PD-1抗体的组合处理的处理组的卡普兰-迈耶存活曲线图。 $*p<0.05$, 相比于来自实施例11的研究3的媒介物对照。 $^{\dagger}p<0.05$, 相比于抗PD-1抗体。 $\#p<0.05$, 相比于化合物A。

[0045] 图11A和图11B示出了实施例12的单一供体的单独的IL-2和IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1以及与纳武单抗(Nivo)或派姆单抗(Pem)的组合的代表性细胞因子水平图。图11A示出了IFN- γ 、IL-8、IL-6、TNF- α 、IL-4和IL-5水平图。图11B示出了IL-6、TNF- α 和IL-5水平图。

[0046] 图12示出了根据实施例13的化合物B(IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1)和派姆单抗的组合的混合淋巴细胞反应(MLR)测定中干扰素- γ 的释放。

[0047] 图13和图14示出了根据实施例13的化合物B(IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1)和纳武单抗的组合的混合淋巴细胞反应(MLR)测定中干扰素- γ 的释放。

[0048] 图15示出了来自实施例14的化合物B的药代动力学特性。

[0049] 图16A-图16D分别示出了根据实施例14的在施用化合物B后外周血CD8⁺ T细胞、CD8⁺记忆T细胞、NK细胞和Treg细胞中pSTAT5⁺细胞的量。

[0050] 图17A-图17G示出了根据实施例14的化合物B对CD8⁺ T、NK和Treg细胞群中的Ki67的激活。

[0051] 图18A-图18D示出了根据实施例14的在用化合物B处理之后肿瘤样品的分析(CD8⁺ T细胞、NK细胞和Treg细胞水平以及CD8⁺/Treg比)。

[0052] 图19示出了根据实施例15的在用化合物B和小鼠抗PD-1抗体处理后的TCR多样性。

[0053] 图20示出了根据实施例15的在所指示处理(例如,化合物B和/或小鼠抗PD-1抗体)后的TIL克隆性与T细胞分数的关系。

[0054] 图21示出了根据实施例15的与媒介物对照相比在用化合物B处理后的T细胞克隆性。

[0055] 图22示出了来自实施例16的来自用对照(媒介物)、化合物B(6mg/kg)、小鼠抗PD-1(10mg/kg)或化合物B和小鼠抗PD-1的组合处理后第8天CT26肿瘤样品的表达热图(每组N=10只小鼠)。

[0056] 图23A-图23C示出了根据实施例16的在化合物B处理后肿瘤微环境状态的关键表达报告物:激活的CD8⁺效应和效应记忆T细胞以及细胞溶解性NK细胞的浸润分析。CTL=对照(媒介物);Cmpd B=化合物B;aPD1=小鼠抗PD-1抗体;Cmpd B aPD1=化合物B和小鼠抗PD-1抗体的组合。

[0057] 图24A-图24B示出了根据实施例16的响应于疗法的干扰素 γ 基因表达标签水平的分析器(profiler)分析。CTL=对照(媒介物);Cmpd B=化合物B;aPD1=小鼠抗PD-1抗体;Cmpd B aPD1=化合物B和小鼠抗PD-1抗体的组合。

[0058] 图25和图26示出了根据实施例17的再激发的无肿瘤动物的存活和肿瘤生长评估。

[0059] 图27A和图27B表明,根据实施例17,化合物B在再激发的小鼠中促进外周血记忆T细胞(CD3⁺) (包括记忆CD8⁺ T细胞)的总体增加。

具体实施方式

[0060] 应理解,上文的发明内容和下文的具体实施方式仅是示例性和解释性的,并且对所要求保护的任何主题均无限制性。在通过引用并入本文的任何材料与本公开文本的明确内容不一致的情况下,以明确内容为准。

定义

[0061] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与所要求保护的主体所属领域的技术人员通常所理解的相同的含义。在本申请中,除非另外明确陈述,否则单数的使用包括复数。必须指出,如在说明书和所附权利要求中所用,除非上下文另外清楚地规定,否则单数形式“一种/一个(a)”、“一种/一个(an)”和“所述(the)”包括复数指示物。在本申请中,除非另外陈述,否则“或”的使用意指“和/或”。此外,术语“包括(including)”以及其他形式如“包括(include)”、“包括(includes)”和“包括(included)”的使用是非限制性

的。

[0062] 在说明书中对“一些实施方案”、“一个实施方案(an embodiment)”、“一个实施方案(one embodiment)”或“其他实施方案”的提及意指结合实施方案描述的特定特征、结构或特性包括在本发明的至少一些实施方案中,但是不一定包括在本发明的所有实施方案中。

[0063] 如本文所用,范围和量可以表示为“约”特定值或范围。约也包括确切的量。因此,“约5 μ L”意指“约5 μ L”以及“5 μ L”。通常,术语“约”包括将预期在实验误差内(例如像在15%、10%、或5%内)的量。

[0064] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,而不应被解释为限制所描述的主题。

[0065] 除非上下文另外清楚地规定,否则术语“或”在包含性意义上使用,等同于“和/或”。

[0066] 如本文所用,术语“一个或多个个体”、“一名或多名受试者”和“一名或多名患者”意指任何哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人。在一些实施方案中,哺乳动物是非人。所述术语都不要求或不限于以卫生保健工作者(例如医生、注册护士、执业护士、医师助理、护理员或临终关怀工作者)进行监督(例如持续或间断)为特征的情况。

[0067] 如本文所用,关于结合亲和力的术语“显著的”或“显著地”意指细胞因子(例如,IL-2多肽)的结合亲和力的足以影响细胞因子(例如,IL-2多肽)与靶受体的结合的变化。在一些情形下,所述术语是指至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更大的变化。在一些情形下,所述术语意指至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、50倍、100倍、500倍、1000倍或更大的变化。

[0068] 在一些情形下,关于经由细胞因子信号传导复合物激活一种或多种细胞群的术语“显著的”或“显著地”意指足以激活细胞群的变化。在一些情况下,将激活细胞群的变化测量为受体信号传导效力。在此类情况下,可以提供EC50值。在其他情况下,可以提供ED50值。在另外的情况下,可以提供细胞因子的浓度或剂量。

[0069] 如本文所用,术语“效力”是指产生靶效应所需的细胞因子(例如,IL-2多肽)量。在一些情形下,术语“效力”是指激活靶细胞因子受体(例如,IL-2受体)所需的细胞因子(例如,IL-2多肽)量。在其他情形下,术语“效力”是指激活靶细胞群所需的细胞因子(例如,IL-2多肽)量。在一些情况下,将效力测量为ED50(有效剂量50)或产生50%最大效应所需的剂量。在其他情况下,将效力测量为EC50(有效浓度50)或在50%群体中产生靶效应所需的剂量。

[0070] 如本文所用,术语“非天然氨基酸”是指不同于20种天然存在的氨基酸之一的氨基酸。示例性非天然氨基酸描述于Young等人,“Beyond the canonical 20 amino acids: expanding the genetic lexicon,”J.of Biological Chemistry 285(15):11039-11044 (2010)中,将其公开内容通过引用并入本文。

[0071] 本文的术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并且包括多种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和只要展现出所需的抗原结合活性的抗体片段。“抗体片段”是指不同于完整抗体的分子,其包含完整抗体的结合完整抗体所结合的抗原的部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和从抗体片段形成的多特异性抗体。

在一些实施方案中,抗原是EGFR。

[0072] 如本文所用的术语“一种或多种单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体(即,构成所述群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位,但是例如含有天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的产生期间产生的可能变体抗体除外,此类变体通常以少量存在)获得的抗体。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。因此,修饰语“单克隆”指示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征,并且不应被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本发明待使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,所述多种技术包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,本文描述了制备单克隆抗体的此类方法和其他示例性方法。

[0073] 如本文所用,“核苷酸”是指包含核苷部分和磷酸部分的化合物。示例性天然核苷酸包括而限于腺苷三磷酸(ATP)、尿苷三磷酸(UTP)、胞苷三磷酸(CTP)、鸟苷三磷酸(GTP)、腺苷二磷酸(ADP)、尿苷二磷酸(UDP)、胞苷二磷酸(CDP)、鸟苷二磷酸(GDP)、腺苷一磷酸(AMP)、尿苷一磷酸(UMP)、胞苷一磷酸(CMP)和鸟苷一磷酸(GMP)、脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧胸苷三磷酸(dTTP)、脱氧胞苷三磷酸(dCTP)、脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)、脱氧腺苷二磷酸(dADP)、胸苷二磷酸(dTDP)、脱氧胞苷二磷酸(dCDP)、脱氧鸟苷二磷酸(dGDP)、脱氧腺苷一磷酸(dAMP)、脱氧胸苷一磷酸(dTMP)、脱氧胞苷一磷酸(dCMP)和脱氧鸟苷一磷酸(dGMP)。包含脱氧核糖作为糖部分的示例性天然脱氧核糖核苷酸包括dATP、dTTP、dCTP、dGTP、dADP、dTDP、dCDP、dGDP、dAMP、dTMP、dCMP和dGMP。包含核糖作为糖部分的示例性天然核糖核苷酸包括ATP、UTP、CTP、GTP、ADP、UDP、CDP、GDP、AMP、UMP、CMP和GMP。

[0074] 如本文所用,“碱基”或“核碱基”是指核苷或核苷酸(核苷和核苷酸包括核糖或脱氧核糖变体)的至少核碱基部分,所述核苷或核苷酸在一些情况下可以含有对核苷或核苷酸的糖部分的进一步修饰。在一些情况下,“碱基”也用于表示整个核苷或核苷酸(例如,“碱基”可以通过DNA聚合酶掺入DNA中,或者通过RNA聚合酶掺入RNA中)。然而,除非上下文要求,否则术语“碱基”不应当被解释为一定表示整个核苷或核苷酸。在本文提供的碱基或核碱基化学结构中,仅示出核苷或核苷酸的碱基,为清楚起见省略了糖部分和任选的任何磷酸残基。如在本文提供的碱基或核碱基化学结构中所用,波浪线表示与核苷或核苷酸的连接,其中核苷或核苷酸的糖部分可以被进一步修饰。在一些实施方案中,波浪线表示碱基或核碱基与核苷或核苷酸的糖部分(如戊糖)的附接。在一些实施方案中,戊糖是核糖或脱氧核糖。

[0075] 在一些实施方案中,核碱基通常是核苷的杂环碱基部分。核碱基可以是天然存在的,可以是修饰的,可以与天然碱基没有相似性,和/或可以是合成的,例如通过有机合成而合成。在某些实施方案中,核碱基包含核苷或核苷酸中的任何原子或原子团,其中所述原子或原子团能够在使用或不使用氢键的情况下与另一核酸的碱基相互作用。在某些实施方案中,非天然核碱基不是源自天然核碱基。应当注意的是,非天然核碱基不一定具有碱基特性,然而为了简单起见,它们被称为核碱基。在一些实施方案中,当提及核碱基时,“(d)”指示核碱基可以附接至脱氧核糖或核糖,而没有括号的“d”指示核碱基附接至脱氧核糖。

[0076] 如本文所用,“核苷”是包含核碱基部分和糖部分的化合物。核苷包括但不限于天然存在的核苷(如在DNA和RNA中发现的)、脱碱基核苷、经修饰的核苷和具有模拟碱基和/或

糖基团的核苷。核苷包括包含任何种类的取代基的核苷。核苷可以通过核酸碱基与糖的还原基团之间的糖苷连接形成的糖苷化合物。

[0077] 如本文所用的术语化学结构的“类似物”是指与母体结构保持基本相似性但它可能不容易从母体结构合成得到的化学结构。在一些实施方案中,核苷酸类似物是非天然核苷酸。在一些实施方案中,核苷类似物是非天然核苷。容易从母体化学结构合成得到的相关化学结构被称为“衍生物”。

[0078] 尽管本发明的各种特征可以在单个实施方案的上下文中描述,但所述特征也可以单独提供或以任何合适的组合提供。相反,尽管为了清楚起见,本文可以在单独的实施方案的上下文中描述本发明,但本发明也可以在单个实施方案中实现。

IL-2缀合物

[0079] 细胞因子包括细胞信号传导蛋白的家族,如趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子、肿瘤坏死因子以及在先天性和适应性免疫细胞稳态中发挥作用的其他生长因子。细胞因子是由免疫细胞(如巨噬细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞和肥大细胞、内皮细胞、成纤维细胞和不同的基质细胞)产生的。在一些情形下,细胞因子调节体液免疫反应与基于细胞的免疫反应之间的平衡。

[0080] 白介素是调节以下细胞的发育和分化的信号传导蛋白:T和B淋巴细胞、单核细胞谱系的细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨核细胞和造血细胞。白介素是由辅助性CD4⁺ T和B淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞和其他组织驻留细胞产生的。

[0081] 白介素2 (IL-2) 是一种多效性1型细胞因子,其结构包含15.5kDa的四 α -螺旋束。IL-2的前体形式的长度为153个氨基酸残基,其中前20个氨基酸形成信号肽,并且残基21-153形成成熟形式。IL-2主要由CD4⁺ T细胞在抗原刺激后产生,以及在较小程度上由CD8⁺细胞、自然杀伤(NK)细胞、和自然杀伤T(NKT)细胞、激活的树突细胞(DC)和肥大细胞产生。IL-2信号传导通过与IL-2受体(IL-2R)亚基IL-2R α (也称为CD25)、IL-2R β (也称为CD122)和IL-2R γ (也称为CD132)的特定组合的相互作用来进行。IL-2与IL-2R α 的相互作用以约 10^{-8} M的 K_d 形成“低亲和力”IL-2受体复合物。IL-2与IL-2R β 和IL-2R γ 的相互作用以约 10^{-9} M的 K_d 形成“中亲和力”IL-2受体复合物。IL-2与所有三种亚基IL-2R α 、IL-2R β 和IL-2R γ 的相互作用以约 $>10^{-11}$ M的 K_d 形成“高亲和力”IL-2受体复合物。

[0082] 在一些情形下,经由“高亲和力”IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 复合物的IL-2信号传导调节调节性T细胞的激活和增殖。调节性T细胞或CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T(Treg)细胞通过抑制效应细胞(如CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、B细胞、NK细胞和NKT细胞)来介导免疫稳态的维持。在一些情形下,Treg细胞是从胸腺产生(tTreg细胞),或者是从外周的幼稚T细胞诱导(pTreg细胞)。在一些情况下,将Treg细胞视为外周耐受的介体。实际上,在一项研究中,CD25耗尽的外周血CD4⁺ T细胞的转移在裸鼠中产生多种自身免疫性疾病,而CD4⁺CD25⁺ T细胞的共转移抑制自身免疫的发生(Sakaguchi等人,“Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25),”J.Immunol.155(3):1151-1164(1995),将其公开内容通过引用并入本文)。Treg细胞群的增加下调效应T细胞增殖并抑制自身免疫和T细胞抗肿瘤反应。

[0083] 经由“中亲和力”IL-2R $\beta\gamma$ 复合物的IL-2信号传导调节CD8⁺效应T(Teff)细胞、NK细胞和NKT细胞的激活和增殖。CD8⁺Teff细胞(也称为细胞毒性T细胞、Tc细胞、细胞毒性T淋

巴细胞、CTL、T杀伤细胞、细胞溶解性T细胞、Tcon或杀伤T细胞)是识别并杀伤受损细胞、癌细胞和病原体感染的细胞的T淋巴细胞。NK和NKT细胞是与CD8⁺Teff细胞类似的淋巴细胞类型,其靶向癌细胞和病原体感染的细胞。

[0084] 在一些情形下,IL-2信号传导用于调节T细胞反应,随后用于治疗癌症。例如,以高剂量形式施用IL-2以诱导Teff细胞群的扩增以用于治疗癌症。然而,高剂量IL-2进一步导致对Treg细胞的伴随刺激,从而减弱抗肿瘤免疫反应。高剂量IL-2还诱导由脉管系统中的IL-2R α 链表达细胞(包括2型先天免疫细胞(ILC-2)、嗜酸性粒细胞和内皮细胞)的接合介导的毒性不良事件。这导致嗜酸性粒细胞增多症、毛细血管渗漏和血管渗漏综合征(VLS)。

[0085] 过继细胞疗法使得医师能够有效利用患者自身的免疫细胞对抗疾病,如增殖性疾病(例如,癌症)以及感染性疾病。在一些实施方案中,本文公开了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述一种或多种另外的药剂可以包括一种或多种免疫检查点抑制剂。

[0086] 在一些实施方案中,本文描述了白介素2(IL-2)缀合物。在一些实施方案中,本文描述了表1中所示的示例性多肽。在一些实施方案中,本文所述的IL-2缀合物例示于表1中。

表1.

名称	序列	SEQ ID NO:
IL-2 (智人(homo sapiens)) (成熟形式)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	1
IL-2 (智人) (前体) NCBI登录号: AAB46883.1	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	2

阿地白介素	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQSIISTLT	3
IL-2_C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQSIISTLT	4
IL-2_P65X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELK ~~X~~ LEEVLNLAQSKN FHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQSIISTLT	5
IL-2_E62X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEE ~~X~~ LKPLEEVLNLAQSKN FHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQSIISTLT	6
IL-2_F42X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LT ~~X~~ KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKN FHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQSIISTLT	7
IL-2_K43X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTF ~~X~~ FYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQSIISTLT	8
IL-2_K35X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP ~~X~~ LTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQSIISTLT	9
IL-2_P65[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELK[AzK]LEEVLNLAQ SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	10
IL-2_E62[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEE[AzK]LKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	11
IL-2_F42[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LT[AzK]KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQ SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	12
IL-2_K43[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTF[AzK]FYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	13
IL-2_K35[AzK]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK]L TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQ SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT	14
IL-2_P65[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELK[AzK_PEG]LEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET	15

	ATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	
IL-2_E62[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEE[AzK_PEG]LKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	16
IL-2_F42[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LT[AzK_PEG]KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	17
IL-2_K43[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTF[AzK_PEG]FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	18
IL-2_K35[AzK_PEG]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK_P EG]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	19
IL-2_P65[AzK_PEG5kD]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELK[AzK_PEG5kD]LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	20
IL-2_E62[AzK_PEG5kD]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEE[AzK_PEG5kD]LKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	21
IL-2_F42[AzK_PEG5kD]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LT[AzK_PEG5kD]KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	22
IL-2_K43[AzK_PEG5kD]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTF[AzK_PEG5kD]FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	23
IL-2_K35[AzK_PEG5kD]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK_P EG5kD]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	24
IL-2_P65[AzK_PEG30kD]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELK[AzK_PEG30kD]LE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	25
IL-2_E62[AzK_PEG30kD]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEE[AzK_PEG30kD]LKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	26
IL-2_F42[AzK_PEG30kD]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LT[AzK_PEG30kD]KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	27
IL-2_K43[AzK_PEG30kD]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM	28

	LTF[AzK PEG30kD]FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	
IL-2_K35[AzK_PEG30kD]	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNP[AzK P EG30kD]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	29
IL-2_P65X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKXLEEVNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQSIISTLT	30
IL-2_E62X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEXLKPLEEVNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQSIISTLT	31
IL-2_F42X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML TXKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQSIISTLT	32
IL-2_K43X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML TFXFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQSIISTLT	33
IL-2_K35X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPXLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQSIISTLT	34
IL-2_P65[AzK]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELK[AzK]LEEVNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	35
IL-2_E62[AzK]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEE[AzK]LKPLEEVNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	36
IL-2_F42[AzK]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML T[AzK]KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	37
IL-2_K43[AzK]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML TF[AzK]FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLT	38
IL-2_K35[AzK]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNP[AzK]LT RMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT	39
IL-2_P65[AzK_L1_PEG]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELK[AzK L1 PEG]LEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYAD ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	40

IL-2_E62[AzK_L1_PEG]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEE[AzK_L1_PEG]LKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYAD ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	41
IL-2_F42[AzK_L1_PEG]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML T[AzK_L1_PEG]KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYAD ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	42
IL-2_K43[AzK_L1_PEG]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TF[AzK_L1_PEG]FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYAD ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	43
IL-2_K35[AzK_L1_PEG]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK_L1_PEG] LTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYAD ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	44
IL-2_P65[AzK_L1_PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELK[AzK_L1_PEG5kD]L EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	45
IL-2_E62[AzK_L1_PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEE[AzK_L1_PEG5kD]LKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	46
IL-2_F42[AzK_L1_PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML T[AzK_L1_PEG5kD]KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	47
IL-2_K43[AzK_L1_PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TF[AzK_L1_PEG5kD]FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	48
IL-2_K35[AzK_L1_PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK_L1_PEG5kD] LTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	49
IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELK[AzK_L1_PEG30kD] LEEVNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	50
IL-2_E62[AzK_L1_PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEE[AzK_L1_PEG30kD]LKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	51
IL-2_F42[AzK_L1_PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML T[AzK_L1_PEG30kD]KFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEEVNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	52
IL-2_K43[AzK_L1_PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TF[AzK_L1_PEG30kD]FYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE	53

	YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	
IL-2_K35[AzK_L1_PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNP[AzK_L1_PEG30kD]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	54
IL-2_P65[AzK_L1_PEG]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELK[AzK_L1_PEG]LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	55
IL-2_E62[AzK_L1_PEG]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEE[AzK_L1_PEG]LKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	56
IL-2_F42[AzK_L1_PEG]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LT[AzK_L1_PEG]KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	57
IL-2_K43[AzK_L1_PEG]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTF[AzK_L1_PEG]FYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	58
IL-2_K35[AzK_L1_PEG]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNP[AzK_L1_PEG]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	59
IL-2_P65[AzK_L1_PEG5kD]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELK[AzK_L1_PEG5kD] LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	60
IL-2_E62[AzK_L1_PEG5kD]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEE[AzK_L1_PEG5kD]LKPLEE LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	61
IL-2_F42[AzK_L1_PEG5kD]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LT[AzK_L1_PEG5kD]KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	62
IL-2_K43[AzK_L1_PEG5kD]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTF[AzK_L1_PEG5kD]FYMPKKATELKHLQCLEEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	63
IL-2_K35[AzK_L1_PEG5kD]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNP[AzK_L1_PEG5kD]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKP LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	64
IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELK[AzK_L1_PEG30kD] LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFM CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	65
IL-2_E62[AzK_L1_PEG30kD]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM	66

L1_PEG30kD]-2	LTFKFYMPKKATELKHLQCLEE[AzK L1 PEG30kD]LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	
IL-2_F42[AzK_L1_PEG30kD]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLT[AzK L1 PEG30kD]KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	67
IL-2_K43[AzK_L1_PEG30kD]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTF[AzK L1 PEG30kD]FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	68
IL-2_K35[AzK_L1_PEG30kD]-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNP[AzK L1 PEG30kD]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	69
IL-2_P65[AzK_PEG]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELK[AzK PEG]LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	70
IL-2_E62[AzK_PEG]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE[AzK PEG]LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	71
IL-2_F42[AzK_PEG]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLT[AzK PEG]KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	72
IL-2_K43[AzK_PEG]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTF[AzK PEG]FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	73
IL-2_K35[AzK_PEG]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNP[AzK PEG]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	74
IL-2_P65[AzK_PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELK[AzK PEG5kD]LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	75
IL-2_E62[AzK_PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE[AzK PEG5kD]LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	76
IL-2_F42[AzK_PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLT[AzK PEG5kD]KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	77
IL-2_K43[AzK_PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTF[AzK PEG5kD]FYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	78

IL-2_K35[AzK_PEG5kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK PEG5kD]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEV VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYAD DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	79
IL-2_P65[AzK_PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELK[AzK PEG30kD]LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	80
IL-2_E62[AzK_PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEE[AzK PEG30kD]LKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	81
IL-2_F42[AzK_PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML T[AzK PEG30kD]KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	82
IL-2_K43[AzK_PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TF[AzK PEG30kD]FYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	83
IL-2_K35[AzK_PEG30kD]-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP[AzK PEG30kD]LTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT	84
IL-2_F44X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKX ~~Y~~ MPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKN FHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT	85
IL-2_F44X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKX ~~Y~~ MPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT	86
IL-2_R38X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT ~~X~~ M LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT	87
IL-2_R38X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT ~~X~~ ML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT	88
IL-2_T41X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LX ~~F~~ KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKN FHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT	89
IL-2_T41X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML X ~~F~~ KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT	90
IL-2_E68X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLE ~~X~~ VLNLAQSKN FHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL	91

	NRWITFCQSIISTLT	
IL-2_E68X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEXVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT	92
IL-2_Y45X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT	93
IL-2_Y45X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT	94
IL-2_V69X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT	95
IL-2_V69X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT	96
IL-2_L72X	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRM LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN FHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT	97
IL-2_L72X-1	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT	98

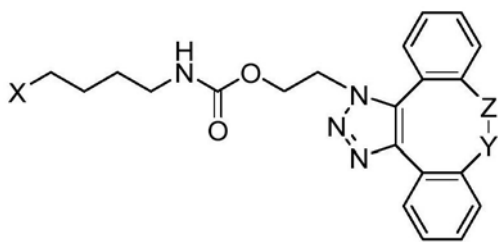
X= 包含非天然氨基酸的位点。

[AzK] = N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸, 化学文摘社登记号为1167421-25-1。

[AzK_PEG] = 经由DBCO介导的点击化学稳定缀合至PEG的N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸, 以形成包含式 (II) 或式 (III) 的结构的化合物。例如, 如果指定, PEG5kD指示用甲氧基封端的线性聚乙二醇链, 其平均分子量为5千道尔顿。从点击反应产生的位置异构体的比率为约1:1或大于1:1。术语“DBCO”意指包含二苯并环辛炔基团的化学部分, 如包括实施例2的方案1中说明的mPEG-DBCO化合物。甲氧基PEG基团的示例性结构说明于实施例2的方案1中的mPEG-DBCO结构中。

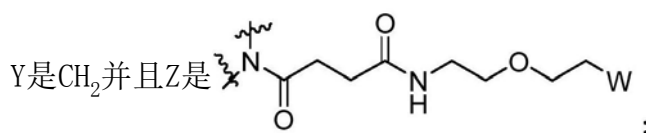
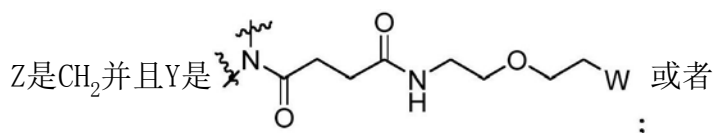
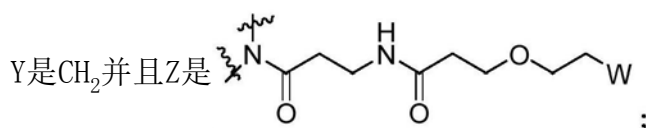
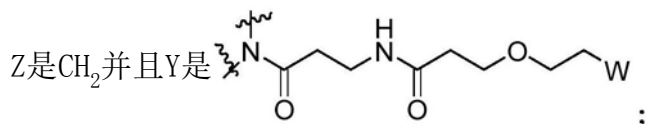
[AzK_L1_PEG] = 经由DBCO介导的点击化学稳定缀合至PEG的N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸, 以形成包含式 (IV) 或式 (V) 的结构的化合物。例如, 如果指定, PEG5kD指示用甲氧基封端的线性聚乙二醇链, 其平均分子量为5千道尔顿。从点击反应产生的位置异构体的比率为约1:1或大于1:1。术语“DBCO”意指包含二苯并环辛炔基团的化学部分, 如包括实施例2的方案1中说明的mPEG-DBCO化合物。

[0087] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂, 其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列, 其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式 (I) 的结构替代:



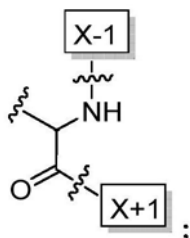
式 (I);

其中:



W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



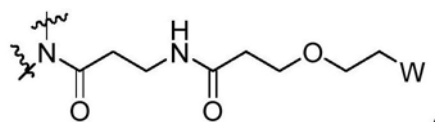
X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

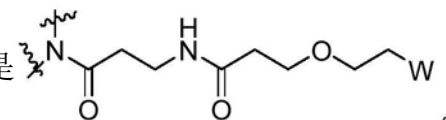
X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

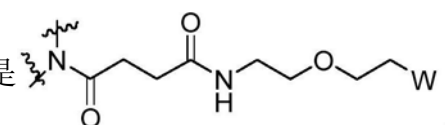
[0088] 在这里和自始至终,术语“IL-2缀合物”包括所指示结构的药学上可接受的盐、溶剂化物和水合物。

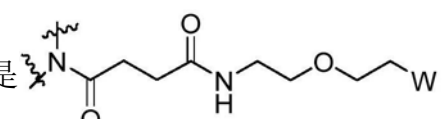
[0089] 在这里和自始至终,式(I)的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在一些实施方案中,式(I)的结构或其任何实施方案或变型作为其药学上可接受的盐提供。在一些实施方案中,式(I)的结构或其任何实施方案或变型作为其溶剂化物提供。在一些实施方案中,式(I)的结构或其任何实施方案或变型作为其水合物提供。在一些实施方案中,式(I)的结构或其任何实施方案或变型作为游离碱提供。

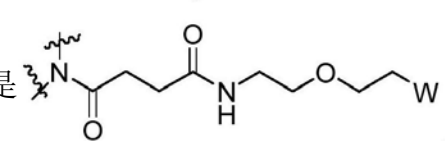
[0090] 在本文所述的方法的一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中,Z是CH₂并且Y是


 在本文所述的方法的一些实施方案中,在所述IL-2缀合物

中,Y是CH₂并且Z是
 
 在本文所述的方法的一些实施方案中,Z

是CH₂并且Y是
 
 在本文所述的方法的一些实施方案中,在所

述IL-2缀合物中,Z是CH₂并且Y是
 
 在本文所述的方法的一些

实施方案中,在所述IL-2缀合物中,Y是CH₂并且Z是
 
 在这里

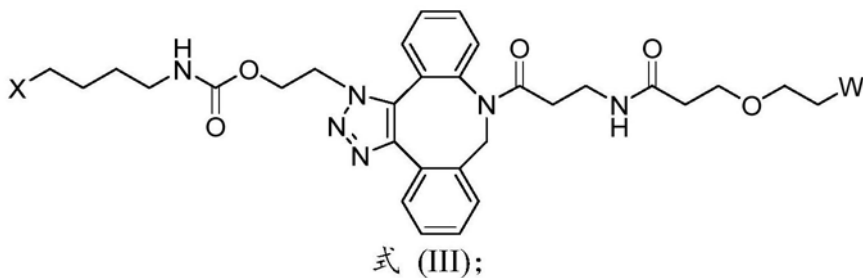
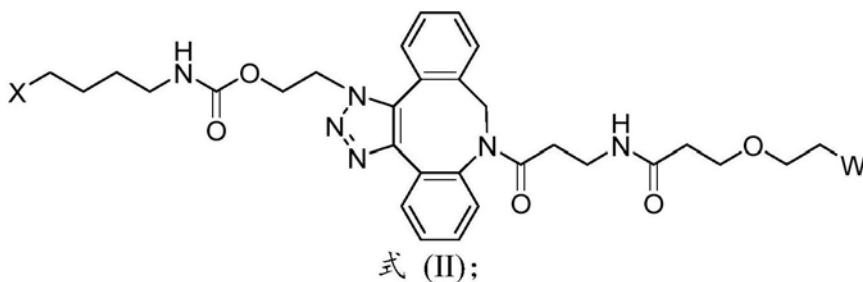
和自始至终,Z和Y的实施方案还包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0091] 在本文所述的方法的一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有选自5kDa、10kDa、20kDa和30kDa的平均分子量。在本文所述的方法的一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有5kDa的平均分子量。在本文所述的方法的一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有10kDa的平均分子量。在本文所述的方法的一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有15kDa的平均分子量。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有20kDa的平均分子量。在本文所述的方法的一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有25kDa的平均分子量。在本文所述的方法的一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有30kDa的平均分子量。在本文所述的方法的一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有35kDa的平均分子量。在本文所述的方法的一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有40kDa的平均分子量。在本文所述的方法的一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有45kDa的平均分子量。在本文所述的方法的一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有50kDa的平均分子量。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有60kDa的平均分子量。

[0092] 在本文所述的方法的一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中,式(I)的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71,其中式(I)的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是参考在SEQ ID NO:3中的位置。在本文所述的方法的一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中,式(I)的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自F41、E61和P64,其中式(I)的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是参考在SEQ ID NO:3中的位置。

[0093] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:15-19中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]具有式(II)或式(III)或者式(II)和式

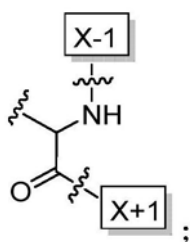
(III)的混合物的结构:



其中:

W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

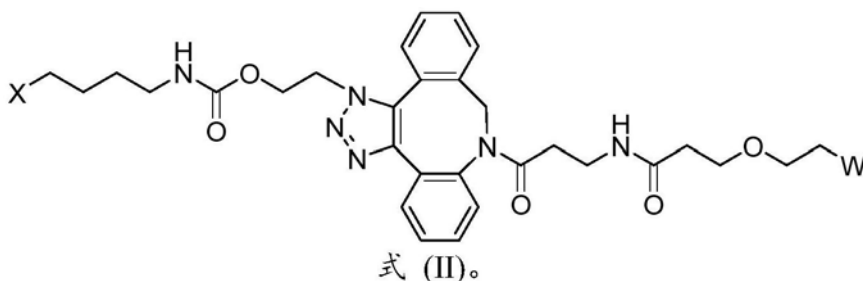
在一些实施方案中,所述IL-2缀合物是药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0094] 在这里和自始至终,式(II)的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

在这里和自始至终,式(III)的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0095] 在一些实施方案中,[AzK_PEG]是式(II)和式(III)的混合物。

[0096] 在一些实施方案中,[AzK_PEG]具有式(II)的结构:



[0097] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在一些实施方案中,式(II)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(II)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均

分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(II)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(II)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

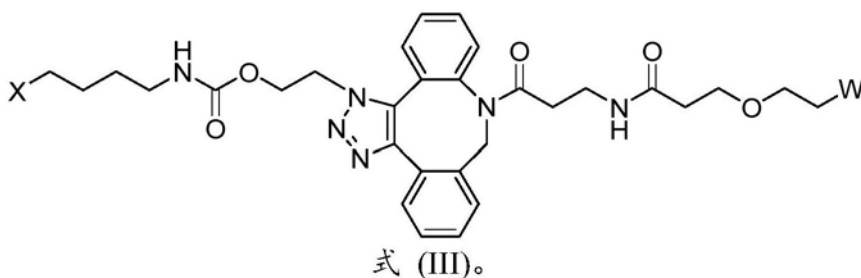
[0098] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,式(II)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(II)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(II)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(II)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0099] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,式(II)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(II)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(II)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(II)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0100] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(II)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(II)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(II)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(II)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0101] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(II)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(II)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(II)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(II)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0102] 在一些实施方案中, [AzK PEG] 具有式 (III) 的结构:



[0103] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在一些实施方案中,式(III)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(III)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(III)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(III)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0104] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,式(III)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(III)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(III)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(III)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0105] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,式(III)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(III)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(III)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,式(III)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

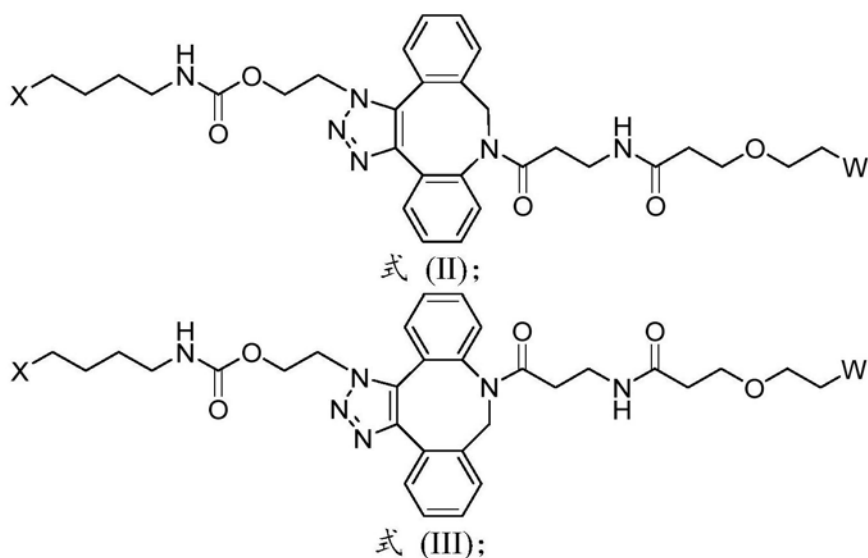
[0106] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一些实施方案中,式(III)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(III)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(III)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(III)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0107] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(III)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(III)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(III)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(III)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0108] 在本文公开的方法的一些实施方案中,使用具有选自SEQ ID NO:15、16、17、18和19中的任一个的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中[AzK_PEG]含有具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:15、16、17、18和19中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]含有具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:15、16、17、18和19中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]含有具有10kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:15、16、17、18和19中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]含有具有15kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:15、16、17、18和19中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]含有具有20kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:15、16、17、18和19中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]含有具有25kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:15、16、17、18和19中的任一个的氨基酸序列,其中

[AzK_PEG]含有具有30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:15、16、17、18和19中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]含有具有35kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:15、16、17、18和19中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]含有具有40kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:15、16、17、18和19中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]含有具有45kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:15、16、17、18和19中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]含有具有50kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:15、16、17、18和19中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]含有具有60kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:15、16、17、18和19中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]含有具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团,并且其中所述PEG基团是甲氧基PEG基团、线性甲氧基PEG基团或分支甲氧基PEG基团。

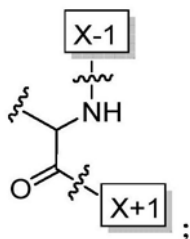
[0109] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:20-24中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG5kD]具有式(II)或式(III)或者式(II)和式(III)的混合物的结构:



其中:

W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



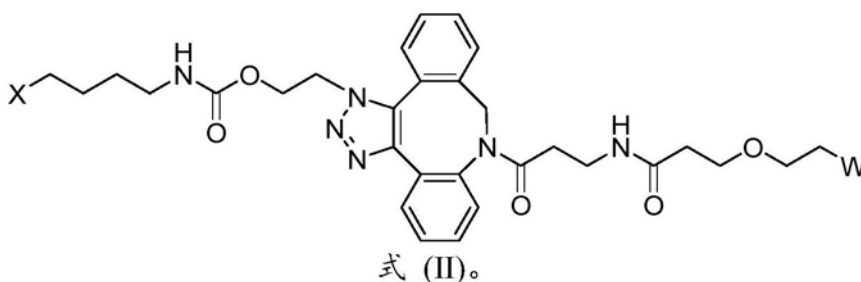
X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点;

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

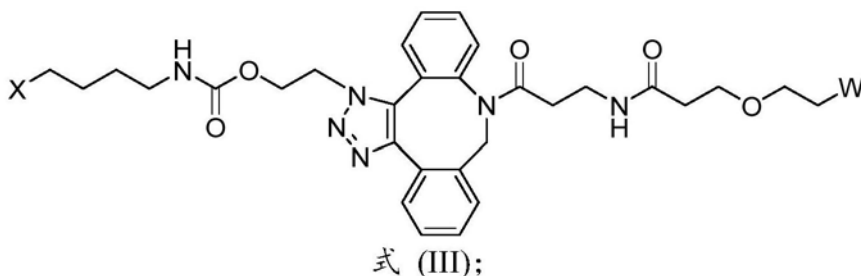
[0110] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

[0111] 在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中[AzK_PEG5kD]具有式(II)的结构:



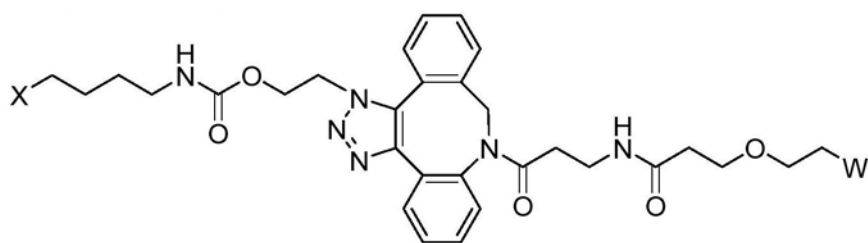
在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

[0112] 在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中[AzK_PEG5kD]具有式(III)的结构:

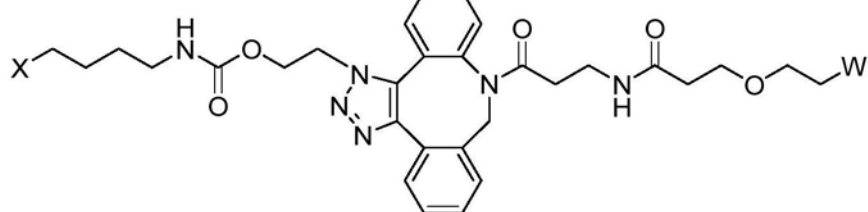


或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

[0113] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:25-29中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG30kD]具有式(II)或式(III)的结构,或者是式(II)和式(III)的结构的混合物:



式 (II);

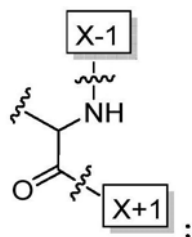


式 (III);

其中:

W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



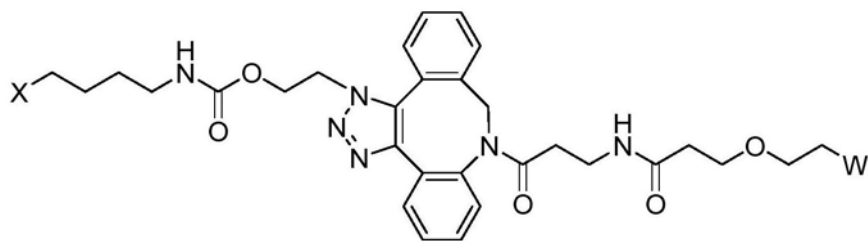
X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

在一些实施方案中,所述IL-2缀合物是药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0114] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0115] 在一些实施方案中,本文公开的方法使用IL-2缀合物,其中[AzK_PEG30kD]具有式(II)的结构:

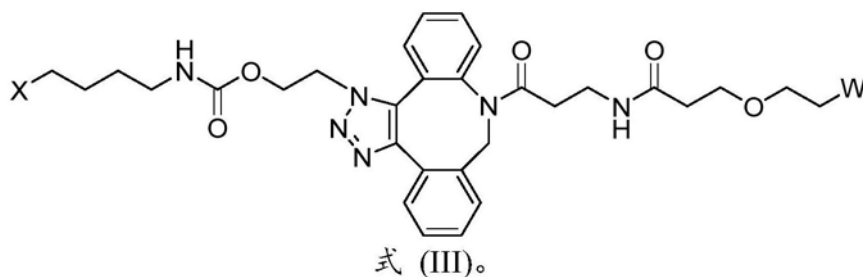


式 (II);

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:26

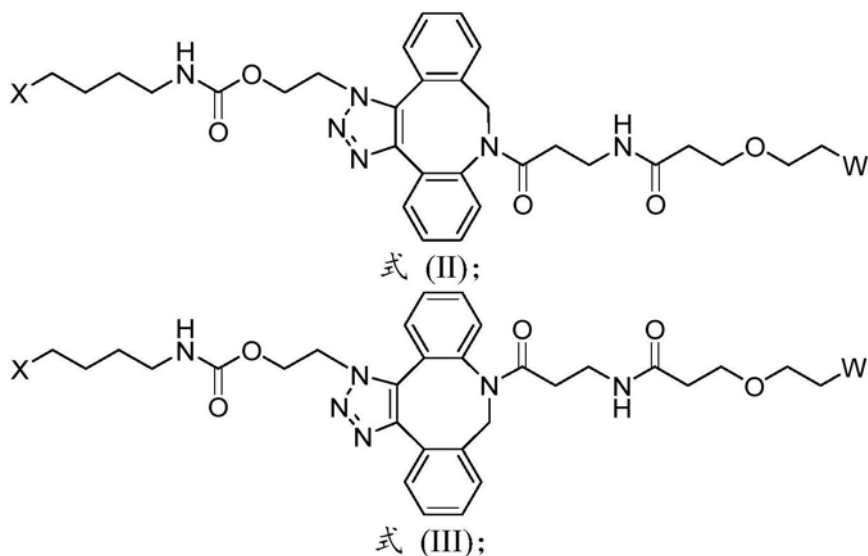
的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0116] 在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中[AzK_PEG30kD]具有式(III)的结构:



在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

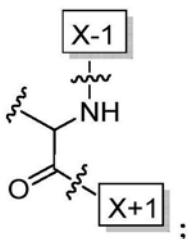
[0117] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:15-19中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]是式(II)和式(III)的结构的混合物:



其中:

W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



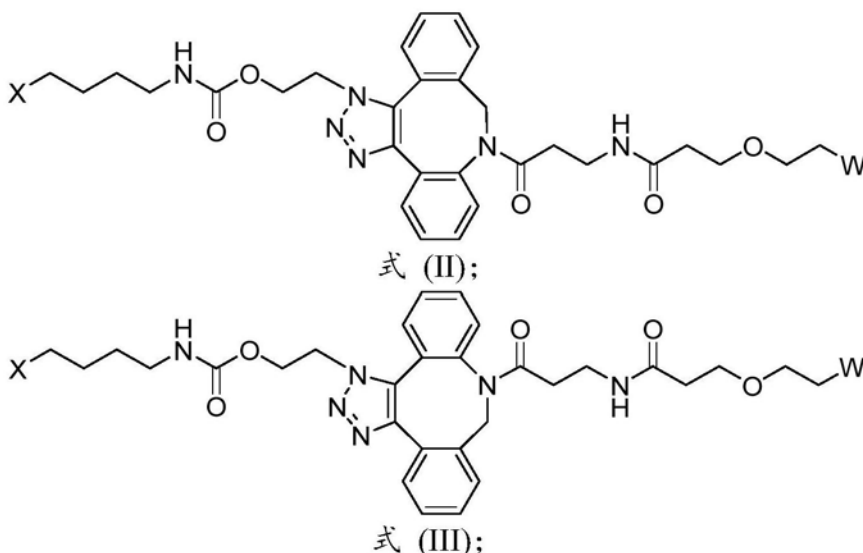
X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点；并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

在一些实施方案中，所述IL-2缀合物是药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0118] 在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG]的总量的式(II)的结构的量与式(III)的结构的量的比率为约1:1。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG]的总量的式(II)的结构的量与式(III)的结构的量的比率大于1:1。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG]的总量的式(II)的结构的量与式(III)的结构的量的比率小于1:1。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中W是线性或分支PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中W是线性PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中W是分支PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中W是甲氧基PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中甲氧基PEG基团是线性或分支的。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中甲氧基PEG基团是线性的。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中甲氧基PEG基团是分支的。

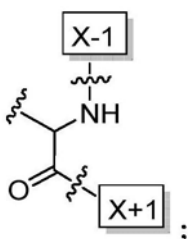
[0119] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂，其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:20至24中任一个的氨基酸序列，其中[AzK_PEG5kD]是式(II)和式(III)的结构的混合物：



其中：

W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团；并且

X具有以下结构：



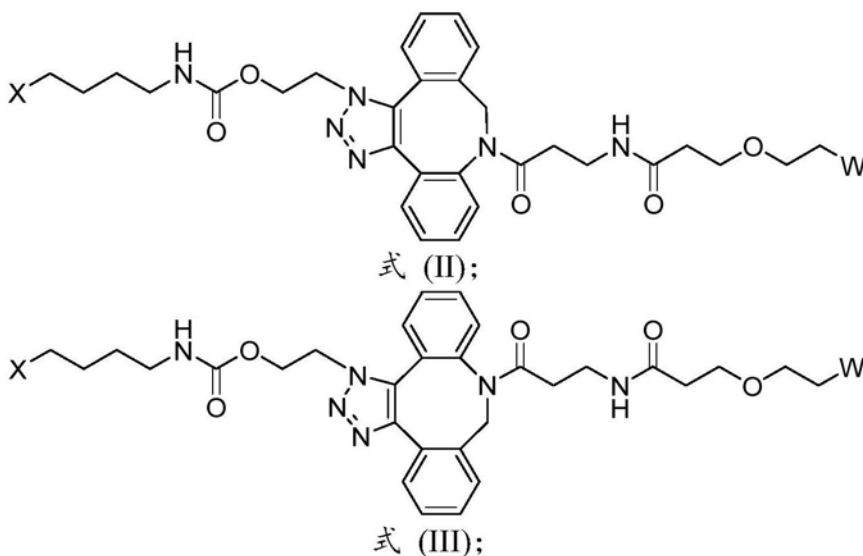
X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点；并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点；

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0120] 在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG5kD]的总量的式(II)的结构的量与式(III)的结构的量的比率为约1:1。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG5kD]的总量的式(II)的结构的量与式(III)的结构的量的比率大于1:1。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG5kD]的总量的式(II)的结构的量与式(III)的结构的量的比率小于1:1。

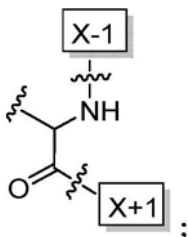
[0121] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b) 一种或多种另外的药剂，其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:25-29中任一个的氨基酸序列，其中[AzK_PEG30kD]是式(II)和式(III)的结构的混合物：



其中：

W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团；并且

X具有以下结构：

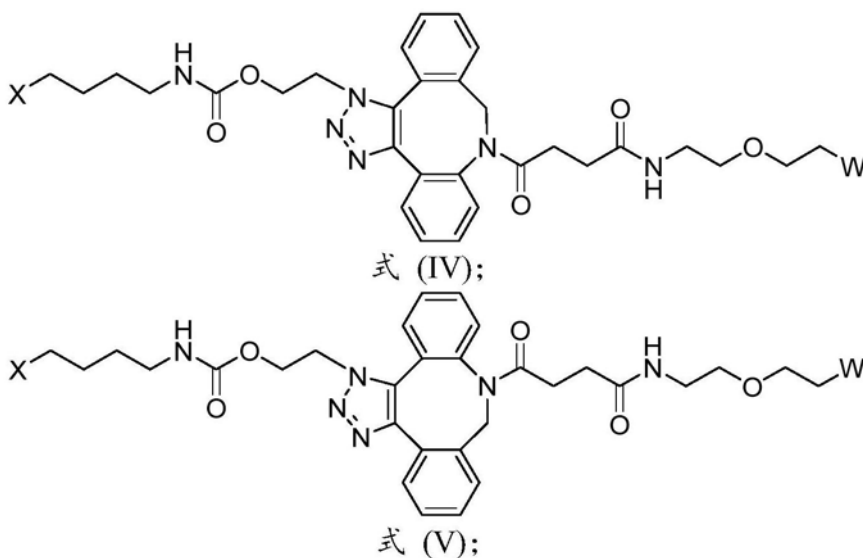


X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点；并且
 X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点；
 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0122] 在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG30kD]的总量的式(II)的结构的量与式(III)的结构的量的比率为约1:1。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG30kD]的总量的式(II)的结构的量与式(III)的结构的量的比率大于1:1。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG30kD]的总量的式(II)的结构的量与式(III)的结构的量的比率小于1:1。

[0123] 在一些实施方案中，所述方法使用本文所述的IL-2缀合物，其包含式(II)或式(III)或者式(II)和式(III)的混合物的结构，其中W是线性或分支PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式(II)或式(III)的结构中的W是线性PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式(II)或式(III)的结构中的W是分支PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式(II)或式(III)的结构中的W是甲氧基PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式(II)或式(III)的结构中的W是线性或分支的甲氧基PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式(II)或式(III)的结构中的甲氧基PEG基团是线性的。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式(II)或式(III)的结构中的甲氧基PEG基团是分支的。

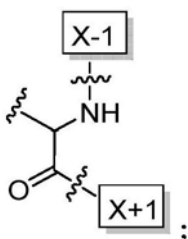
[0124] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂，其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:40-44中任一个的氨基酸序列，其中[AzK_L1_PEG]具有式(IV)或式(V)或者式(IV)和式(V)的混合物的结构：



其中：

W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团；并且

X具有以下结构：



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点；并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点；

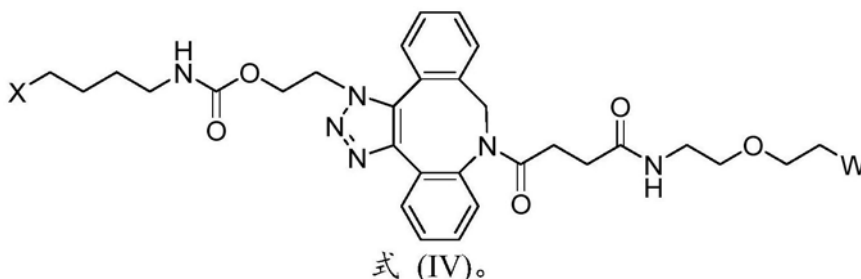
或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0125] 在这里和自始至终，式 (IV) 的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

在这里和自始至终，式 (V) 的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0126] 在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中[AzK_L1_PEG]是式 (IV) 和式 (V) 的混合物。

[0127] 在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中[AzK_L1_PEG]具有式 (IV) 的结构：



[0128] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式 (IV) 的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式 (IV) 的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式 (IV) 的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式 (IV) 的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0129] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式 (IV) 的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式 (IV) 的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式 (IV) 的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式 (IV) 的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

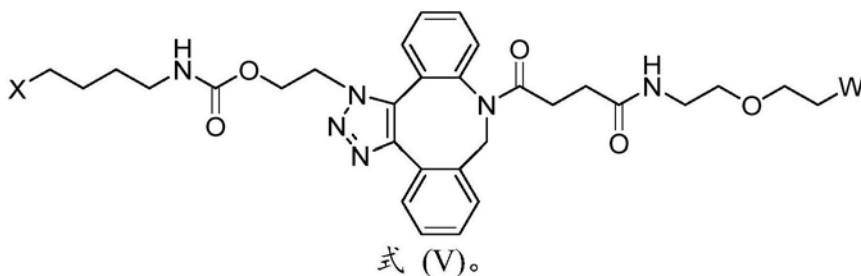
[0130] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式 (IV) 的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中，所述方法使用IL-2缀合物，其中式 (IV) 的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在

一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(IV)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0131] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(IV)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(IV)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(IV)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(IV)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0132] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(IV)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(IV)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(IV)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(IV)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0133] 在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中[AzK_L1_PEG]具有式(V)的结构:



[0134] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0135] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

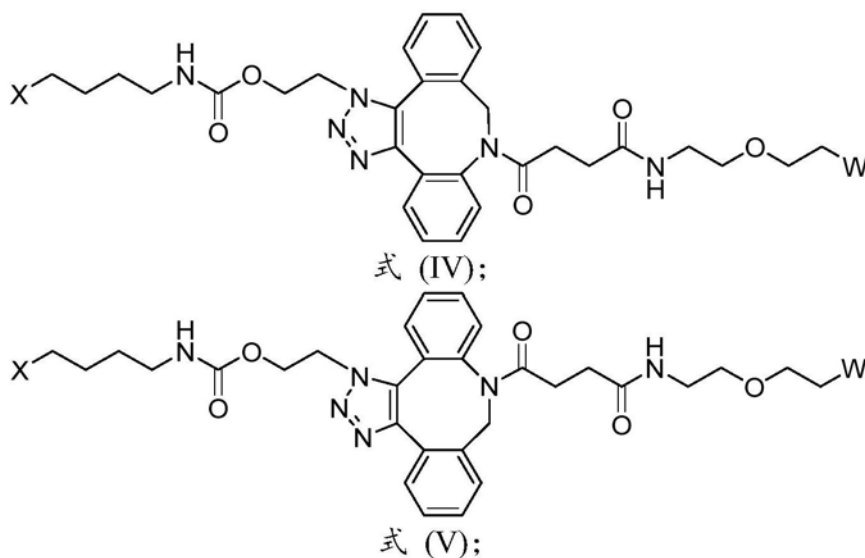
[0136] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0137] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(V)的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0138] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:40、41、42、43和44中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]含有具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:40、41、42、43和44中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]含有具有5kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:40、41、42、43和44中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]含有具有10kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:40、41、42、43和44中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]含有具有15kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:40、41、42、43和44中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]含有具有20kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:40、41、42、43和44中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]含有具有25kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:40、41、42、43和44中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]含有具有30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:40、41、42、43和44中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]含有具有35kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:40、41、42、43和44中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]含有具有40kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:40、41、42、43和44中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]含有具有45kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:40、41、42、43和44中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]含有具有50kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:40、41、42、43和44中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]含有具有60kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有选自SEQ ID NO:40、41、42、43和44中的任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]含有具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa

的平均分子量的PEG基团,并且其中所述PEG基团是甲氧基PEG基团、线性甲氧基PEG基团或分支甲氧基PEG基团。

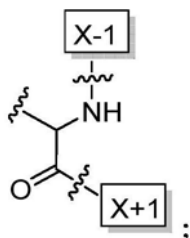
[0139] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:45-49中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG5kD]具有式(IV)或式(V)或者式(IV)和式(V)的混合物的结构:



其中:

W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



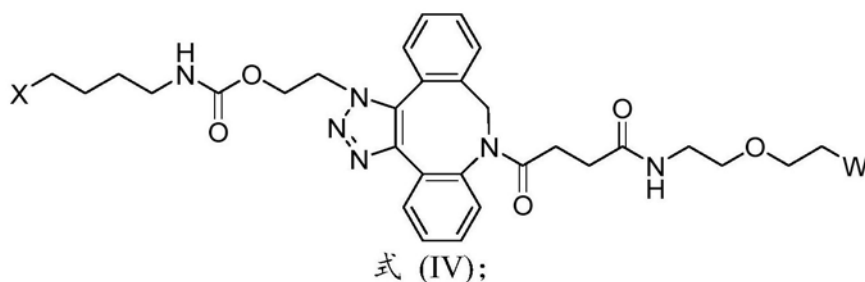
X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

在一些实施方案中,所述IL-2缀合物是药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

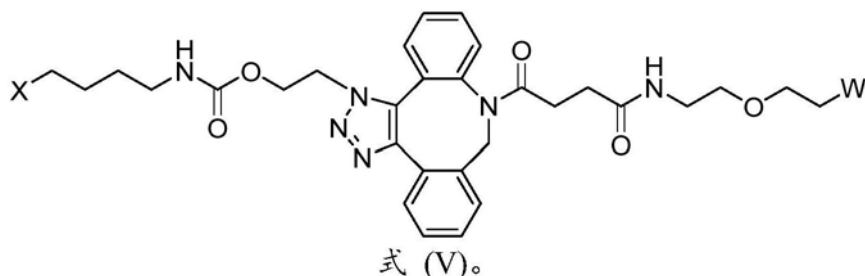
[0140] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列。

[0141] 在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中[AzK_L1_PEG5kD]具有式(IV)的结构:



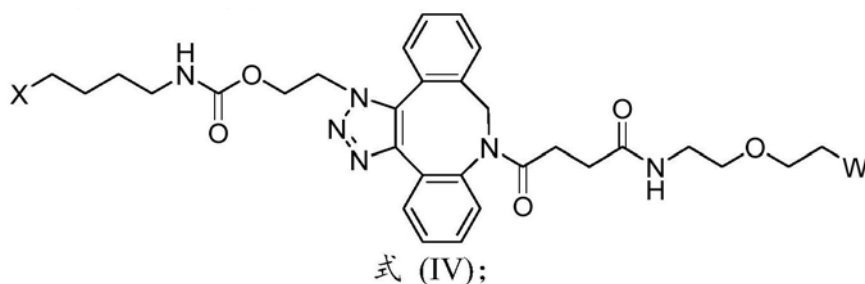
或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列。

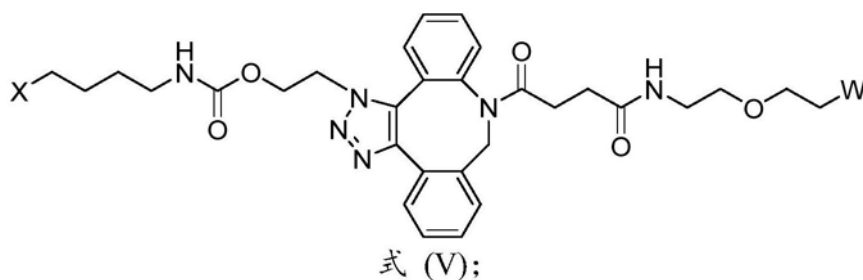
[0142] 在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中[AzK_L1_PEG5kD]具有式(V)的结构:



在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列。

[0143] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:50-54中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG30kD]具有式(IV)或式(V)的结构,或者是式(IV)和式(V)的结构的混合物:

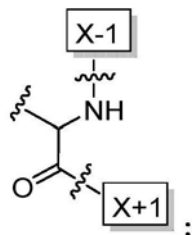




其中:

W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



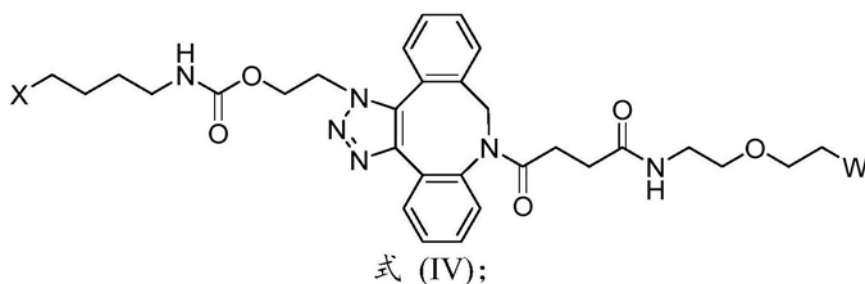
X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点;

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

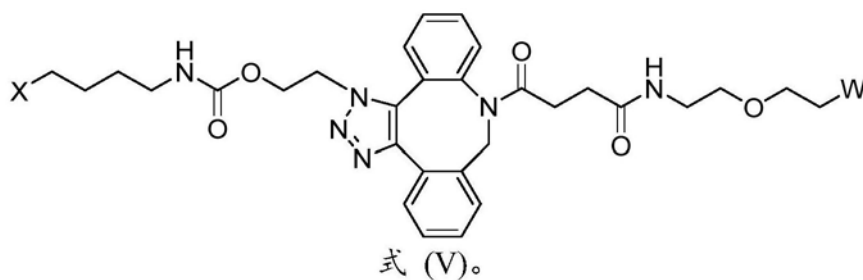
[0144] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列。

[0145] 在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中[AzK_L1_PEG30kD]具有式(IV)的结构:



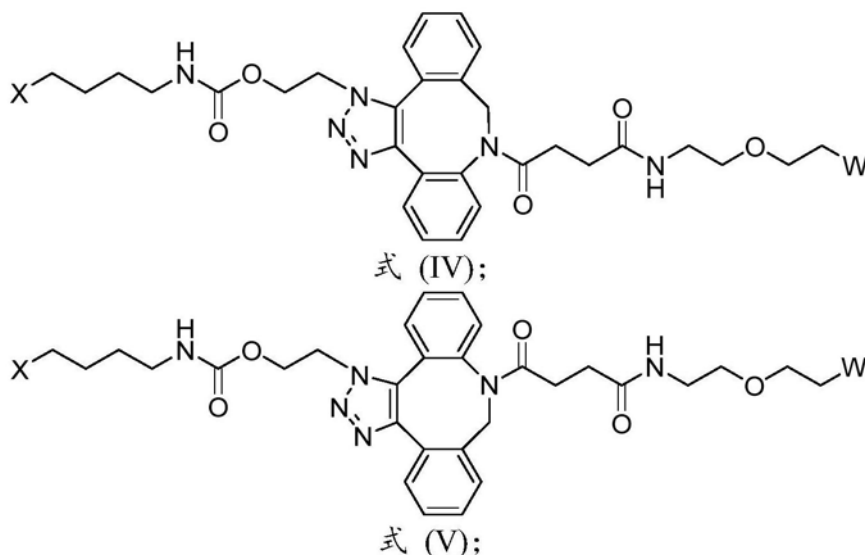
或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列。

[0146] 在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中[AzK_L1_PEG30kD]具有式(V)的结构:



在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列。

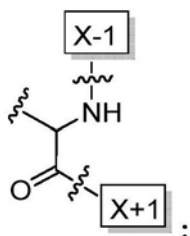
[0147] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:40-44中任一个的氨基酸序列,其中[Azk_L1_PEG]是式 (IV) 和式 (V) 的结构混合物:



其中:

W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



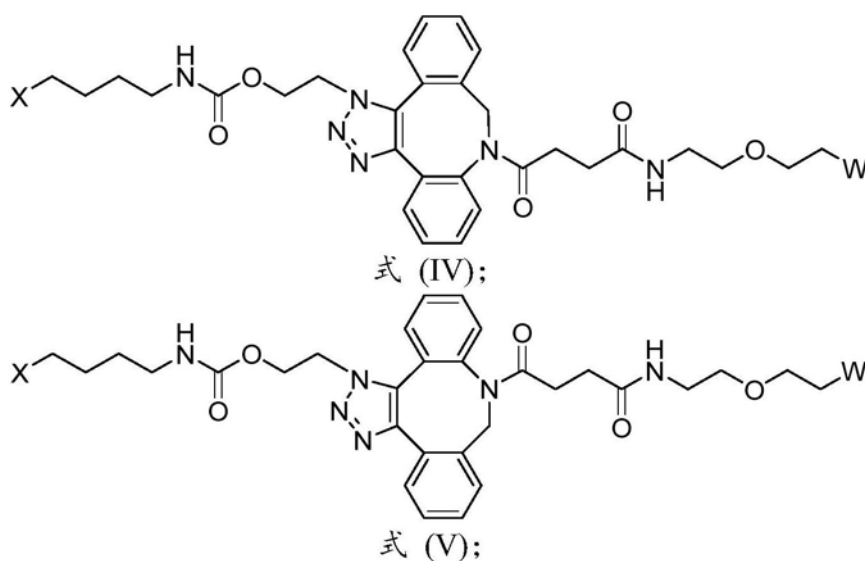
X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点;

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0148] 在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_L1_PEG]的总量的式(IV)的结构的量与式(V)的结构的量的比率为约1:1。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_L1_PEG]的总量的式(IV)的结构的量与式(V)的结构的量的比率大于1:1。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_L1_PEG]的总量的式(IV)的结构的量与式(V)的结构的量的比率小于1:1。

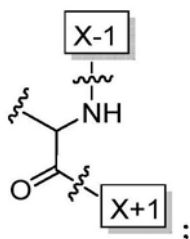
[0149] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:45至49中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG5kD]是式(IV)和式(V)的结构的混合物:



其中:

W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

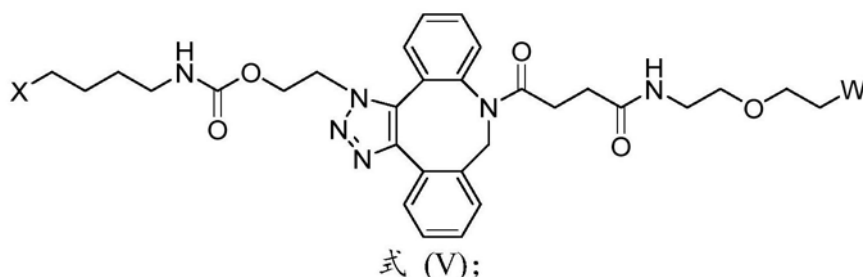
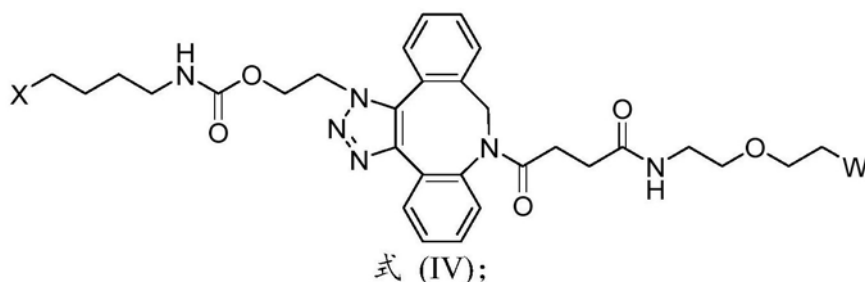
X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点;

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0150] 在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_L1_PEG5kD]的总量的式(IV)的结构的量与式(V)的结构的量的比率为约1:1。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_L1_PEG5kD]的总量的式(IV)的结构的量与式(V)的结构的量的比率大于1:1。

在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_L1_PEG5kD]的总量的式(IV)的结构的量与式(V)的结构的量的比率小于1:1。

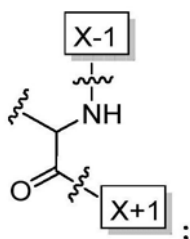
[0151] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2 缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述 IL-2 缀合物包含 SEQ ID NO:50-54 中任一个的氨基酸序列,其中 [AzK_L1_PEG30kD] 是式 (IV) 和式 (V) 的结构的混合物:



其中:

W 是具有 30kDa 的平均分子量的 PEG 基团;并且

X 具有以下结构:



X-1 指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1 指示与下一个氨基酸残基的附接点;

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

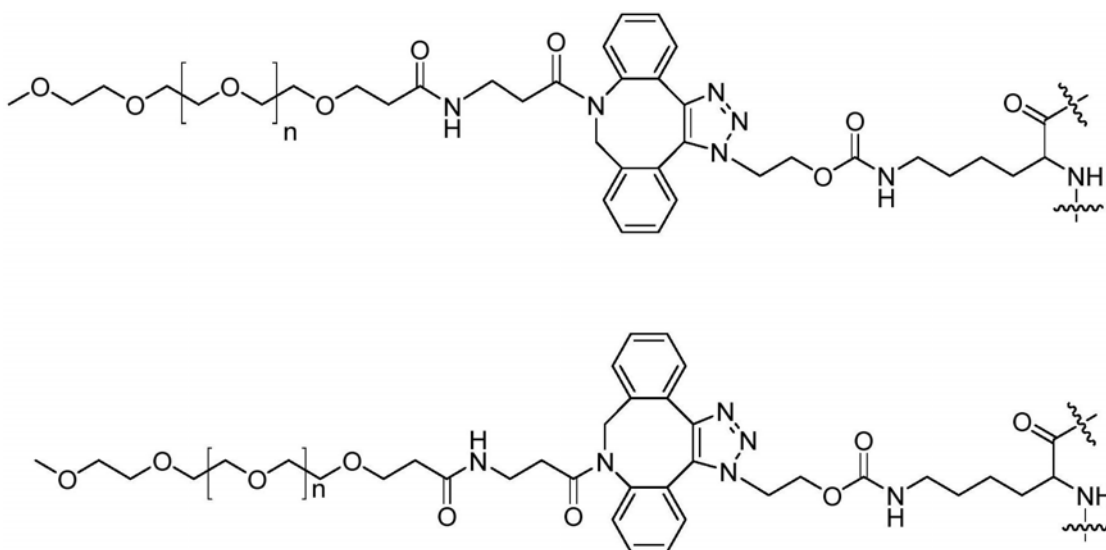
[0152] 在一些实施方案中,所述方法使用 IL-2 缀合物,其中在所述 IL-2 缀合物中构成 [AzK_L1_PEG30kD] 的总量的式 (IV) 的结构的量与式 (V) 的结构的量的比率为约 1:1。在一些实施方案中,所述方法使用 IL-2 缀合物,其中在所述 IL-2 缀合物中构成 [AzK_L1_PEG30kD] 的总量的式 (IV) 的结构的量与式 (V) 的结构的量的比率大于 1:1。在一些实施方案中,所述方法使用 IL-2 缀合物,其中在所述 IL-2 缀合物中构成 [AzK_L1_PEG30kD] 的总量的式 (IV) 的结构的量与式 (V) 的结构的量的比率小于 1:1。

[0153] 在一些实施方案中,所述方法使用 IL-2 缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的 W 是具有选自 5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa 和 30kDa 的平均分子量的 PEG 基团。在一些实施方案中,所述方法使用 IL-2 缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的 W 是具有 5kDa 的平均分子量的 PEG 基团。在一些实施方案中,所述方法使用 IL-2 缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的 W 是具有 30kDa 的平均分子量的 PEG 基团。在一些实施方案中,所述方法使用 IL-2 缀合

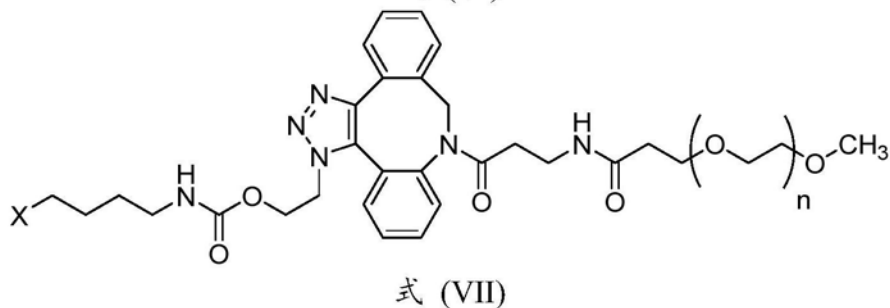
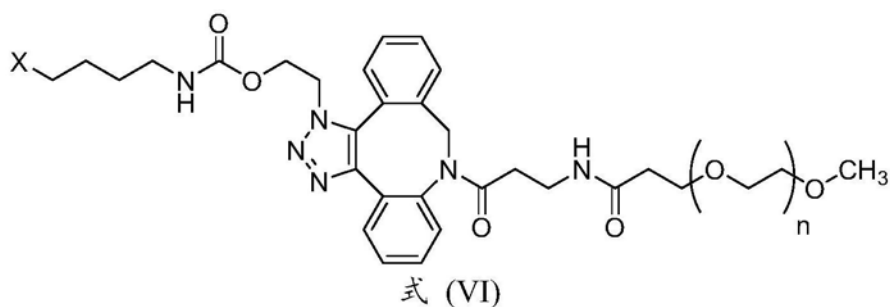
物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是具有10kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是具有15kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是具有20kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是具有25kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是具有35kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是具有40kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是具有45kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是具有50kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是具有55kDa的平均分子量的PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是具有60kDa的平均分子量的PEG基团。

[0154] 在一些实施方案中,所述方法使用本文所述的IL-2缀合物,其包含式 (IV) 或式 (V) 或者式 (IV) 和式 (V) 的混合物的结构,其中W是线性或分支PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是线性PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是分支PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的W是线性或分支的甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的甲氧基PEG基团是线性的。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式 (IV) 或式 (V) 的结构中的甲氧基PEG基团是分支的。

[0155] 关于在本文所述的方法中使用的IL-2缀合物,甲氧基PEG基团的示例性结构说明于实施例2的方案1中的mPEG-DBCO结构中。甲氧基PEG基团的示例性结构说明于下面的mPEG-DBCO结构中:

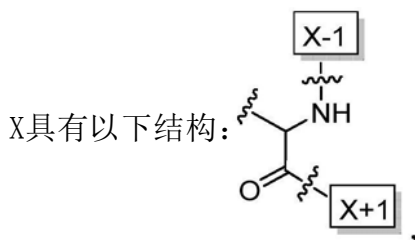


[0156] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物是包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式 (VI) 或式 (VII) 或者式 (VI) 和式 (VII) 的混合物的结构替代:



其中:

n是在从约2至约5000范围内的整数;并且



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

在一些实施方案中,所述IL-2缀合物是药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0157] 在这里和自始至终,式 (VI) 的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在这里和自始至终,式 (VII) 的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0158] 在一些实施方案中,式 (VI) 和式 (VII) 的化合物中的n在从约5至约4600、或从约10至约4000、或从约20至约3000、或从约100至约3000、或从约100至约2900、或从约150至约2900、或从约125至约2900、或从约100至约2500、或从约100至约2000、或从约100至约1900、或从约100至约1850、或从约100至约1750、或从约100至约1650、或从约100至约1500、或从约100至约1400、或从约100至约1300、或从约100至约1250、或从约100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、

或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的范围内。在一些实施方案中,式(VI)和式(VII)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。

[0159] 在一些实施方案中,式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71,其中式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是参考在SEQ ID NO:3中的位置。在一些实施方案中,式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71。在一些实施方案中,式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置K34处。在一些实施方案中,式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置F41处。在一些实施方案中,式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置F43处。在一些实施方案中,式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置K42处。在一些实施方案中,式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置E61处。在一些实施方案中,式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置P64处。在一些实施方案中,式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置R37处。在一些实施方案中,式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置T40处。在一些实施方案中,式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置E67处。在一些实施方案中,式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置Y44处。在一些实施方案中,式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置V68处。在一些实施方案中,式(VI)、式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置L71处。

[0160] 在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(VI)的结构与式(VII)的结构的量的比率为约1:1。在一些实施方案中,所述方法

使用IL-2缀合物,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(VI)的结构与式(VII)的结构的量的比率大于1:1。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(VI)的结构与式(VII)的结构的量的比率小于1:1。

[0161] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VI)或式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71,并且其中n是从100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的整数。在一些实施方案中,式(VI)和式(VII)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。

[0162] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VI)或式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,式(VI)和式(VII)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137和1249的整数。

[0163] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VI)或式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,式(VI)和式(VII)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0164] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VI)或式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一

些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(VI)和式(VII)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。在一些实施方案中,n是从约500至约1000。在一些实施方案中,n是从约550至约800。在一些实施方案中,n是约681。

[0165] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VI)或式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,式(VI)和式(VII)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。在一些实施方案中,n是从约500至约1000。在一些实施方案中,n是从约550至约800。在一些实施方案中,n是约681。

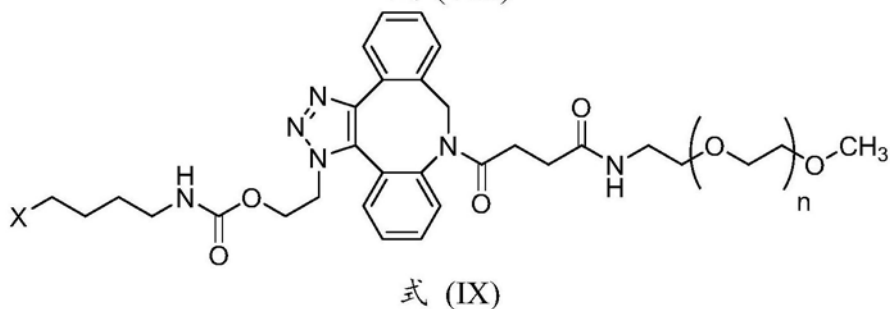
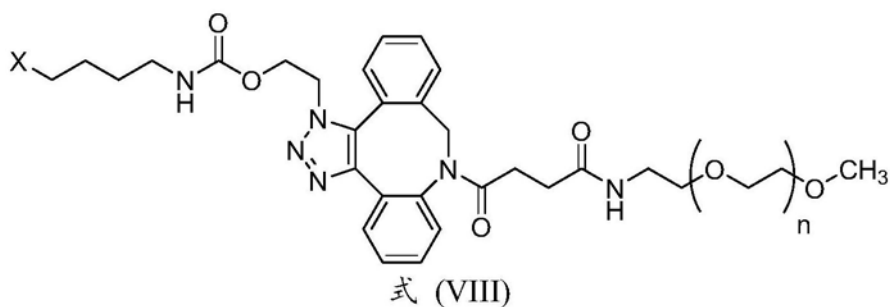
[0166] 在一些实施方案中,式(VI)和式(VII)的结构中的n是使得PEG部分的分子量在从约1,000道尔顿至约200,000道尔顿、或从约2,000道尔顿至约150,000道尔顿、或从约3,000道尔顿至约125,000道尔顿、或从约4,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约90,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约80,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约65,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约30,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约30,000道尔顿范围内的整数。

[0167] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VI)或式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构替代,其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约60,000道尔顿、约70,000道尔顿、约80,000道尔顿、约90,000道尔顿、约100,000道尔顿、约125,000道尔顿、约150,000道尔顿、约175,000道尔顿或约200,000道尔顿的整数。

[0168] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,

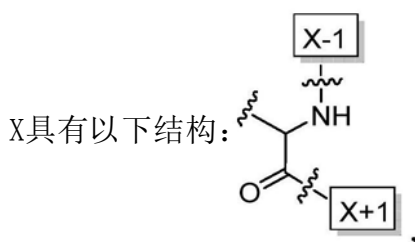
其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VI)或式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构替代,其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿或约50,000道尔顿的整数。

[0169] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物是包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VIII)或式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构替代:



其中:

n是在从约2至约5000范围内的整数;并且



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

在一些实施方案中,所述IL-2缀合物是药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0170] 在这里和自始至终,式(VIII)的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在这里和自始至终,式(IX)的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0171] 在一些实施方案中,式(VIII)和式(IX)的化合物中的n在从约5至约4600、或从约10至约4000、或从约20至约3000、或从约100至约3000、或从约100至约2900、或从约150至约2900、或从约125至约2900、或从约100至约2500、或从约100至约2000、或从约100至约1900、或从约100至约1850、或从约100至约1750、或从约100至约1650、或从约100至约1500、或从约100至约1400、或从约100至约1300、或从约100至约1250、或从约100至约1150、或从约100

至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的范围内。在一些实施方案中,式(VIII)和式(IX)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。

[0172] 在一些实施方案中,式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71,其中式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是参考在SEQ ID NO:3中的位置。在一些实施方案中,式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71。在一些实施方案中,式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置K34处。在一些实施方案中,式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置F41处。在一些实施方案中,式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置F43处。在一些实施方案中,式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置K42处。在一些实施方案中,式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置E61处。在一些实施方案中,式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置P64处。在一些实施方案中,式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置R37处。在一些实施方案中,式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置T40处。在一些实施方案中,式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置E67处。在一些实施方案中,式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置Y44处。在一些实施方案中,式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置V68

处。在一些实施方案中,式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置L71处。

[0173] 在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(VIII)的结构的量与式(IX)的结构的量的比率为约1:1。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(VIII)的结构的量与式(IX)的结构的量的比率大于1:1。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(VIII)的结构的量与式(IX)的结构的量的比率小于1:1。

[0174] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VIII)或式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71,并且其中n是从100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的整数。在一些实施方案中,式(VIII)和式(IX)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。

[0175] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VIII)或式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,式(VIII)和式(IX)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137和1249的整数。

[0176] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VIII)或式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,式(VIII)和式(IX)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0177] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VIII)或式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,式(VIII)和式(IX)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。在一些实施方案中,n是从约500至约1000。在一些实施方案中,n是从约550至约800。在一些实施方案中,n是约681。

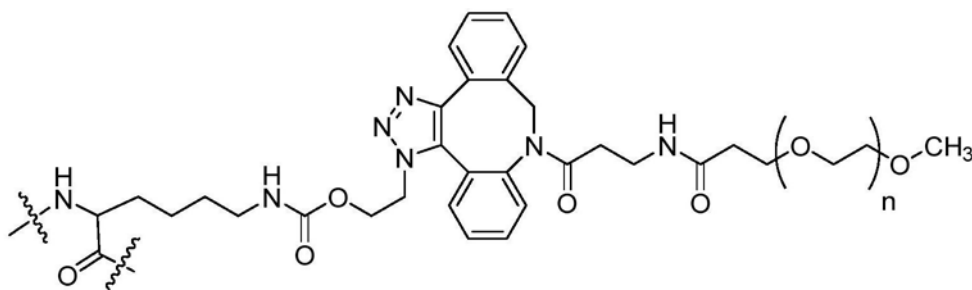
[0178] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VIII)或式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,式(VIII)和式(IX)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。在一些实施方案中,n是从约500至约1000。在一些实施方案中,n是从约550至约800。在一些实施方案中,n是约681。

[0179] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物是包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VIII)或式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构替代,其中n是使得PEG部分的分子量在从约1,000道尔顿至约200,000道尔顿、或从约2,000道尔顿至约150,000道尔顿、或从约3,000道尔顿至约125,000道尔顿、或从约4,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约90,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约80,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约65,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约30,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约30,000道尔顿范围内的整数。

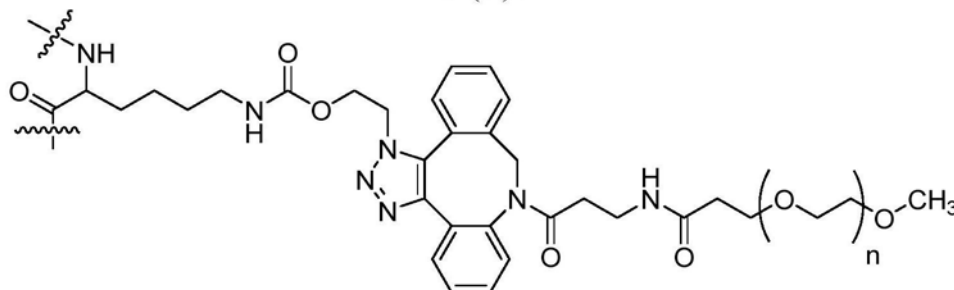
[0180] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VIII)或式(IX)或者式(VIII)和式

(IX)的混合物的结构替代,其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约60,000道尔顿、约70,000道尔顿、约80,000道尔顿、约90,000道尔顿、约100,000道尔顿、约125,000道尔顿、约150,000道尔顿、约175,000道尔顿或约200,000道尔顿的整数。在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VIII)或式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构替代,其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿或约50,000道尔顿的整数。

[0181] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构替代:



式 (X);



式 (XI);

其中:

n是在从约2至约5000范围内的整数;并且

波浪线指示与SEQ ID NO:3内未被替代的氨基酸残基的共价键。

[0182] 在这里和自始至终,式(X)的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在这里和自始至终,式(XI)的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物是药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0183] 在一些实施方案中,式(X)和式(XI)内手性中心的立体化学是外消旋的,是富含(R)的,是富含(S)的,基本上是(R),基本上是(S),是(R)或者是(S)。在一些实施方案中,式(X)和式(XI)内手性中心的立体化学是外消旋的。在一些实施方案中,式(X)和式(XI)内手性中心的立体化学是富含(R)的。在一些实施方案中,式(X)和式(XI)内手性中心的立体化学是富含(S)的。在一些实施方案中,式(X)和式(XI)内手性中心的立体化学基本上是(R)。

在一些实施方案中,式(X)和式(XI)内手性中心的立体化学基本上是(S)。在一些实施方案中,式(X)和式(XI)内手性中心的立体化学是(R)。在一些实施方案中,式(X)和式(XI)内手性中心的立体化学是(S)。

[0184] 在一些实施方案中,式(X)和式(XI)的化合物中的n在从约5至约4600、或从约10至约4000、或从约20至约3000、或从约100至约3000、或从约100至约2900、或从约150至约2900、或从约125至约2900、或从约100至约2500、或从约100至约2000、或从约100至约1900、或从约100至约1850、或从约100至约1750、或从约100至约1650、或从约100至约1500、或从约100至约1400、或从约100至约1300、或从约100至约1250、或从约100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的范围内。在一些实施方案中,式(X)和式(XI)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。

[0185] 在一些实施方案中,式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71,其中式(X)、式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是参考在SEQ ID NO:3中的位置。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71。在一些实施方案中,式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置K34处。在一些实施方案中,式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置F41处。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置F43处。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置K42处。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置E61处。在一些实施方案中,式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物

的氨基酸序列中的位置是在位置P64处。在一些实施方案中,式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置R37处。在一些实施方案中,式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置T40处。在一些实施方案中,式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置E67处。在一些实施方案中,式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置Y44处。在一些实施方案中,式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置V68处。在一些实施方案中,式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置L71处。

[0186] 在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(X)的结构的量与式(XI)的结构的量的比率为约1:1。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(X)的结构的量与式(XI)的结构的量的比率大于1:1。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(X)的结构的量与式(XI)的结构的量的比率小于1:1。

[0187] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71,并且其中n是从100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的整数。在一些实施方案中,式(VI)和式(VII)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。

[0188] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,式(X)和式(XI)的化合物中的n是选自454、455、568、569、

680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137和1249的整数。

[0189] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,式(X)和式(XI)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0190] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,所述方法使用IL-2缀合物,其中式(X)和式(XI)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。在一些实施方案中,n是从约500至约1000。在一些实施方案中,n是从约550至约800。在一些实施方案中,n是约681。

[0191] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,式(X)和式(XI)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。在一些实施方案中,n是从约500至约1000。在一些实施方案中,n是从约550至约800。在一些实施方案中,n是约681。

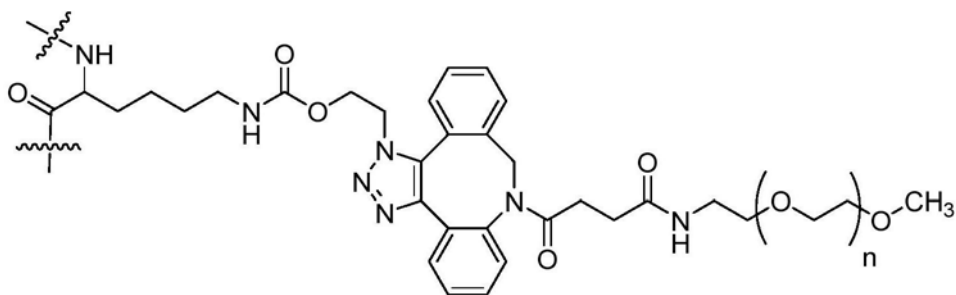
[0192] 在一些实施方案中,式(X)和式(XI)的结构中的n是使得PEG部分的分子量在从约1,000道尔顿至约200,000道尔顿、或从约2,000道尔顿至约150,000道尔顿、或从约3,000道尔顿至约125,000道尔顿、或从约4,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约90,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约80,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约65,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约30,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约30,

000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约30,000道尔顿范围内的整数。

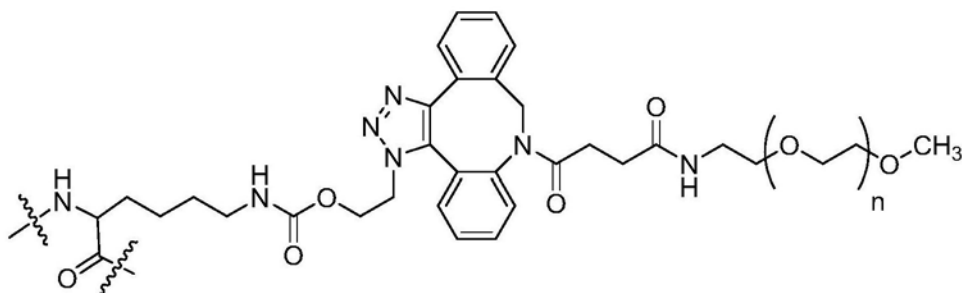
[0193] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构替代,其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约60,000道尔顿、约70,000道尔顿、约80,000道尔顿、约90,000道尔顿、约100,000道尔顿、约125,000道尔顿、约150,000道尔顿、约175,000道尔顿或约200,000道尔顿的整数。

[0194] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构替代,其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿或约50,000道尔顿的整数。

[0195] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物是包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构替代:



式 (XII);



式 (XIII);

其中:

n是在从约2至约5000范围内的整数;并且

波浪线指示与SEQ ID NO:3内未被替代的氨基酸残基的共价键。

[0196] 在这里和自始至终,式(XII)的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在这里和自始至终,式(XIII)的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在

一些实施方案中,所述IL-2缀合物是药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0197] 在一些实施方案中,式(XII)和式(XIII)内手性中心的立体化学是外消旋的,是富含(R)的,是富含(S)的,基本上是(R),基本上是(S),是(R)或者是(S)。在一些实施方案中,式(XII)和式(XIII)内手性中心的立体化学是外消旋的。在一些实施方案中,式(XII)和式(XIII)内手性中心的立体化学是富含(R)的。在一些实施方案中,式(XII)和式(XIII)内手性中心的立体化学是富含(S)的。在一些实施方案中,式(XII)和式(XIII)内手性中心的立体化学基本上是(R)。在一些实施方案中,式(XII)和式(XIII)内手性中心的立体化学基本上是(S)。在一些实施方案中,式(XII)和式(XIII)内手性中心的立体化学是(R)。在一些实施方案中,式(XII)和式(XIII)内手性中心的立体化学是(S)。

[0198] 在一些实施方案中,式(XII)和式(XIII)的化合物中的n在从约5至约4600、或从约10至约4000、或从约20至约3000、或从约100至约3000、或从约100至约2900、或从约150至约2900、或从约125至约2900、或从约100至约2500、或从约100至约2000、或从约100至约1900、或从约100至约1850、或从约100至约1750、或从约100至约1650、或从约100至约1500、或从约100至约1400、或从约100至约1300、或从约100至约1250、或从约100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的范围内。在一些实施方案中,式(XII)和(XIII)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。

[0199] 在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71,其中式(XII)、式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是参考在SEQ ID NO:3中的位置。在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71。在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置K34处。在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置F41处。在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式

(XIII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置F43处。在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置K42处。在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置E61处。在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和(XIII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置P64处。在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置R37处。在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置T40处。在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置E67处。在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置Y44处。在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置V68处。在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是在位置L71处。

[0200] 在一些实施方案中,构成所述IL-2缀合物的总量的式(XII)的结构的量与式(XIII)的结构的量的比率为约1:1。在一些实施方案中,构成所述IL-2缀合物的总量的式(XII)的结构的量与式(XIII)的结构的量的比率大于1:1。在一些实施方案中,构成所述IL-2缀合物的总量的式(XII)的结构的量与式(XIII)的结构的量的比率小于1:1。

[0201] 在一些实施方案中,本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71,并且其中n是从100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的整数。在一些实施方案中,式(XII)和式(XIII)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、

2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。

[0202] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,式(XII)和式(XIII)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137和1249的整数。

[0203] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,式(XII)和式(XIII)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0204] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,式(XII)和式(XIII)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。在一些实施方案中,n是从约500至约1000。在一些实施方案中,n是从约550至约800。在一些实施方案中,n是约681。

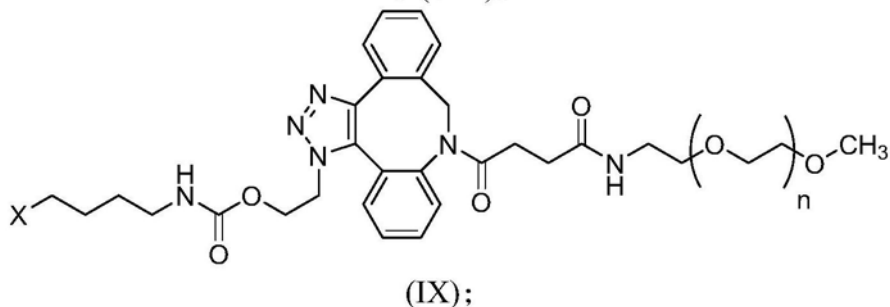
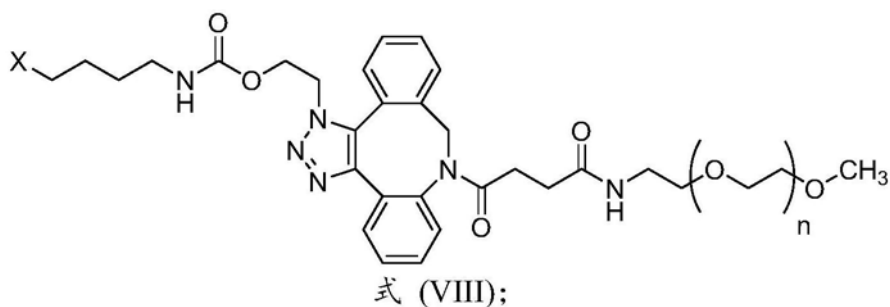
[0205] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在一些实施方案中,式(XII)和式(XIII)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。在一些实施方案中,n是从约500至约1000。在一些实施方案中,n是从约550至约800。在一些实施方案中,n是约681。

[0206] 在一些实施方案中,式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的结构中的n是使得PEG部分的分子量在从约1,000道尔顿至约200,000道尔顿、或从约2,000道尔顿至约150,000道尔顿、或从约3,000道尔顿至约125,000道尔顿、或从约4,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约90,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约80,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约65,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约40,

000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约30,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约30,000道尔顿范围内的整数。

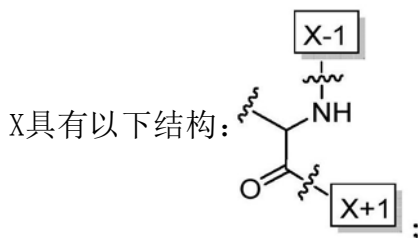
[0207] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构替代,其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约60,000道尔顿、约70,000道尔顿、约80,000道尔顿、约90,000道尔顿、约100,000道尔顿、约125,000道尔顿、约150,000道尔顿、约175,000道尔顿或约200,000道尔顿的整数。本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构替代,其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿或约50,000道尔顿的整数。

[0208] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种PD-1抑制剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中在所述IL-2缀合物中E61或P64处的氨基酸残基被式(VIII)或式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构替代:



其中:

n是使得PEG基团的分子量为从约15,000道尔顿至约60,000道尔顿的整数;并且



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

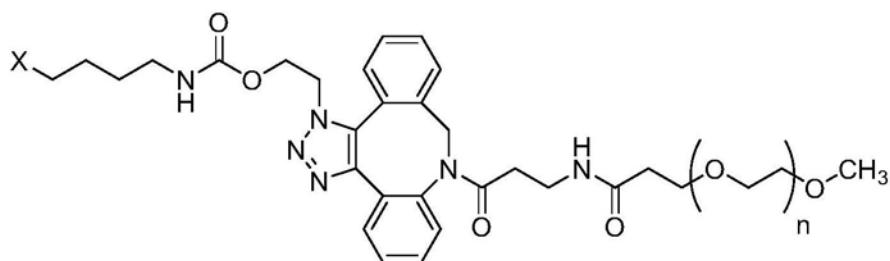
X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

[0209] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物是药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

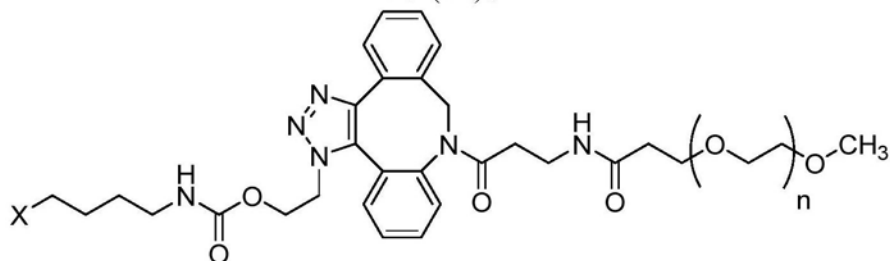
[0210] 在一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中E61处的氨基酸残基被式(VIII)或式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团的分子量为从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿的整数。在一些实施方案中,n是使得PEG基团的分子量为从约30,000道尔顿的整数。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗、纳武单抗或西米普利单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是纳武单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是西米普利单抗。

[0211] 在一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中P64处的氨基酸残基被式(VIII)或式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团的分子量为从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿的整数。在一些实施方案中,n是使得PEG基团的分子量为从约30,000道尔顿的整数。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗、纳武单抗或西米普利单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是纳武单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是西米普利单抗。

[0212] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种PD-1抑制剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中在所述IL-2缀合物中E61或P64处的氨基酸残基被式(VI)或式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构替代:



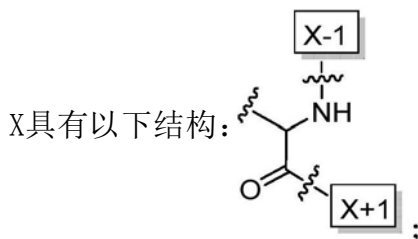
式 (VI);



(VII);

其中:

n是使得PEG基团的分子量为从约15,000道尔顿至约60,000道尔顿的整数;并且



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

在一些实施方案中,所述IL-2缀合物是药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0213] 在一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中E61处的氨基酸残基被式 (VI) 或式 (VII) 或者式 (VI) 和式 (VII) 的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团的分子量为从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿的整数。在一些实施方案中,n是使得PEG基团的分子量为从约30,000道尔顿的整数。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗、纳武单抗或西米普利单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是纳武单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是西米普利单抗。

[0214] 在一些实施方案中,在所述IL-2缀合物中P64处的氨基酸残基被式 (VI) 或式 (VII) 或者式 (VI) 和式 (VII) 的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团的分子量为从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿的整数。在一些实施方案中,n是使得PEG基团的分子量为从约30,000道尔顿的整数。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗、纳武单抗或西米普利单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是纳武单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是西米普利单抗。

[0215] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗

有效量的 (a) IL-2 缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂, 其中所述 IL-2 缀合物是包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的 IL-2 缀合物, 其中所述 IL-2 缀合物中的至少一个氨基酸残基被共价键合至 PEG 基团的半胱氨酸替代。在一些实施方案中, 所述 PEG 基团具有选自 5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa 和 60kDa 的分子量。在一些实施方案中, 所述 PEG 基团具有 5kDa 的分子量。在一些实施方案中, 所述 PEG 基团具有 10kDa 的分子量。在一些实施方案中, 所述 PEG 基团具有 15kDa 的分子量。在一些实施方案中, 所述 PEG 基团具有 20kDa 的分子量。在一些实施方案中, 所述 PEG 基团具有 25kDa 的分子量。在一些实施方案中, 所述 PEG 基团具有 30kDa 的分子量。在一些实施方案中, 所述 PEG 基团具有 35kDa 的分子量。在一些实施方案中, 所述 PEG 基团具有 40kDa 的分子量。在一些实施方案中, 所述 PEG 基团具有 45kDa 的分子量。在一些实施方案中, 所述 PEG 基团具有 50kDa 的分子量。在一些实施方案中, 所述 PEG 基团具有 60kDa 的分子量。在一些实施方案中, 所述 IL-2 缀合物包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列, 并且在所述 IL-2 缀合物中被半胱氨酸替代的所述至少一个氨基酸残基选自 K34、T36、R37、T40、F41、K42、F43、Y44、E60、E61、E67、K63、P64、V68、L71 和 Y106。在一些实施方案中, 所述 IL-2 缀合物包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列, 并且在所述 IL-2 缀合物中被半胱氨酸替代的所述至少一个氨基酸残基选自 K34、T40、F41、K42、Y44、E60、E61、E67、K63、P64、V68 和 L71。在一些实施方案中, 所述 IL-2 缀合物包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列, 并且在所述 IL-2 缀合物中被半胱氨酸替代的所述至少一个氨基酸残基选自 K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72 和 Y107。

[0216] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2 缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂, 其中所述 IL-2 缀合物是包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的 IL-2 缀合物, 其中至少一个非赖氨酸残基被包含接头和水溶性聚合物的赖氨酸替代。在一些实施方案中, 所述水溶性聚合物是 PEG 基团。

[0217] 在一些实施方案中, 所述 IL-2 缀合物包含经由不可释放的连接共价键合的 PEG 基团。在一些实施方案中, 所述 IL-2 缀合物包含不可释放的共价键合的 PEG 基团。

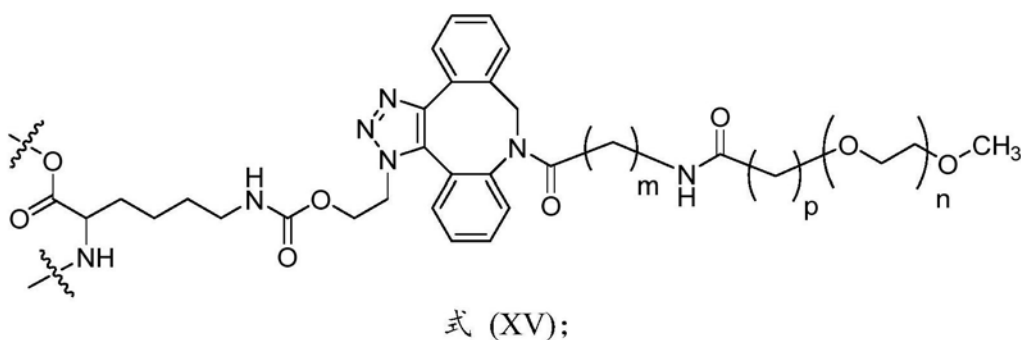
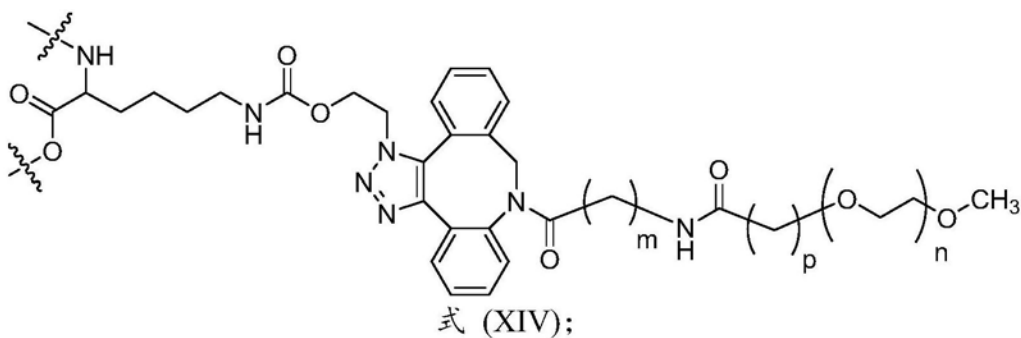
[0218] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2 缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂, 其中所述 IL-2 缀合物具有 SEQ ID NO:3, 其中所述 IL-2 缀合物中的非赖氨酸氨基酸被赖氨酸残基替代, 并且其中所述赖氨酸残基包含一种或多种水溶性聚合物和共价接头。在一些实施方案中, 所述赖氨酸残基位于 SEQ ID NO:3 的区域 K34-Y106 中。在一些实施方案中, 所述赖氨酸残基位于 K34 处。在一些实施方案中, 所述赖氨酸残基位于 F41 处。在一些实施方案中, 所述赖氨酸残基位于 F43 处。在一些实施方案中, 所述赖氨酸残基位于 K42 处。在一些实施方案中, 所述赖氨酸残基位于 E61 处。在一些实施方案中, 所述赖氨酸残基位于 P64 处。在一些实施方案中, 所述赖氨酸残基位于 R37 处。在一些实施方案中, 所述赖氨酸残基位于 T40 处。在一些实施方案中, 所述赖氨酸残基位于 E67 处。在一些实施方案中, 所述赖氨酸残基位于 Y44 处。在一些实施方案中, 所述赖氨酸残基位于 V68 处。在一些实施方案中, 所述赖氨酸残基位于 L71 处。

[0219] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2 缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂, 其中所述 IL-2 缀合物具有 SEQ ID NO:3, 其中所述 IL-2 缀合物中的非赖氨酸氨基酸被赖氨酸残基替代, 并且其中所述赖氨酸残基包含一种或多种水溶性聚合物和共价接头。在一些实施方案中, 所述赖氨酸残基位于

SEQ ID NO:3的区域K34-Y106中。在一些实施方案中,所述赖氨酸残基位于K34处。在一些实施方案中,所述赖氨酸残基位于F41处。在一些实施方案中,所述赖氨酸残基位于F43处。在一些实施方案中,所述赖氨酸残基位于K42处。在一些实施方案中,所述赖氨酸残基位于E61处。在一些实施方案中,所述赖氨酸残基位于P64处。在一些实施方案中,所述赖氨酸残基位于R37处。在一些实施方案中,所述赖氨酸残基位于T40处。在一些实施方案中,所述赖氨酸残基位于E67处。在一些实施方案中,所述赖氨酸残基位于Y44处。在一些实施方案中,所述赖氨酸残基位于V68处。在一些实施方案中,所述赖氨酸残基位于L71处。

[0220] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物是白介素-2(IL-2)变体,其中所述IL-2变体的氨基酸序列中的非赖氨酸氨基酸被包含以下的氨基酸替代:(a) 赖氨酸; (b) 共价接头; 和(3) 和一种或多种水溶性聚合物。在一些实施方案中,一种或多种水溶性聚合物包括PEG基团。

[0221] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物是包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XIV)或式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构替代:



其中:

m是从0至20的整数;

p是从0至20的整数;

n是在从约2至约5000范围内的整数;并且

波浪线指示与SEQ ID NO:3内未被替代的氨基酸残基的共价键。

[0222] 在这里和自始至终,式(XIV)的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在这里和自始至终,式(XV)的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物是药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0223] 在一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)内手性中心的立体化学是外消旋的,是富含(R)的,是富含(S)的,基本上是(R),基本上是(S),是(R)或者是(S)。在一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)内手性中心的立体化学是外消旋的。在一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)内手性中心的立体化学是富含(R)的。在一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)内手性中心的立体化学是富含(S)的。在一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)内手性中心的立体化学基本上是(R)。在一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)内手性中心的立体化学基本上是(S)。在一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)内手性中心的立体化学是(R)。在一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)内手性中心的立体化学是(S)。

[0224] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是从0至20、或从1至18、或从1至16、或从1至14、或从1至12、或从1至10、或从1至9、或从1至8、或从1至7、或从1至6、或从1至5、或从1至4、或从1至3、或从1至2。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是1。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是2。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是3。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是4。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是5。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是6。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是7。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是8。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是9。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是10。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是11。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是12。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是13。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是14。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是15。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是16。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是17。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是18。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是19。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是20。

[0225] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是从1至20、或从1至18、或从1至16、或从1至14、或从1至12、或从1至10、或从1至9、或从1至8、或从1至7、或从1至6、或从1至5、或从1至4、或从1至3、或从1至2。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是1。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是2。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是3。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是4。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是5。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是6。在本文所述的IL-2缀合物的

一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是7。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是8。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是9。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是10。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是11。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是12。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是13。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是14。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是15。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是16。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是17。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是18。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是19。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的p是20。

[0226] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中式(XIV)和式(XV)的化合物中的n在从约5至约4600、或从约10至约4000、或从约20至约3000、或从约100至约3000、或从约100至约2900、或从约150至约2900、或从约125至约2900、或从约100至约2500、或从约100至约2000、或从约100至约1900、或从约100至约1850、或从约100至约1750、或从约100至约1650、或从约100至约1500、或从约100至约1400、或从约100至约1300、或从约100至约1250、或从约100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的范围内。

[0227] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中式(XIV)和式(XV)的化合物中的m是从1至6的整数,p是从1至6的整数,并且n是选自113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136和1137的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,在式(XIV)和式(XV)的化合物中,m是从2至6的整数,p是从2至6的整数,并且n是选自113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136和1137的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,在式(XIV)和式(XV)的化合物中,m是从2至4的整数,p是从2至4的整数,并且n是选自113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136和1137的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,在式

(XIV) 和式 (XV) 的化合物中, m 是 1, p 是 2, 并且 n 是选自 113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136 和 1137 的整数。在本文所述的 IL-2 缀合物的一些实施方案中, 在式 (XIV) 和式 (XV) 的化合物中, m 是 2, p 是 2, 并且 n 是选自 113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136 和 1137 的整数。在本文所述的 IL-2 缀合物的一些实施方案中, 在式 (XIV) 和式 (XV) 的化合物中, m 是 3, p 是 2, 并且 n 是选自 113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136 和 1137 的整数。在本文所述的 IL-2 缀合物的一些实施方案中, 在式 (XIV) 和式 (XV) 的化合物中, m 是 4, p 是 2, 并且 n 是选自 113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136 和 1137 的整数。在本文所述的 IL-2 缀合物的一些实施方案中, 在式 (XIV) 和式 (XV) 的化合物中, m 是 5, p 是 2, 并且 n 是选自 113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136 和 1137 的整数。在本文所述的 IL-2 缀合物的一些实施方案中, 在式 (XIV) 和式 (XV) 的化合物中, m 是 6, p 是 2, 并且 n 是选自 113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136 和 1137 的整数。在本文所述的 IL-2 缀合物的一些实施方案中, 在式 (XIV) 和式 (XV) 的化合物中, m 是 7, p 是 2, 并且 n 是选自 113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136 和 1137 的整数。在本文所述的 IL-2 缀合物的一些实施方案中, 在式 (XIV) 和式 (XV) 的化合物中, m 是 8, p 是 2, 并且 n 是选自 113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136 和 1137 的整数。在本文所述的 IL-2 缀合物的一些实施方案中, 在式 (XIV) 和式 (XV) 的化合物中, m 是 9, p 是 2, 并且 n 是选自 113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136 和 1137 的整数。在本文所述的 IL-2 缀合物的一些实施方案中, 在式 (XIV) 和式 (XV) 的化合物中, m 是 10, p 是 2, 并且 n 是选自 113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136 和 1137 的整数。在本文所述的 IL-2 缀合物的一些实施方案中, 在式 (XIV) 和式 (XV) 的化合物中, m 是 11, p 是 2, 并且 n 是选自 113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136 和 1137 的整数。在本文所述的 IL-2 缀合物的一些实施方案中, 在式 (XIV) 和式 (XV) 的化合物中, m 是 11, p 是 2, 并且 n 是选自 113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136 和 1137 的整数。在本文所述的 IL-2 缀合物的一些实施方案中, 在式 (XIV) 和式 (XV) 的化合物中, m 是 2, p 是 2, 并且 n 是选自 680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136 和 1137 的整数。

[0228] 在一些实施方案中, 所述方法使用包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的 IL-2 缀合物, 其中式 (XIV) 和式 (XV) 的化合物中的 n 是选自 2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、

2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)或式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71,其中式(XIV)、式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是参考在SEQ ID NO:3中的位置。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)、式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)、式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置K34处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)、式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置F41处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)、式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置F43处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)、式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置K42处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)、式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置E61处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)、式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置P64处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)、式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置R37处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)、式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置T40处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)、式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置E67处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)、式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置Y44处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)、式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置V68处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)、式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置L71处。

[0229] 在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,构成所述IL-2缀合物的总量的式(XIV)的结构的量与式(XV)的结构的量的比率为约1:1。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,构成所述IL-2缀合物的总量的式(XIV)的结构的量与式(XV)的结构的量的比率大于1:1。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,构成所述IL-2缀合物的总量的式(XIV)的结构的量与式(XV)的结构的量的比率小于1:1。

[0230] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物是包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XIV)或式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代

的所述氨基酸残基选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71,并且其中n是从100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。

[0231] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物是包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XIV)或式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137和1249的整数。

[0232] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XIV)或式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0233] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物是包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XIV)或式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910

的整数。在一些实施方案中,n是从约500至约1000。在一些实施方案中,n是从约550至约800。在一些实施方案中,n是约681。

[0234] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XIV)或式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XIV)和式(XV)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。在一些实施方案中,n是从约500至约1000。在一些实施方案中,n是从约550至约800。在一些实施方案中,n是约681。

[0235] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XIV)或式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构替代,其中n是使得PEG部分的分子量在从约1,000道尔顿至约200,000道尔顿、或从约2,000道尔顿至约150,000道尔顿、或从约3,000道尔顿至约125,000道尔顿、或从约4,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约90,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约80,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约65,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约30,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约30,000道尔顿范围内的整数。

[0236] 本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XIV)或式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构替代,其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约60,000道尔顿、约70,000道尔顿、约80,

000道尔顿、约90,000道尔顿、约100,000道尔顿、约125,000道尔顿、约150,000道尔顿、约175,000道尔顿或约200,000道尔顿的整数。

[0237] 本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XIV)或式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构替代,其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿或约50,000道尔顿的整数。

[0238] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XIV)或(XV)或者(XIV)和(XV)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,m是从1至6的整数,p是从1至6的整数,并且n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,在式(XIV)和(XV)的化合物中,m是2,p是2,并且n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137和1249的整数。

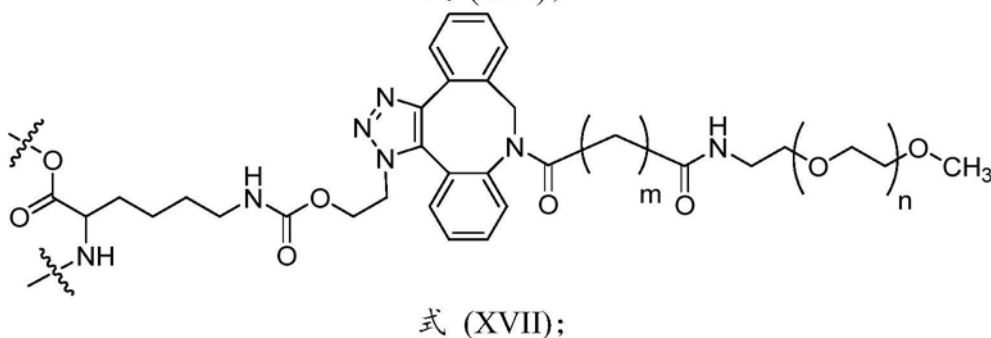
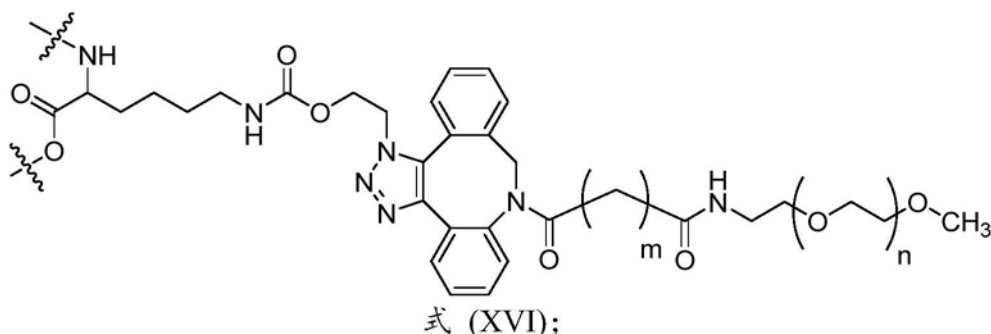
[0239] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XIV)或式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自E61和P64,并且其中m是从1至6的整数,p是从1至6的整数,并且n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,在式(XIV)和式(XV)的化合物中,m是2,p是2,并且n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0240] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XIV)或式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中m是从1至6的整数,p是从1至6的整数,并且n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,在式(XIV)和式(XV)的化合物中,m是2,p是2,并且n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。在一些实施方案中,n是从约500至约1000。在一些实施方案中,n是从约550至约800。在一些实施方案中,n是约681。

[0241] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XIV)或式(XV)或者式(XIV)和式(XV)的混合物的结构替代,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中m是从1至6的整数,p是从1至6的整数,并且n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些

实施方案中,在式 (XIV) 和式 (XV) 的化合物中,m是2,p是2,并且n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。在一些实施方案中,n是从约500至约1000。在一些实施方案中,n是从约550至约800。在一些实施方案中,n是约681。

[0242] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式 (XVI) 或式 (XVII) 或者式 (XVI) 和式 (XVII) 的混合物的结构替代:



其中:

m是从0至20的整数;

n是在从约2至约5000范围内的整数;并且

波浪线指示与SEQ ID NO:3内未被替代的氨基酸残基的共价键。

[0243] 在这里和自始至终,式 (XVI) 的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在这里和自始至终,式 (XVII) 的结构包括其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物是药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0244] 在一些实施方案中,式 (XVI) 和式 (XVII) 内手性中心的立体化学是外消旋的,是富含(R)的,是富含(S)的,基本上是(R),基本上是(S),是(R)或者是(S)。在一些实施方案中,式 (XVI) 和式 (XVII) 内手性中心的立体化学是外消旋的。在一些实施方案中,式 (XVI) 和式 (XVII) 内手性中心的立体化学是富含(R)的。在一些实施方案中,式 (XVI) 和式 (XVII) 内手性中心的立体化学是富含(S)的。在一些实施方案中,式 (XVI) 和式 (XVII) 内手性中心的立体化学基本上是(R)。在一些实施方案中,式 (XVI) 和式 (XVII) 内手性中心的立体化学基本上是(S)。在一些实施方案中,式 (XVI) 和式 (XVII) 内手性中心的立体化学是(R)。在一些实施方案中,式 (XVI) 和式 (XVII) 内手性中心的立体化学是(S)。

[0245] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中式 (XVI) 和式 (XVII) 的化合物中的m是从1至20、或从1至18、或从1至16、或从1至14、或从1至12、或从1至10、或从1至9、或从1至8、或从1至7、或从1至6、或从1至5、或从1至4、或从1

至3、或从1至2。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是1。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是2。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是3。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是4。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是5。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是6。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是7。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是8。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是9。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是10。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是11。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是12。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是13。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是14。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是15。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是16。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是17。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是18。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是19。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是20。

[0246] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中式(XVI)和式(XVII)的化合物中的n在从约5至约4600、或从约10至约4000、或从约20至约3000、或从约100至约3000、或从约100至约2900、或从约150至约2900、或从约125至约2900、或从约100至约2500、或从约100至约2000、或从约100至约1900、或从约100至约1850、或从约100至约1750、或从约100至约1650、或从约100至约1500、或从约100至约1400、或从约100至约1300、或从约100至约1250、或从约100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的范围内。

[0247] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中式(XVI)和式(XVII)的化合物中的m是从1至6的整数,并且n是选自113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、

[illegible]

1136和1137的整数。

[0248] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中式(XVI)和式(XVII)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71,其中式(I)的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是参考在SEQ ID NO:3中的位置。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置K34处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置F41处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置F43处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置K42处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置E61处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置P64处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置R37处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置T40处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置E67处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置Y44处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置V68处。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构在SEQ ID NO:3的IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置在位置L71处。

[0249] 在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,构成所述IL-2缀合物的总量的式(XVI)的结构的量与式(XVII)的结构的量的比率为约1:1。在本文所述的IL-2缀合物的一些

实施方案中,构成所述IL-2缀合物的总量的式(XVI)的结构的量与式(XVII)的结构的量的比率大于1:1。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,构成所述IL-2缀合物的总量的式(XVI)的结构的量与式(XVII)的结构的量的比率小于1:1。

[0250] 在一些实施方案中,所述方法使用包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构替代,选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71,并且其中n是从100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。

[0251] 在一些实施方案中,本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中在所述IL-2缀合物中被式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构替代的至少一个氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137和1249的整数。

[0252] 在一些实施方案中,本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中在所述IL-2缀合物中被式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构替代的至少一个氨基酸残基选自E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0253] 在一些实施方案中,本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物,其中在所述IL-2缀合物中被式(XVI)或式(XVII)或者式(XVI)和式(XVII)的混合物的结构替代的至少一个氨基酸残基是E61,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中,式(XVI)和式(XVII)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、

908、909和910的整数。在一些实施方案中，n是从约500至约1000。在一些实施方案中，n是从约550至约800。在一些实施方案中，n是约681。

[0254] 在一些实施方案中，本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物，其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式 (XVI) 或式 (XVII) 或者式 (XVI) 和式 (XVII) 的混合物的结构替代，被替代的是P64，并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中，式 (XVI) 和式 (XVII) 的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。在一些实施方案中，n是从约500至约1000。在一些实施方案中，n是从约550至约800。在一些实施方案中，n是约681。

[0255] 在一些实施方案中，本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物，其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式 (XVI) 或式 (XVII) 或者式 (XVI) 和式 (XVII) 的混合物的结构替代，其中n是使得PEG部分的分子量在从约1,000道尔顿至约200,000道尔顿、或从约2,000道尔顿至约150,000道尔顿、或从约3,000道尔顿至约125,000道尔顿、或从约4,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约90,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约80,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约65,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约30,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约30,000道尔顿范围内的整数。

[0256] 本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物，其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式 (XVI) 或式 (XVII) 或者式 (XVI) 和式 (XVII) 的混合物的结构替代，其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约60,000道尔顿、约70,000道尔顿、约80,000道尔顿、约90,000道尔顿、约100,000道尔顿、约125,000道尔顿、约150,000道尔顿、约175,000道尔顿或约200,000道尔顿的整数。本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物，其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式 (XVI) 或式 (XVII) 或者

式 (XVI) 和式 (XVII) 的混合物的结构替代, 其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿或约50,000道尔顿的整数。

[0257] 在一些实施方案中, 本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物, 其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式 (XVI) 或式 (XVII) 或者式 (XVI) 和式 (XVII) 的混合物的结构替代, 选自F41、F43、K42、E61和P64, m是从1至6的整数, 并且n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中, 在式 (XVI) 和式 (XVII) 的化合物中, m是2, 并且n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137和1249的整数。

[0258] 在一些实施方案中, 本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物, 其中在所述IL-2缀合物中被式 (XVI) 或式 (XVII) 或者式 (XVI) 和式 (XVII) 的混合物的结构替代的至少一个氨基酸残基选自E61和P64, 并且其中m是从1至6的整数, 并且n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中, 在式 (XVI) 和式 (XVII) 的化合物中, m是2, 并且n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0259] 在一些实施方案中, 本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物, 其中在所述IL-2缀合物中被式 (XVI) 或式 (XVII) 或者式 (XVI) 和式 (XVII) 的混合物的结构替代的至少一个氨基酸残基是E61, 并且其中m是从1至6的整数, 并且n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中, 在式 (XVI) 和式 (XVII) 的化合物中, m是2, 并且n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。在一些实施方案中, n是从约500至约1000。在一些实施方案中, n是从约550至约800。在一些实施方案中, n是约681。

[0260] 在一些实施方案中, 本文描述了包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2缀合物, 其中在所述IL-2缀合物中被式 (XVI) 或式 (XVII) 或者式 (XVI) 和式 (XVII) 的混合物的结构替代的至少一个氨基酸残基是P64, 并且其中m是从1至6的整数, 并且n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。在本文所述的IL-2缀合物的一些实施方案中, 在式 (XVI) 和式 (XVII) 的化合物中, m是2, 并且n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。在一些实施方案中, n是从约500至约1000。在一些实施方案中, n是从约550至约800。在一些实施方案中, n是约681。

[0261] 在一些实施方案中, 本文描述了治疗有需要的受试者的增殖性疾病或病症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的 (a) 表1所述的细胞因子缀合物 (例如, IL-2缀合物) 和 (b) 一种或多种另外的药剂。在一些实施方案中, 所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO.:1-98。在一些实施方案中, 所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO.:1-84。在一些实施方案中, 所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO.:15-29。在一些实施方案中, 所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO.:40-54。在一些实施方案中, 所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO.:55-69。

在一些实施方案中, 所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO.:70-84。在一些实施方案中, 所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO.:85-98。在一些实施方案中, 所述IL-2缀合物包含SEQ ID

[illegible]

[illegible]

[0262] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(I)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(II)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(III)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(IV)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(V)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(VI)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(VII)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(VIII)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(IX)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(X)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(XI)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(XII)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(XIII)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(XIV)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(XV)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(XVI)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(XV)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(XVI)的结构。在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含式(XVII)的结构。

[0263] 在一些实施方案中,所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:86、88、90、92、94、96和98中

任一个的氨基酸序列。在这些实施方案中的任一个中,将式(I)或其任何变型(如式(II)-式(XVII)或其任何变型)的结构掺入包含非天然氨基酸的位点中。

[0264] 在一些实施方案中,本文描述了在氨基酸位置被修饰的IL-2缀合物。在一些情形下,所述修饰是针对天然氨基酸。在一些情形下,所述修饰是针对非天然氨基酸。在一些情形下,本文描述了包含至少一种非天然氨基酸的分离且经修饰的IL-2多肽。在一些情况下,所述IL-2多肽与SEQ ID NO:3至84中的任一个具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。在一些情况下,所述IL-2多肽与SEQ ID NO:3至98中的任一个具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0265] 在一些情形下,所述IL-2缀合物进一步包含另外的突变。在一些情况下,所述另外的突变在选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72和Y107的氨基酸位置处。在此类情况下,所述氨基酸与另外的缀合部分缀合,用于增加血清半衰期、稳定性或其组合。可替代地,在与所述另外的缀合部分结合之前,所述氨基酸首先突变为天然氨基酸,如赖氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸;或者突变为非天然氨基酸。

[0266] 在一些情况下,所述PEG基团并不限于特定结构。在一些情况下,所述PEG是线性的(例如,封端的,例如,烷氧基PEG或双官能PEG)、分支的或多臂的(例如,叉状PEG或附接至多元醇核心的PEG)、树枝状(或星形)架构,其各自具有或不具有一个或多个可降解的连接。此外,所述水溶性聚合物的内部结构可以以任何数量的不同重复模式来组织,并且可以选自均聚物、交替共聚物、无规共聚物、嵌段共聚物、交替三聚物、无规三聚物和嵌段三聚物。

[0267] PEG通常将包含许多(OCH_2CH_2)单体[或($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)单体,这取决于如何定义PEG]。如本文所用,重复单元的数量由“ $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ ”中的下标“n”来标识。因此,(n)的值通常落入一个或多个以下范围内:从2至约3400、从约100至约2300、从约100至约2270、从约136至约2050、从约225至约1930、从约450至约1930、从约1200至约1930、从约568至约2727、从约660至约2730、从约795至约2730、从约795至约2730、从约909至约2730和从约1,200至约1,900。对于分子量已知的任何给定聚合物,可以通过用聚合物的总重均分子量除以重复单体的分子量来确定重复单元的数量(即,“n”)。

[0268] 在一些情形下,所述PEG是封端聚合物,即至少一个末端用相对惰性的基团(如低级 C_{1-6} 烷氧基或羟基)封端的聚合物。当所述聚合物是PEG时,例如,可以使用甲氧基-PEG(通常称为mPEG),其是PEG的线性形式,其中聚合物的一个末端是甲氧基($-\text{OCH}_3$)基团,而另一个末端是羟基或可以被任选地化学修饰的其他官能团。

[0269] 在一些实施方案中,构成本文公开的IL-2缀合物的PEG基团是线性或分支PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是线性PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是分支PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是线性或分支甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是线性甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是分支甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有从约100道尔顿至约150,000道尔顿的平均分子量的线性或分支PEG基团。示例性范围包括例如在大于5,000道尔顿至约100,000道尔顿范围内、在从约6,000道尔顿至约90,000道尔顿范围内、在从约10,000道尔顿至约85,000道尔顿范围内、在大于10,000道尔顿至约85,000道尔顿范围内、在从约20,000道尔顿至约85,000道尔顿范围内、在从约53,

000道尔顿至约85,000道尔顿范围内、在从约25,000道尔顿至约120,000道尔顿范围内、在从约29,000道尔顿至约120,000道尔顿范围内、在从约35,000道尔顿至约120,000道尔顿范围内和在从约40,000道尔顿至约120,000道尔顿范围内的重均分子量。所述PEG基团的示例性重均分子量包括约100道尔顿、约200道尔顿、约300道尔顿、约400道尔顿、约500道尔顿、约600道尔顿、约700道尔顿、约750道尔顿、约800道尔顿、约900道尔顿、约1,000道尔顿、约1,500道尔顿、约2,000道尔顿、约2,200道尔顿、约2,500道尔顿、约3,000道尔顿、约4,000道尔顿、约4,400道尔顿、约4,500道尔顿、约5,000道尔顿、约5,500道尔顿、约6,000道尔顿、约7,000道尔顿、约7,500道尔顿、约8,000道尔顿、约9,000道尔顿、约10,000道尔顿、约11,000道尔顿、约12,000道尔顿、约13,000道尔顿、约14,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约22,500道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约55,000道尔顿、约60,000道尔顿、约65,000道尔顿、约70,000道尔顿、约75,000道尔顿、约80,000道尔顿、约90,000道尔顿、约95,000道尔顿和约100,000道尔顿。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有如上文所公开的平均分子量的线性PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有如上文所公开的平均分子量的分支PEG基团。在一些实施方案中,构成本文公开的IL-2缀合物的PEG基团是有限定的分子量 $\pm 10\%$ 或 15% 或 20% 或 25% 的线性或分支PEG基团。例如,本公开文本的范围内包括包含具有 $30,000\text{Da} \pm 3000\text{Da}$ 、或 $30,000\text{Da} \pm 4,500\text{Da}$ 、或 $30,000\text{Da} \pm 6,000\text{Da}$ 的分子量的PEG基团的IL-2缀合物。

[0270] 在一些实施方案中,构成本文公开的IL-2缀合物的PEG基团是具有从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿的平均分子量的线性或分支PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿、约5,500道尔顿、约6,000道尔顿、约7,000道尔顿、约7,500道尔顿、约8,000道尔顿、约9,000道尔顿、约10,000道尔顿、约11,000道尔顿、约12,000道尔顿、约13,000道尔顿、约14,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约22,500道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约55,000道尔顿、约60,000道尔顿、约65,000道尔顿、约70,000道尔顿、约75,000道尔顿、约80,000道尔顿、约90,000道尔顿、约95,000道尔顿和约100,000道尔顿的平均分子量的线性或分支PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿、约10,000道尔顿、约20,000道尔顿、约30,000道尔顿、约50,000道尔顿或约60,000道尔顿的平均分子量的线性或分支PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿、约30,000道尔顿、约50,000道尔顿或约60,000道尔顿的平均分子量的线性或分支PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿、约10,000道尔顿、约20,000道尔顿、约30,000道尔顿、约50,000道尔顿或约60,000道尔顿的平均分子量的线性PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿、约10,000道尔顿、约20,000道尔顿、约30,000道尔顿、约50,000道尔顿或约60,000道尔顿的平均分子量的分支PEG基团。

[0271] 在一些实施方案中,构成本文公开的IL-2缀合物的PEG基团是具有从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿的平均分子量的线性甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿、约5,500道尔顿、约6,000道尔顿、约7,000道尔顿、约7,500道尔顿、约8,000道尔顿、约9,000道尔顿、约10,000道尔顿、约11,000道尔顿、约12,000道尔顿、约13,000道尔顿、约14,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约22,500道尔顿、约

25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约55,000道尔顿、约60,000道尔顿、约65,000道尔顿、约70,000道尔顿、约75,000道尔顿、约80,000道尔顿、约90,000道尔顿、约95,000道尔顿和约100,000道尔顿的平均分子量的线性甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿、约10,000道尔顿、约20,000道尔顿、约30,000道尔顿、约50,000道尔顿或约60,000道尔顿的平均分子量的线性甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿、约30,000道尔顿、约50,000道尔顿或约60,000道尔顿的平均分子量的线性甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿、约10,000道尔顿、约20,000道尔顿、约30,000道尔顿、约50,000道尔顿或约60,000道尔顿的平均分子量的线性甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿的平均分子量的线性甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约10,000道尔顿的平均分子量的线性甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约20,000道尔顿的平均分子量的线性甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约30,000道尔顿的平均分子量的线性甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约50,000道尔顿的平均分子量的线性甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约60,000道尔顿的平均分子量的线性甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,构成本文公开的IL-2缀合物的PEG基团是具有限定的分子量 $\pm 10\%$ 或 15% 或 20% 或 25% 的线性甲氧基PEG基团。例如,本公开文本的范围内包括包含具有 $30,000\text{Da} \pm 3000\text{Da}$ 、或 $30,000\text{Da} \pm 4,500\text{Da}$ 、或 $30,000\text{Da} \pm 6,000\text{Da}$ 的分子量的线性甲氧基PEG基团的IL-2缀合物。

[0272] 在一些实施方案中,构成本文公开的IL-2缀合物的PEG基团是具有从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿的平均分子量的分支甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿、约5,500道尔顿、约6,000道尔顿、约7,000道尔顿、约7,500道尔顿、约8,000道尔顿、约9,000道尔顿、约10,000道尔顿、约11,000道尔顿、约12,000道尔顿、约13,000道尔顿、约14,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约22,500道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约55,000道尔顿、约60,000道尔顿、约65,000道尔顿、约70,000道尔顿、约75,000道尔顿、约80,000道尔顿、约90,000道尔顿、约95,000道尔顿和约100,000道尔顿的平均分子量的分支甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿、约10,000道尔顿、约20,000道尔顿、约30,000道尔顿、约50,000道尔顿或约60,000道尔顿的平均分子量的分支甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿、约30,000道尔顿、约50,000道尔顿或约60,000道尔顿的平均分子量的分支甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿、约10,000道尔顿、约20,000道尔顿、约30,000道尔顿、约50,000道尔顿或约60,000道尔顿的平均分子量的分支甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿、约10,000道尔顿、约20,000道尔顿、约30,000道尔顿、约50,000道尔顿或约60,000道尔顿的平均分子量的分支甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约5,000道尔顿的平均分子量的分支甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约10,000道尔顿的平均分子量的分支甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约20,000道尔顿的平均分子量的分支甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约30,000道尔顿的平均分

子量的分支甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约50,000道尔顿的平均分子量的分支甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,所述PEG基团是具有约60,000道尔顿的平均分子量的分支甲氧基PEG基团。在一些实施方案中,构成本文公开的IL-2缀合物的PEG基团是具有限定的分子量 $\pm 10\%$ 或 15% 或 20% 或 25% 的分支甲氧基PEG基团。例如,本公开文本的范围内包括包含具有 $30,000\text{Da} \pm 3000\text{Da}$ 、或 $30,000\text{Da} \pm 4,500\text{Da}$ 、或 $30,000\text{Da} \pm 6,000\text{Da}$ 的分子量的分支甲氧基PEG基团的IL-2缀合物。

[0273] 在一些实施方案中,示例性PEG基团包括但不限于来自Quanta Biodesign,Ltd的线性或分支的离散PEG(dPEG);来自Nektar Therapeutics的线性、分支或叉状PEG;以及来自JenKem Technology的Y形PEG衍生物。

缀合化学

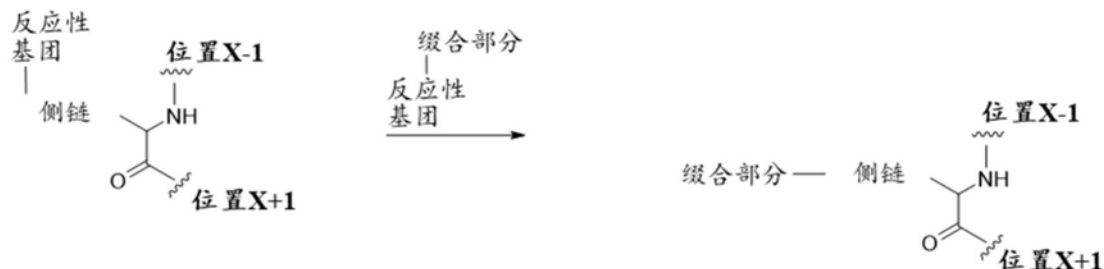
缀合化学

[0274] 使用各种缀合反应来缀合掺入本文所述的细胞因子肽中的接头、缀合部分和非天然氨基酸。此类缀合反应通常与水性条件相容,如“生物正交”反应。在一些实施方案中,缀合反应由化学试剂(如催化剂)、光或者在接头、缀合部分或非天然氨基酸上发现的反应性化学基团来介导。在一些实施方案中,缀合反应由酶来介导。在一些实施方案中,本文所用的缀合反应描述于Gong,Y.,Pan,L.Tett.Lett.2015,56,2123中。在一些实施方案中,本文所用的缀合反应描述于Chen,X.;Wu.Y-W.Org.Biomol.Chem.2016,14,5417中。将这些参考文献中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0275] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括1,3-偶极环加成反应。在一些实施方案中,1,3-偶极环加成反应包括叠氮化物与膾的反应(“点击”反应)。在一些实施方案中,缀合反应由铜催化。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应产生包含经由三唑附接的接头或缀合部分的细胞因子肽。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括叠氮化物与应变炔烃的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括叠氮化物与应变炔烃的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括叠氮化物与环炔(例如DBCO)的反应。

[0276] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括方案S1中概述的反应,其中X是包含非天然氨基酸的IL-2缀合物中的位置,如在SEQ ID NO:5、6、7、8、9、30、31、32、33和34中的任一个中。

方案S1.

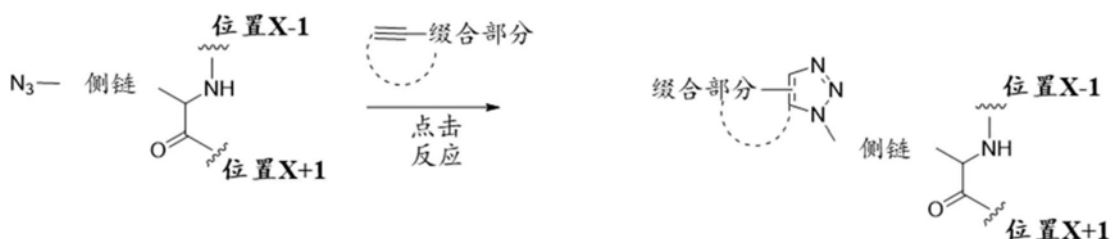


[0277] 在一些实施方案中,缀合部分包括水溶性聚合物。在一些实施方案中,反应性基团包括炔烃或叠氮化物。

[0278] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括方案S2中概述的反应,其中X是包含非天然氨基酸的IL-2缀合物中的位置,如在SEQ ID NO:5、6、7、8、9、30、31、32、

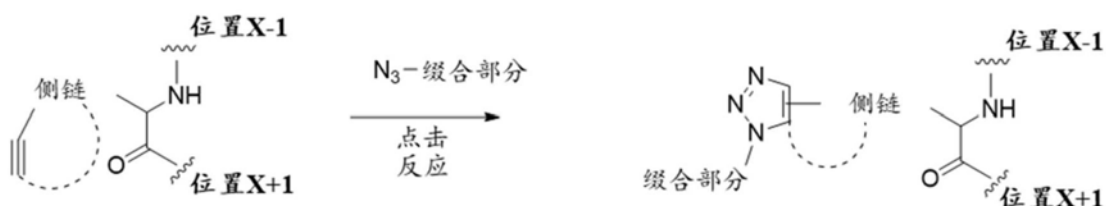
33和34中的任一个中。

方案S2.



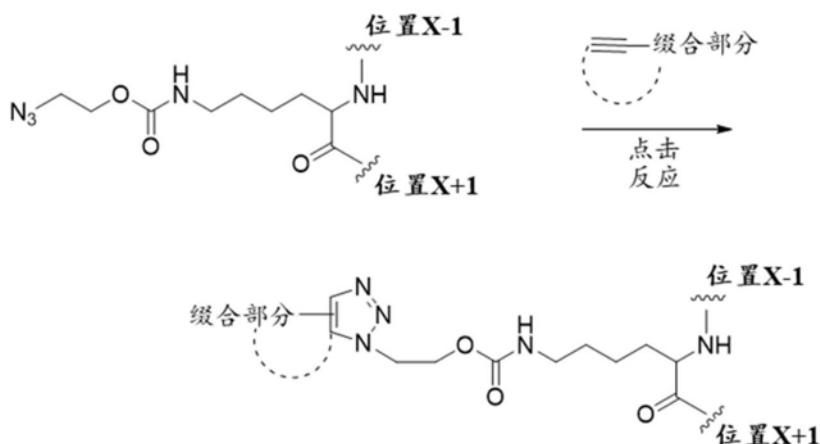
[0279] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括方案S3中概述的反应,其中X是包含非天然氨基酸的IL-2缀合物中的位置,如在SEQ ID NO:5、6、7、8、9、30、31、32、33和34中的任一个中。

方案S3.



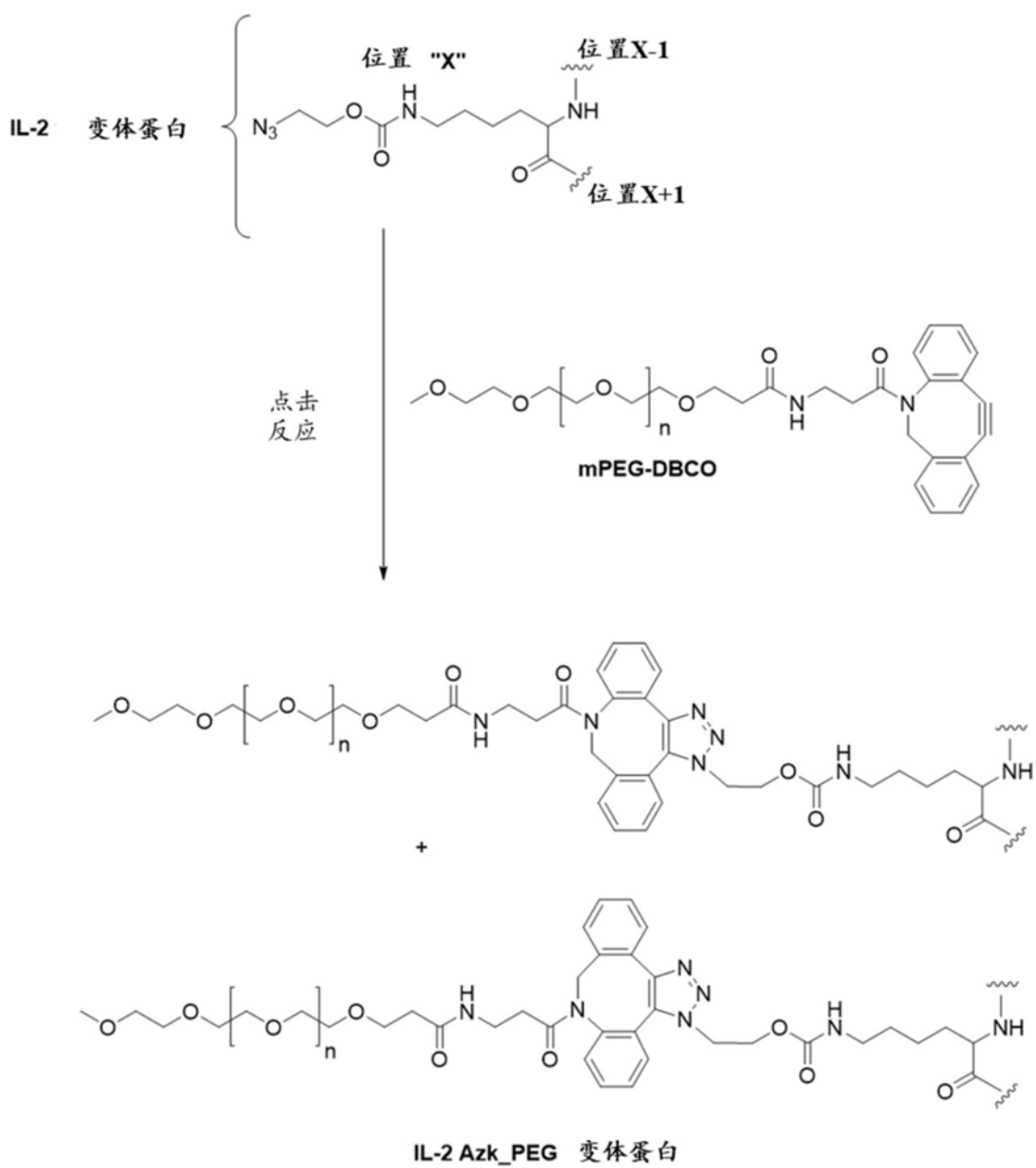
[0280] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括方案S4中概述的反应,其中X是包含非天然氨基酸的IL-2缀合物中的位置,如在SEQ ID NO:5、6、7、8、9、30、31、32、33和34中的任一个中。

方案S4.

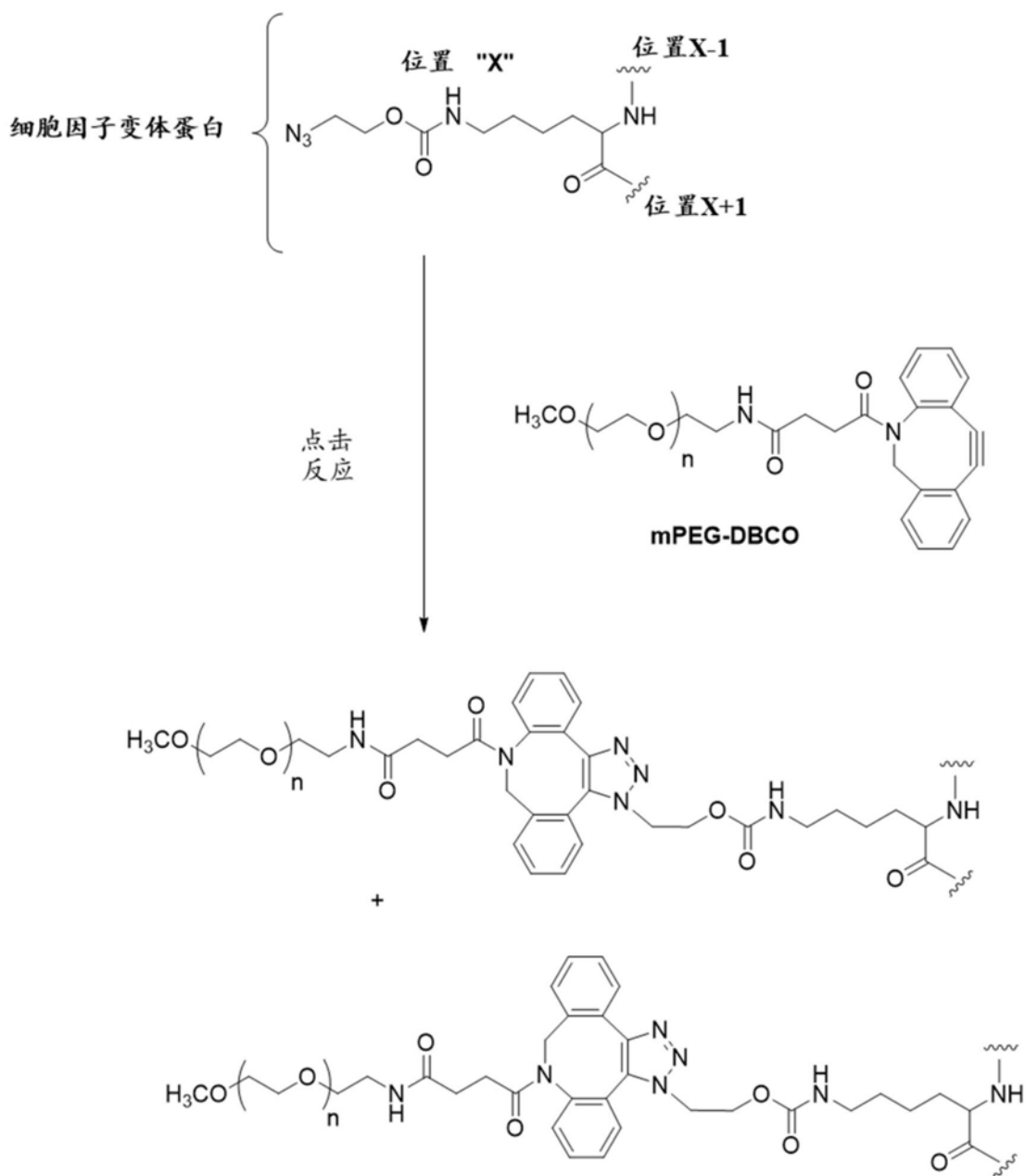


[0281] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括叠氮化物部分(如含于含有源自N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)的氨基酸残基的蛋白质中的叠氮化物部分)与应变环炔(如源自DBC0的应变环炔,DBC0是包含二苯并环辛炔基团的化学部分)之间的环加成反应。包含DBC0部分的PEG基团是可商购的或者可以通过本领域普通技术人员已知的方法来制备。示例性反应示出于方案S5和S6中。

方案S5.



方案S6.



[0282] 本文所述的缀合反应(如点击反应)可以产生单一位置异构体或位置异构体混合物。在一些情形下,位置异构体的比率为约1:1。在一些情形下,位置异构体的比率为约2:1。在一些情形下,位置异构体的比率为约1.5:1。在一些情形下,位置异构体的比率为约1.2:1。在一些情形下,位置异构体的比率为约1.1:1。在一些情形下,位置异构体的比率大于1:1。

细胞因子多肽产生

[0283] 在一些情形下,重组产生或化学合成本文所述的IL-2缀合物,其含有天然氨基酸突变或非天然氨基酸突变。在一些情形下,例如通过宿主细胞系统或在无细胞系统中重组产生本文所述的IL-2缀合物。在本文所述的实施方案或变型中的任一个中,氨基酸可以是L-氨基酸或D-氨基酸。在一些实施方案中,氨基酸是L-氨基酸。在其他实施方案中,氨基酸

是D-氨基酸。

[0284] 在一些情形下,通过宿主细胞系统重组产生IL-2缀合物。在一些情况下,宿主细胞是真核细胞(例如,哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞或植物细胞)或原核细胞(例如,革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌)。在一些情况下,真核宿主细胞是哺乳动物宿主细胞。在一些情况下,哺乳动物宿主细胞是稳定的细胞系,或者将目的遗传物质掺入其自身基因组中并且具有在多次细胞分裂后表达所述遗传物质的产物的能力的细胞系。在其他情况下,哺乳动物宿主细胞是瞬时细胞系,或者是未将目的遗传物质掺入其自身基因组中并且不具有在多次细胞分裂后表达所述遗传物质的产物的能力的细胞系。

[0285] 示例性哺乳动物宿主细胞包括293T细胞系、293A细胞系、293FT细胞系、293F细胞、293H细胞、A549细胞、MDCK细胞、CHO DG44细胞、CHO-S细胞、CHO-K1细胞、Expi293FTM细胞、Flp-InTM T-RExTM 293细胞系、Flp-InTM-293细胞系、Flp-InTM-3T3细胞系、Flp-InTM-BHK细胞系、Flp-InTM-CHO细胞系、Flp-InTM-CV-1细胞系、Flp-InTM-Jurkat细胞系、FreeStyleTM 293-F细胞、FreeStyleTM CHO-S细胞、GripTiteTM 293 MSR细胞系、GS-CHO细胞系、HepaRGTM细胞、T-RExTM Jurkat细胞系、Per.C6细胞、T-RExTM-293细胞系、T-RExTM-CHO细胞系和T-RExTM-HeLa细胞系。

[0286] 在一些实施方案中,真核宿主细胞是昆虫宿主细胞。示例性昆虫宿主细胞包括果蝇(*Drosophila*) S2细胞、Sf9细胞、Sf21细胞、High FiveTM细胞和expresSF+[®]细胞。

[0287] 在一些实施方案中,真核宿主细胞是酵母宿主细胞。示例性酵母宿主细胞包括毕赤酵母(*Pichia pastoris*/K.phaffii)酵母菌株,如GS115、KM71H、SMD1168、SMD1168H和X-33;以及酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)酵母菌株,如INVSc1。

[0288] 在一些实施方案中,真核宿主细胞是植物宿主细胞。在一些情形下,植物细胞包括来自藻类的细胞。示例性植物细胞系包括来自莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) 137c或细长聚球藻(*Synechococcus elongatus*) PPC 7942的株系。

[0289] 在一些实施方案中,宿主细胞是原核宿主细胞。示例性原核宿主细胞包括BL21、Mach1TM、DH10BTM、TOP10、DH5 α 、DH10BacTM、OmniMaxTM、MegaXTM、DH12STM、INV110、TOP10F'、INV α F、TOP10/P3、ccdB Survival、PIR1、PIR2、Stb12TM、Stb13TM或Stb14TM。

[0290] 在一些情形下,用于产生本文所述的IL-2多肽的合适的多核酸分子或载体包括源自真核或原核来源的任何合适的载体。示例性多核酸分子或载体包括来自细菌(例如,大肠杆菌(*E.coli*))、昆虫、酵母(例如,毕赤酵母(*Pichia pastoris*/K.phaffii))、藻类或哺乳动物来源的载体。细菌载体包括例如pACYC177、pASK75、pBAD载体系列、pBADM载体系列、pET载体系列、pETM载体系列、pGEX载体系列、pHAT、pHAT2、pMal-c2、pMal-p2、pQE载体系列、pRSET A、pRSET B、pRSET C、pTrcHis2系列、pZA31-Luc、pZE21-MCS-1、pFLAG ATS、pFLAG CTS、pFLAG MAC、pFLAG Shift-12c、pTAC-MAT-1、pFLAG CTC或pTAC-MAT-2。

[0291] 昆虫载体包括例如pFastBac1、pFastBac DUAL、pFastBac ET、pFastBac HTa、pFastBac HTb、pFastBac HTc、pFastBac M30a、pFastBact M30b、pFastBac M30c、pVL1392、pVL1393、pVL1393 M10、pVL1393 M11、pVL1393 M12、FLAG载体(如pPolh-FLAG1或pPolh-MAT2)或MAT载体(如pPolh-MAT1或pPolh-MAT2)。

[0292] 酵母载体包括例如Gateway[®] pDESTTM 14载体、Gateway[®] pDESTTM 15载体、

Gateway[®] pDEST[™] 17载体、Gateway[®] pDEST[™] 24载体、Gateway[®] pYES-DEST52载体、pBAD-DEST49 Gateway[®] 目的载体、pA0815毕赤酵母属 (*Pichia*) 载体、pFLD1毕赤酵母 (*Pichia pastoris*/K.phaffii) 载体、pGAPZA、B和C毕赤酵母 (*Pichia pastoris*/K.phaffii) 载体、pPIC3.5K毕赤酵母属载体、pPIC6 A、B和C毕赤酵母属载体、pPIC9K毕赤酵母属载体、pTEF1/Zeo、pYES2酵母载体、pYES2/CT酵母载体、pYES2/NT A、B和C酵母载体或pYES3/CT酵母载体。

[0293] 藻类载体包括例如pChlamy-4载体或MCS载体。

[0294] 哺乳动物载体包括例如瞬时表达载体或稳定表达载体。示例性哺乳动物瞬时表达载体包括p3xFLAG-CMV 8、pFLAG-Myc-CMV 19、pFLAG-Myc-CMV 23、pFLAG-CMV 2、pFLAG-CMV 6a,b,c、pFLAG-CMV 5.1、pFLAG-CMV 5a,b,c、p3xFLAG-CMV 7.1、pFLAG-CMV 20、p3xFLAG-Myc-CMV 24、pCMV-FLAG-MAT1、pCMV-FLAG-MAT2、pBICEP-CMV 3或pBICEP-CMV 4。示例性哺乳动物稳定表达载体包括pFLAG-CMV 3、p3xFLAG-CMV 9、p3xFLAG-CMV 13、pFLAG-Myc-CMV 21、p3xFLAG-Myc-CMV 25、pFLAG-CMV 4、p3xFLAG-CMV 10、p3xFLAG-CMV 14、pFLAG-Myc-CMV 22、p3xFLAG-Myc-CMV 26、pBICEP-CMV 1或pBICEP-CMV 2。

[0295] 在一些情形下,使用无细胞系统产生本文所述的细胞因子(例如,IL-2)多肽。在一些情况下,无细胞系统包含来自细胞的胞质和/或核组分的混合物,并且适合于体外核酸合成。在一些情形下,无细胞系统利用原核细胞组分。在其他情形下,无细胞系统利用真核细胞组分。核酸合成是在基于例如果蝇细胞、非洲爪蟾 (*Xenopus*) 卵、古细菌或HeLa细胞的无细胞系统中获得的。示例性无细胞系统包括大肠杆菌S30提取系统、大肠杆菌T7 S30系统、或PURExpress[®]、XpressCF和XpressCF+。

[0296] 无细胞翻译系统不同地包含组分,如质粒、mRNA、DNA、tRNA、合成酶、释放因子、核糖体、伴侣蛋白、翻译起始和延伸因子、天然和/或非天然氨基酸和/或用于蛋白质表达的其他组分。任选地修饰此类组分以提高产量、增加合成速率、增加蛋白质产物保真度或掺入非天然氨基酸。在一些实施方案中,本文所述的细胞因子是使用US 8,778,631;US 2017/0283469;US 2018/0051065;US 2014/0315245;或US 8,778,631中描述的无细胞翻译系统合成的。在一些实施方案中,无细胞翻译系统包含经修饰的释放因子,或者甚至从所述系统去除一种或多种释放因子。在一些实施方案中,无细胞翻译系统包含降低的蛋白酶浓度。在一些实施方案中,无细胞翻译系统包含具有重新分配的密码子的经修饰的tRNA,所述密码子用于编码非天然氨基酸。在一些实施方案中,在无细胞翻译系统中使用本文所述的合成酶用于掺入非天然氨基酸。在一些实施方案中,在添加至无细胞翻译系统之前,使用酶促或化学方法用非天然氨基酸对tRNA进行预加载。在一些实施方案中,无细胞翻译系统的组分是从经修饰的生物体(如经修饰的细菌、酵母或其他生物体)获得的。

[0297] 在一些实施方案中,细胞因子(例如,IL-2)多肽是作为环状排列的形式经由表达宿主细胞或通过无细胞系统产生的。

包含非天然氨基酸的细胞因子多肽的产生

[0298] 正交或扩展的遗传密码可以用于本公开文本中,其中分配细胞因子(例如,IL-2)多肽的核酸序列中存在的一个或多个特定密码子来编码非天然氨基酸,使得可以通过使用正交tRNA合成酶/tRNA对将其遗传地掺入细胞因子(例如,IL-2)中。正交tRNA合成酶/tRNA对能够用非天然氨基酸装载tRNA,并且能够响应于密码子将该非天然氨基酸掺入多肽链

中。

[0299] 在一些情形下,密码子是密码子琥珀、赭石、蛋白石或四联体密码子。在一些情况下,密码子对应于将用于携带非天然氨基酸的正交tRNA。在一些情况下,密码子是琥珀。在其他情况下,密码子是正交密码子。

[0300] 在一些情形下,密码子是四联体密码子,其可以由正交核糖体ribo-Q1解码。在一些情况下,四联体密码子如Neumann等人,“Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome,”*Nature*,464(7287):441-444 (2010)中所说明,将其公开内容通过引用并入本文。

[0301] 在一些情形下,本公开文本中使用的密码子是重编码的密码子,例如被可替代密码子替代的同义密码子或稀有密码子。在一些情况下,重编码的密码子如Napolitano等人,“Emergent rules for codon choice elucidated by editing rare arginine codons in *Escherichia coli*,”*PNAS*,113(38):E5588-5597 (2016)中所述。在一些情况下,重编码的密码子如Ostrov等人,“Design,synthesis,and testing toward a 57-codon genome,”*Science* 353(6301):819-822 (2016)中所述。将这些参考文献中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0302] 在一些情形下,利用非天然核酸,导致将一种或多种非天然氨基酸掺入细胞因子(例如,IL-2)中。示例性非天然核酸包括但不限于尿嘧啶-5-基,次黄嘌呤-9-基(I),2-氨基腺嘌呤-9-基,5-甲基胞嘧啶(5-me-C),5-羟甲基胞嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,2-氨基腺嘌呤,腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基衍生物和其他烷基衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基衍生物和其他烷基衍生物,2-硫尿嘧啶,2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶,5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶,6-偶氮基尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫尿嘧啶,8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代(特别是5-溴)、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤,8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。某些非天然核酸,如5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2取代的嘌呤、N-6取代的嘌呤、O-6取代的嘌呤、2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、增加双链体形成稳定性的那些、通用核酸、疏水性核酸、混杂核酸、尺寸扩大的核酸、氟化核酸、5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶(5-me-C),5-羟甲基胞嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,2-氨基腺嘌呤,腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基衍生物、其他烷基衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基衍生物和其他烷基衍生物,2-硫尿嘧啶,2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶,5-卤代尿嘧啶,5-卤代胞嘧啶,5-丙炔基(-C≡C-CH₃)尿嘧啶,5-丙炔基胞嘧啶,嘧啶核酸的其他炔基衍生物,6-偶氮基尿嘧啶,6-偶氮基胞嘧啶,6-偶氮基胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫尿嘧啶,8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代(特别是5-溴)、5-三氟甲基、其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤,7-甲基腺嘌呤,2-F-腺嘌呤,2-氨基-腺嘌呤,8-氮杂鸟嘌呤,8-氮杂腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤,7-脱氮腺嘌呤,3-脱氮鸟嘌呤,3-脱氮腺嘌呤,三环嘧啶,吩噻嗪胞苷([5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮),吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮),G夹,吩噻嗪胞苷(例如9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮),咔唑胞苷(2H-嘧啶并[4,5-b]呋喃

噪-2-酮),吡啶并吡咯胞苷(吡啶并[3',2':4,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮),其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环替代的那些,7-脱氮-腺嘌呤,7-脱氮鸟苷,2-氨基吡啶,2-吡啶酮,氮杂胞嘧啶,5-溴胞嘧啶,溴尿嘧啶,5-氯胞嘧啶,氯化胞嘧啶,环胞嘧啶,胞嘧啶阿拉伯糖苷,5-氟胞嘧啶,氟嘧啶,氟尿嘧啶,5,6-二氢胞嘧啶,5-碘胞嘧啶,羟基脲,碘尿嘧啶,5-硝基胞嘧啶,5-溴尿嘧啶,5-氯尿嘧啶,5-氟尿嘧啶和5-碘尿嘧啶,2-氨基-腺嘌呤,6-硫代-鸟嘌呤,2-硫代-胸腺嘧啶,4-硫代-胸腺嘧啶,5-丙炔基-尿嘧啶,4-硫代-尿嘧啶,N4-乙基胞嘧啶,7-脱氮鸟嘌呤,7-脱氮-8-氮杂鸟嘌呤,5-羟基胞嘧啶,2'-脱氧尿苷,2-氨基-2'-脱氧腺苷,以及描述于美国专利号3,687,808;4,845,205;4,910,300;4,948,882;5,093,232;5,130,302;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121;5,596,091;5,614,617;5,645,985;5,681,941;5,750,692;5,763,588;5,830,653和6,005,096;WO 99/62923;Kandimalla等人,(2001) Bioorg. Med. Chem. 9:807-813;The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Kroschwitz, J. I. 编辑, John Wiley & Sons, 1990, 858-859;Englisch等人, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613;和Sanghvi, 第15章, Antisense Research and Applications, Crooke和Lebleu编辑, CRC Press, 1993, 273-288中的那些。另外的碱基修饰可以在例如美国专利号3,687,808;Englisch等人, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613;和Sanghvi, 第15章, Antisense Research and Applications, 第289-302页, Crooke和Lebleu编辑, CRC Press, 1993中找到。将这些参考文献中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0303] 包含各种杂环碱基和各种糖部分(和糖类似物)的非天然核酸是本领域可获得的,并且在一些情况下,核酸包括不同于天然存在的核酸的五种主要碱基组分的一种或几种杂环碱基。例如,在一些情况下,杂环碱基包括尿嘧啶-5-基、胞嘧啶-5-基、腺嘌呤-7-基、腺嘌呤-8-基、鸟嘌呤-7-基、鸟嘌呤-8-基、4-氨基吡咯并[2.3-d]嘧啶-5-基、2-氨基-4-氧代吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基、2-氨基-4-氧代吡咯并[2.3-d]嘧啶-3-基,其中嘌呤经由9位、嘧啶经由1位、吡咯并嘧啶经由7位且吡啶并嘧啶经由1位附接至核酸的糖部分。

[0304] 在一些实施方案中,核苷酸类似物还在磷酸酯部分被修饰。经修饰的磷酸酯部分包括但不限于在两个核苷酸之间的连接处被修饰的那些,并且含有例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯(包括3'-亚烷基磷酸酯)和手性磷酸酯、次磷酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯、硫烷基氨基磷酸酯)、硫烷基磷酸酯、硫烷基磷酸三酯和硼烷磷酸酯。应理解,两个核苷酸之间的这些磷酸酯或经修饰的磷酸酯连接是通过3'-5'连接或2'-5'连接,并且所述连接含有相反的极性,如3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'。还包括各种盐、混合盐和游离酸形式。许多美国专利传授了如何制备和使用含有经修饰的磷酸酯的核苷酸,并且包括但不限于3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;和5,625,050,将其中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0305] 在一些实施方案中,非天然核酸包括2',3'-二脱氧-2',3'-二脱氢-核苷(PCT/

US2002/006460)、5'-取代的DNA和RNA衍生物(PCT/US2011/033961;Saha等人,J.Org.Chem.,1995,60,788-789;Wang等人,Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters,1999,9,885-890;和Mikhailov等人,Nucleosides&Nucleotides,1991,10(1-3),339-343;Leonid等人,1995,14(3-5),901-905;和Eppacher等人,Helvetica Chimica Acta,2004,87,3004-3020;PCT/JP2000/004720;PCT/JP2003/002342;PCT/JP2004/013216;PCT/JP2005/020435;PCT/JP2006/315479;PCT/JP2006/324484;PCT/JP2009/056718;PCT/JP2010/067560)或者制备为具有经修饰的碱基的单磷酸酯的5'-取代的单体(Wang等人,Nucleosides Nucleotides&Nucleic Acids,2004,23(1&2),317-337)。将这些参考文献中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0306] 在一些实施方案中,非天然核酸包括在糖环的5'位和2'位处的修饰(PCT/US94/02993),如5'-CH₂-取代的2'-O-保护的核苷(Wu等人,Helvetica Chimica Acta,2000,83,1127-1143和Wu等人,Bioconjugate Chem.1999,10,921-924)。在一些情况下,非天然核酸包括酰胺连接的核苷二聚体,其已经被制备用于掺入寡核苷酸中,其中二聚体中3'连接的核苷(5'至3')包含2'-OCH₃和5'-(S)-CH₃(Mesmaeker等人,Synlett,1997,1287-1290)。非天然核酸可以包括2'-取代的5'-CH₂(或O)修饰的核苷(PCT/US92/01020)。非天然核酸可以包括5'-亚甲基磷酸酯DNA和RNA单体和二聚体(Bohringer等人,Tet.Lett.,1993,34,2723-2726;Collingwood等人,Synlett,1995,7,703-705;和Hutter等人,Helvetica Chimica Acta,2002,85,2777-2806)。非天然核酸可以包括具有2'-取代的5'-磷酸酯单体(US2006/0074035)和其他经修饰的5'-磷酸酯单体(WO1997/35869)。非天然核酸可以包括5'-修饰的亚甲基磷酸酯单体(EP614907和EP629633)。非天然核酸可以包括在5'和/或6'位包含羟基的5'或6'-磷酸酯核糖核苷类似物(Chen等人,Phosphorus,Sulfur and Silicon,2002,777,1783-1786;Jung等人,Bioorg.Med.Chem.,2000,8,2501-2509;Gallier等人,Eur.J.Org.Chem.,2007,925-933;和Hampton等人,J.Med.Chem.,1976,19(8),1029-1033)。非天然核酸可以包括5'-磷酸酯脱氧核糖核苷单体和具有5'-磷酸酯基团的二聚体(Nawrot等人,Oligonucleotides,2006,16(1),68-82)。非天然核酸可以包括具有6'-磷酸酯基团的核苷,其中5'或/和6'位未被取代或者被硫代叔丁基(SC(CH₃)₃)(及其类似物);亚甲基氨基(CH₂NH₂)(及其类似物)或氰基(CN)(及其类似物)取代(Fairhurst等人,Synlett,2001,4,467-472;Kappler等人,J.Med.Chem.,1986,29,1030-1038;Kappler等人,J.Med.Chem.,1982,25,1179-1184;Vrudhula等人,J.Med.Chem.,1987,30,888-894;Hampton等人,J.Med.Chem.,1976,19,1371-1377;Geze等人,J.Am.Chem.Soc,1983,105(26),7638-7640;和Hampton等人,J.Am.Chem.Soc,1973,95(13),4404-4414)。将这些参考文献中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0307] 在一些实施方案中,非天然核酸还包括糖部分的修饰。在一些情况下,核酸含有其中糖基团已经被修饰的一种或多种核苷。此类糖修饰的核苷可以赋予增强的核酸酶稳定性、增加的结合亲和力或一些其他有益的生物学特性。在某些实施方案中,核酸包含经化学修饰的呋喃核糖环部分。经化学修饰的呋喃核糖环的例子包括而限于添加取代基(包括5'和/或2'取代基;两个环原子桥接形成二环核酸(BNA);用S、N(R)或C(R₁)(R₂)替代核糖基环氧原子(R=H、C₁-C₁₂烷基或保护基团);及其组合。经化学修饰的糖的例子可以在WO 2008/101157、US 2005/0130923和WO 2007/134181中找到,将其中的每一个的公开内容通

过引用并入本文。

[0308] 在一些情形下,经修饰的核酸包含经修饰的糖或糖类似物。因此,除核糖和脱氧核糖之外,糖部分可以是戊糖、脱氧戊糖、己糖、脱氧己糖、葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖或糖“类似物”环戊基。糖可以呈吡喃糖基或呋喃糖基形式。糖部分可以是核糖、脱氧核糖、阿拉伯糖或2'-O-烷基核糖的呋喃糖基,并且糖可以以[α]或[β]异头构型附接至相应的杂环碱基。糖修饰包括但不限于2'-烷氧基-RNA类似物、2'-氨基-RNA类似物、2'-氟-DNA和2'-烷氧基-或氨基-RNA/DNA嵌合体。例如,糖修饰可以包括2'-O-甲基-尿苷或2'-O-甲基-胞苷。糖修饰包括2'-O-烷基-取代的脱氧核糖核苷和2'-O-乙二醇样核糖核苷。这些糖或糖类似物以及其中此类糖或类似物附接至杂环碱基(核酸碱基)的相应“核苷”的制备是已知的。还可以进行糖修饰并且将其与其他修饰组合。

[0309] 糖部分的修饰包括核糖和脱氧核糖的天然修饰以及非天然修饰。糖修饰包括但不限于在2'位处的以下修饰:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的C₁至C₁₀烷基或C₂至C₁₀烯基和炔基。2'糖修饰还包括但不限于-O[(CH₂)_nO]_mCH₃、-O(CH₂)_nOCH₃、-O(CH₂)_nNH₂、-O(CH₂)_nCH₃、-O(CH₂)_nNH₂和-O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂,其中n和m是从1至约10。

[0310] 2'位处的其他修饰包括但不限于:C₁至C₁₀低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基、O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报告基团、嵌入剂、用于改善寡核苷酸的药代动力学特性的基团或用于改善寡核苷酸的药效学特性的基团以及具有类似特性的其他取代基。还可以在糖的其他位置(特别是在3'末端核苷酸或2'-5'连接的寡核苷酸中糖的3'位和5'末端核苷酸的5'位)处进行类似的修饰。经修饰的糖还包括在桥环氧处含有修饰(如CH₂和S)的那些。核苷酸糖类似物也可以具有糖模拟物,如环丁基部分代替戊呋喃糖基糖。许多美国专利传授了此类经修饰的糖结构的制备,并且详述并描述了一系列的碱基修饰,所述美国专利如美国专利号4,981,957;5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633;4,845,205;5,130,302;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121;5,596,091;5,614,617;5,681,941;和5,700,920,将其中的每一个通过引用以其整体并入本文。

[0311] 具有经修饰的糖部分的核酸的例子包括而不限于包含5'-乙烯基、5'-甲基(R或S)、4'-S、2'-F、2'-OCH₃和2'-O(CH₂)₂OCH₃取代基的核酸。2'位处的取代基还可以选自烯丙基、氨基、叠氮基、硫代、O-烯丙基、O-(C₁-C₁₀烷基)、OCF₃、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)和O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n),其中R_m和R_n各自独立地是H或者取代或未取代的C₁-C₁₀烷基。

[0312] 在某些实施方案中,本文所述的核酸包括一种或多种二环核酸。在某些此类实施方案中,二环核酸包含4'与2'核糖基环原子之间的桥。在某些实施方案中,本文提供的核酸包括一种或多种二环核酸,其中桥包含4'至2'二环核酸。此类4'至2'二环核酸的例子包括但不限于下式之一:4'-(CH₂)-O-2'(LNA);4'-(CH₂)-S-2';4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA);4'-CH(CH₃)-O-2'和4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'及其类似物(参见美国专利号7,399,845);4'-C(CH₃)

(CH₃)-O-2' 及其类似物(参见W02009/006478、W02008/150729、US2004/0171570、美国专利号7,427,672、Chattopadhyaya等人,J.Org.Chem.,209,74,118-134和W02008/154401)。还参见例如:Singh等人,Chem.Comm.,1998,4,455-456;Koshkin等人,Tetrahedron,1998,54,3607-3630;Wahlestedt等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,2000,97,5633-5638;Kumar等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1998,8,2219-2222;Singh等人,J.Org.Chem.,1998,63,10035-10039;Srivastava等人,J.Am.Chem.Soc.,2007,129(26)8362-8379;Elayadi等人,Curr.Opinion Invens.Drugs,2001,2,558-561;Braasch等人,Chem.Biol,2001,8,1-7;Oram等人,Curr.Opinion Mol.Ther.,2001,3,239-243;美国专利号4,849,513;5,015,733;5,118,800;5,118,802;7,053,207;6,268,490;6,770,748;6,794,499;7,034,133;6,525,191;6,670,461;和7,399,845;国际公开号W0 2004/106356、W0 1994/14226、W0 2005/021570、W0 2007/090071和W0 2007/134181;美国专利公开号US 2004/0171570、US 2007/0287831和US 2008/0039618;美国临时申请号60/989,574、61/026,995、61/026,998、61/056,564、61/086,231、61/097,787和61/099,844;以及国际申请号PCT/US2008/064591、PCT US2008/066154、PCT US2008/068922和PCT/DK98/00393,将其中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0313] 在某些实施方案中,核酸包括连接的核酸。核酸可以使用任何核酸间连接而连接在一起。核酸间连接基团的两个主要类别是通过磷原子的存在或不存在来定义的。代表性的含磷的核酸间连接包括但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、甲基膦酸酯、氨基膦酸酯和硫代膦酸酯(P=S)。代表性的不含磷的核酸间连接基团包括但不限于亚甲基甲基亚氨基(-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-)、硫代二酯(-O-C(O)-S-)、硫羰基氨基甲酸酯(-O-C(O)(NH)-S-);硅氧烷(-O-Si(H)₂-O-);和N*-二甲基胍(-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃))。在某些实施方案中,可以将具有手性原子的核酸间连接制备为外消旋混合物,制备为单独的对映体,例如烷基膦酸酯和硫代膦酸酯。非天然核酸可以含有单一修饰。非天然核酸可以在所述部分之一内或不同部分之间含有多种修饰。

[0314] 对核酸的骨架磷酸修饰包括但不限于甲基膦酸酯、硫代膦酸酯、氨基膦酸酯(桥接或非桥接)、磷酸三酯、二硫代膦酸酯(phosphorodithioate)、二硫代膦酸酯(phosphodithioate)和硼烷膦酸酯,并且可以以任何组合使用。还可以使用其他非磷酸酯连接。

[0315] 在一些实施方案中,骨架修饰(例如,甲基膦酸酯、硫代膦酸酯、氨基膦酸酯和二硫代膦酸酯核苷酸间连接)可以赋予经修饰的核酸免疫调节活性和/或增强其体内稳定性。

[0316] 在一些情形下,磷衍生物(或经修饰的磷酸酯基团)附接至糖或糖类似物部分,并且可以是单磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯、烷基膦酸酯、硫代膦酸酯、二硫代膦酸酯、氨基膦酸酯等。含有经修饰的磷酸酯连接或非磷酸酯连接的示例性多核苷酸可以在Peyrottes等人,1996,Nucleic Acids Res.24:1841-1848;Chaturvedi等人,1996,Nucleic Acids Res.24:2318-2323;和Schultz等人,(1996)Nucleic Acids Res.24:2966-2973;Matteucci,1997,“Oligonucleotide Analogs:an Overview”in Oligonucleotides as Therapeutic Agents,(Chadwick和Cardew编辑)John Wiley and Sons,New York,NY;Zon,1993,“Oligonucleoside Phosphorothioates”in Protocols for Oligonucleotides and Analogs,Synthesis and Properties,Humana Press,第165-190页;Miller等人,1971,

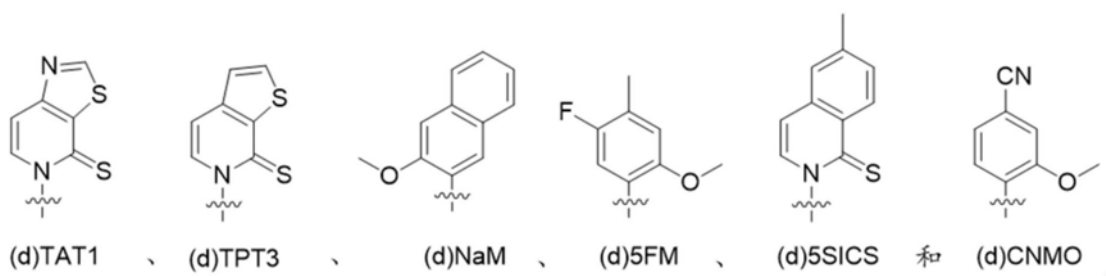
JACS 93:6657-6665; Jager等人, 1988, Biochem. 27:7247-7246; Nelson等人, 1997, JOC 62:7278-7287; 美国专利号5,453,496; 和Micklefield, 2001, Curr. Med. Chem. 8:1157-1179中找到, 将其中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0317] 在一些情况下, 骨架修饰包括用可替代部分(如阴离子基团、中性基团或阳离子基团)替代磷酸二酯连接。此类修饰的例子包括: 阴离子核苷间连接; N3'至P5'氨基磷酸酯修饰; 硼烷磷酸酯DNA; 原寡核苷酸; 中性核苷间连接, 如甲基磷酸酯; 酰胺连接的DNA; 亚甲基(甲基亚氨基)连接; 甲缩醛(formacetal)和硫代甲缩醛连接; 含有磺酰基的骨架; 吗啉代寡聚物; 肽核酸(PNA); 以及带正电荷的脱氧核糖核酸胍(DNG)寡聚物(Micklefield, 2001, Current Medicinal Chemistry 8:1157-1179, 将其公开内容通过引用并入本文)。经修饰的核酸可以包含嵌合或混合的骨架, 所述嵌合或混合的骨架包含一种或多种修饰(例如, 磷酸酯连接的组合, 如磷酸二酯和硫代磷酸酯连接的组合)。

[0318] 磷酸酯的取代基包括例如短链烷基或环烷基核苷间连接、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间连接或者一个或多个短链杂原子或杂环核苷间连接。这些包括具有以下的那些: 吗啉代连接(部分地由核苷的糖部分形成); 硅氧烷骨架; 硫化物、亚砷和砷骨架; 甲酰乙酰基(formacetyl)和硫代甲酰乙酰基骨架; 亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架; 含烯烃的骨架; 氨基磺酸酯骨架; 亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架; 磺酸酯和磺酰胺骨架; 酰胺骨架; 以及具有混合N、O、S和CH₂组成部分的其他骨架。许多美国专利公开了如何制备和使用这些类型的磷酸酯替代物, 并且包括但不限于美国专利号5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 和5,677,439, 将其中的每一个的公开内容通过引用并入本文。还应理解, 在核苷酸取代基中, 核苷酸的糖和磷酸部分都可以被例如酰胺型连接(氨基乙基甘氨酸)(PNA)替代。美国专利号5,539,082; 5,714,331; 和5,719,262传授了如何制备和使用PNA分子, 将其中的每一个通过引用并入本文。还参见Nielsen等人, Science, 1991, 254, 1497-1500。还可以将其他类型的分子(缀合物)与核苷酸或核苷酸类似物连接, 以增强例如细胞摄取。缀合物可以与核苷酸或核苷酸类似物化学连接。此类缀合物包括但不限于脂质部分, 如胆固醇部分(Letsinger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556); 胆酸(Manoharan等人, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060); 硫醚, 例如己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人, Ann. KY. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan等人, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770); 硫代胆固醇(Oberhauser等人, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538); 脂肪链, 例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人, EM50J, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov等人, FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk等人, Biochimie, 1993, 75, 49-54); 磷脂, 例如二-十六烷基-rac-甘油或三乙基铵1-二-0-十六烷基-rac-甘油-S-H-磷酸酯(Manoharan等人, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea等人, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783); 聚胺或聚乙二醇链(Manoharan等人, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973); 或金刚烷乙酸(Manoharan等人, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654); 棕榈基部分(Mishra等人, Biochem. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237); 或十八烷基胺或己氨基-羧基-羟胆固醇部

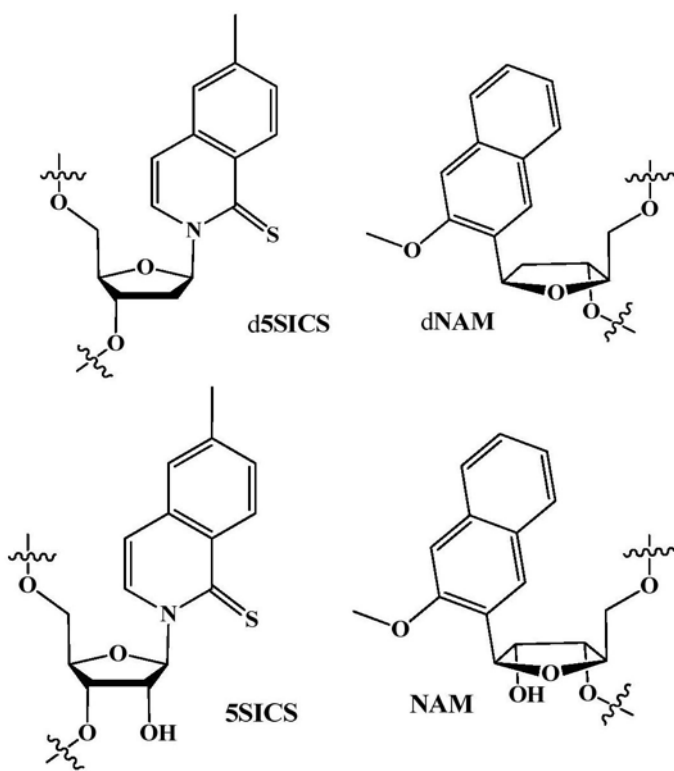
分 (Crooke等人, J.Pharmacol.Exp.Ther., 1996, 277, 923-937)。许多美国专利传授了此类缀合物的制备, 并且包括但不限于美国专利号4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928和5,688,941。将这些参考文献中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0319] 在一些情况下, 非天然核酸进一步形成非天然碱基对。能够在体内条件下形成非天然DNA或RNA碱基对 (UBP) 的示例性非天然核苷酸包括但不限于TAT1、dTAT1、5FM、d5FM、TPT3、dTPT3、5SICS、d5SICS、NaM、dNaM、CNMO、dCNMO及其组合。在一些实施方案中, 非天然核苷酸包括:

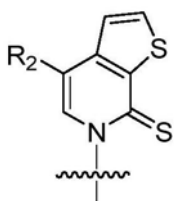


示例性非天然碱基对包括: (d) TPT3- (d) NaM; (d) 5SICS- (d) NaM; (d) CNMO- (d) TAT1; (d) NaM- (d) TAT1; (d) CNMO- (d) TPT3; 和 (d) 5FM- (d) TAT1。

[0320] 能够形成可以用于制备本文公开的IL-2缀合物的非天然UBP的非天然核苷酸的其他例子可以在Dien等人, J Am Chem Soc., 2018, 140:16115-16123; Feldman等人, J Am Chem Soc, 2017, 139:11427-11433; Ledbetter等人, J Am Chem Soc., 2018, 140:758-765; Dhami等人, Nucleic Acids Res. 2014, 42:10235-10244; Malyshev等人, Nature, 2014, 509:385-388; Betz等人, J Am Chem Soc., 2013, 135:18637-18643; Lavergne等人, J Am Chem Soc. 2013, 135:5408-5419; 和Malyshev等人Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109:12005-12010中找到, 将其中的每一个的公开内容通过引用并入本文。在一些实施方案中, 非天然核苷酸包括:



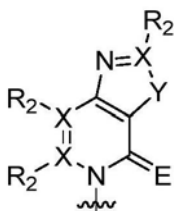
[0321] 在一些实施方案中,可以用于制备本文公开的IL-2缀合物的非天然核苷酸可以源自下式的化合物:



其中 R_2 选自氢、烷基、烯基、炔基、甲氧基、甲硫醇、甲烷硒基、卤素、氰基和叠氮基; 并且

波浪线指示与核糖基或2'-脱氧核糖基的键,其中核糖基或2'-脱氧核糖基部分的5'-羟基呈游离形式,任选地键合至单磷酸酯、二磷酸酯或三磷酸酯基团,或者包括在RNA或DNA中或者RNA类似物或DNA类似物中。

[0322] 在一些实施方案中,可以用于制备本文公开的IL-2缀合物的非天然核苷酸可以源自下式的化合物:



其中:

每个X独立地是碳或氮;

当X是氮时 R_2 不存在,并且当X是碳时, R_2 是存在的并且独立地是氢、烷基、烯基、炔基、甲氧基、甲硫醇、甲烷硒基、卤素、氰基或叠氮化物;

Y是硫、氧、硒或仲胺；

E是氧、硫或硒；并且

波浪线指示与核糖基、脱氧核糖基或二脱氧核糖基部分或其类似物的键合点，其中核糖基、脱氧核糖基或二脱氧核糖基部分或其类似物呈游离形式，连接至单磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯、 α -硫代三磷酸酯、 β -硫代三磷酸酯或 γ -硫代三磷酸酯基团，或者包括在RNA或DNA中或者RNA类似物或DNA类似物中。

[0323] 在一些实施方案中，每个X是碳。在一些实施方案中，至少一个X是碳。在一些实施方案中，一个X是碳。在一些实施方案中，至少两个X是碳。在一些实施方案中，两个X是碳。在一些实施方案中，至少一个X是氮。在一些实施方案中，一个X是氮。在一些实施方案中，至少两个X是氮。在一些实施方案中，两个X是氮。

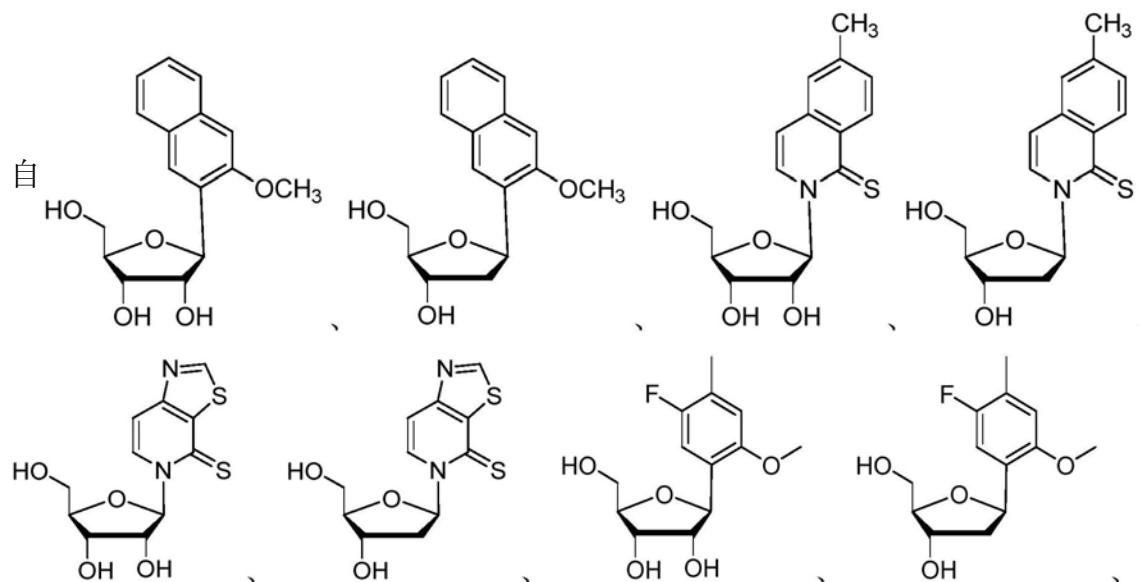
[0324] 在一些实施方案中，Y是硫。在一些实施方案中，Y是氧。在一些实施方案中，Y是硒。在一些实施方案中，Y是仲胺。

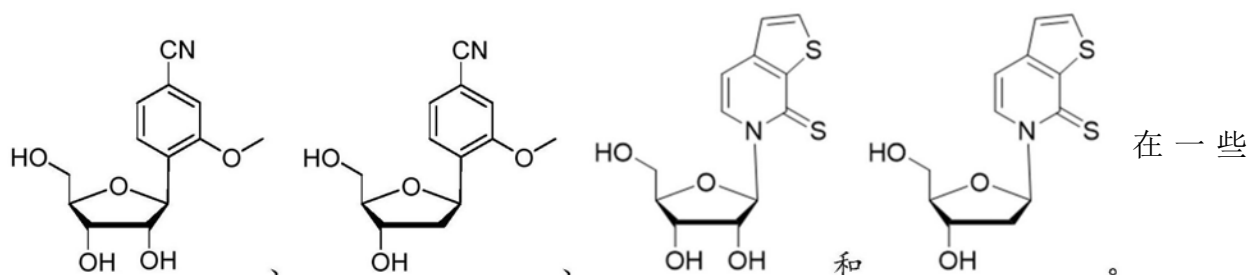
[0325] 在一些实施方案中，E是硫。在一些实施方案中，E是氧。在一些实施方案中，E是硒。

[0326] 在一些实施方案中，当X是碳时， R_2 是存在的。在一些实施方案中，当X是氮时， R_2 不存在。在一些实施方案中，每个 R_2 在存在的情况下是氢。在一些实施方案中， R_2 是烷基，如甲基、乙基或丙基。在一些实施方案中， R_2 是烯基，如 $-\text{CH}_2=\text{CH}_2$ 。在一些实施方案中， R_2 是炔基，如乙炔基。在一些实施方案中， R_2 是甲氧基。在一些实施方案中， R_2 是甲硫醇。在一些实施方案中， R_2 是甲烷硒基。在一些实施方案中， R_2 是卤素，如氯、溴或氟。在一些实施方案中， R_2 是氰基。在一些实施方案中， R_2 是叠氮化物。

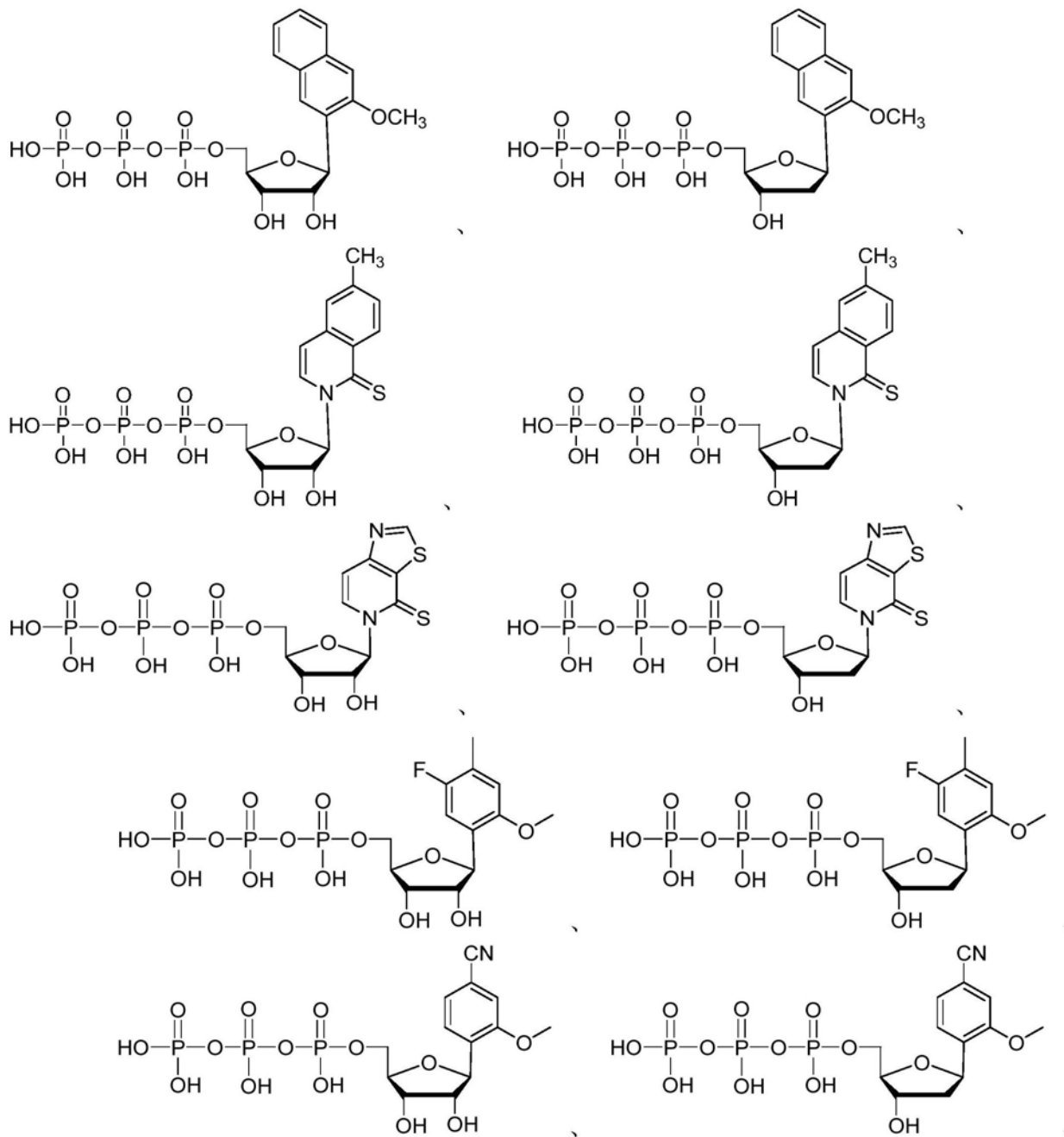
[0327] 在一些实施方案中，E是硫，Y是硫，并且每个X独立地是碳或氮。在一些实施方案中，E是硫，Y是硫，并且每个X是碳。

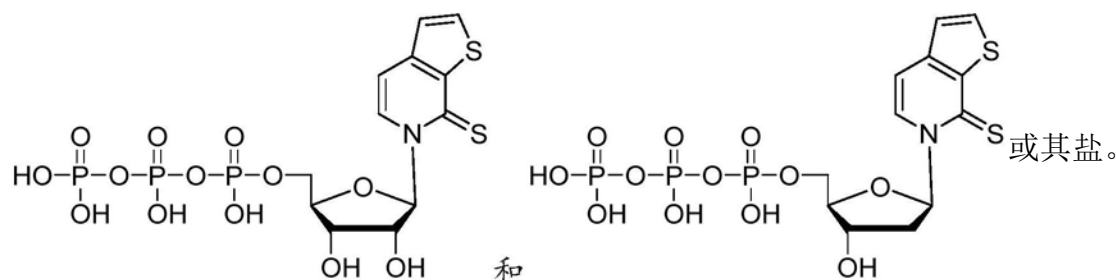
[0328] 在一些实施方案中，可以用于制备本文公开的IL-2缀合物的非天然核苷酸可以源自





实施方案中,可以用于制备本文公开的IL-2缀合物的非天然核苷酸包括





[0329] 在一些实施方案中,非天然碱基对产生在Dumas等人,“Designing logical codon reassignment-Expanding the chemistry in biology,”*Chemical Science*,6:50-69 (2015)中所述的非天然氨基酸,将其公开内容通过引用并入本文。

[0330] 在一些实施方案中,通过包含非天然核酸的合成密码子将非天然氨基酸掺入细胞因子(例如,IL多肽)中。在一些情形下,通过正交的经修饰的合成酶/tRNA对将非天然氨基酸掺入细胞因子中。此类正交对包含非天然合成酶,所述非天然合成酶能够将非天然氨基酸装载到非天然tRNA上,同时最小化a)其他内源性氨基酸装载到非天然tRNA上和b)非天然氨基酸装载到其他内源性tRNA上。此类正交对包含能够通过非天然合成酶进行装载,同时避免通过内源性合成酶装载a)其他内源性氨基酸的tRNA。在一些实施方案中,从各种生物体(如细菌、酵母、古细菌或人来源)鉴定此类对。在一些实施方案中,正交合成酶/tRNA对包含来自单一生物体的组分。在一些实施方案中,正交合成酶/tRNA对包含来自两种不同生物体的组分。在一些实施方案中,正交合成酶/tRNA对包含在修饰之前促进两种不同氨基酸的翻译的组分。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的丙氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的精氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的天冬酰胺合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的天冬氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的半胱氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的谷氨酰胺合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的谷氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的丙氨酸甘氨酸。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的组氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的亮氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的异亮氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的赖氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的甲硫氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的苯丙氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的脯氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的丝氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的苏氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的色氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的酪氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的缬氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的磷酸丝氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的丙氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的精氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的天冬酰胺tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的天冬氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的半胱氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的谷氨酰胺tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的谷氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的丙氨酸甘氨酸。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的组氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的亮氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的异亮氨酸tRNA。在一些实

施方案中,正交tRNA是经修饰的赖氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的甲硫氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的苯丙氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的脯氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的丝氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的苏氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的色氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的酪氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的缬氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的磷酸丝氨酸tRNA。

[0331] 在一些实施方案中,通过氨酰基(aaRS或RS)-tRNA合成酶-tRNA对将非天然氨基酸掺入细胞因子(例如,IL多肽)中。示例性aaRS-tRNA对包括但不限于詹氏甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*) (Mj-Tyr) aaRS/tRNA对、大肠杆菌TyrRS (Ec-Tyr) /嗜热脂肪芽孢杆菌(*B.stearothermophilus*) tRNA_{CUA}对、大肠杆菌LeuRS (Ec-Leu) /嗜热脂肪芽孢杆菌tRNA_{CUA}对和吡咯赖氨酰-tRNA对。在一些情形下,通过Mj-TyrRS/tRNA对将非天然氨基酸掺入细胞因子(例如,IL多肽)中。可以通过Mj-TyrRS/tRNA对掺入的示例性UAA包括但不限于对位取代的苯丙氨酸衍生物,如对氨基苯丙氨酸和对甲氧基苯丙氨酸;间位取代的酪氨酸衍生物,如3-氨基酪氨酸、3-硝基酪氨酸、3,4-二羟基苯丙氨酸和3-碘酪氨酸;苯基硒代半胱氨酸;对硼苯丙氨酸;以及邻硝基苄基酪氨酸。

[0332] 在一些情形下,通过Ec-Tyr/tRNA_{CUA}或Ec-Leu/tRNA_{CUA}对将非天然氨基酸掺入细胞因子(例如,IL多肽)中。可以通过Ec-Tyr/tRNA_{CUA}或Ec-Leu/tRNA_{CUA}对掺入的示例性UAA包括但不限于含有苯甲酮、酮、碘化物或叠氮化物取代基的苯丙氨酸衍生物;0-炔丙基酪氨酸; α -氨基辛酸;0-甲基酪氨酸;0-硝基苄基半胱氨酸;和3-(萘-2-基氨基)-2-氨基-丙酸。

[0333] 在一些情形下,通过吡咯赖氨酰-tRNA对将非天然氨基酸掺入细胞因子(例如,IL多肽)中。在一些情况下,Py1RS获自古细菌,例如获自产甲烷的古细菌。在一些情况下,Py1RS获自巴氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina barkeri*)、马氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina mazei*)或乙酸甲烷八叠球菌(*Methanosarcina acetivorans*)。可以通过吡咯赖氨酰-tRNA对掺入的示例性UAA包括但不限于酰胺和氨基甲酸酯取代的赖氨酸,如2-氨基-6-((R)-四氢呋喃-2-甲酰胺基)己酸、N- ϵ -D-脯氨酰基-L-赖氨酸和N- ϵ -环戊基氧基羰基-L-赖氨酸;N- ϵ -丙烯酰基-L-赖氨酸;N- ϵ -[(1-(6-硝基苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)乙氧基)羰基]-L-赖氨酸;和N- ϵ -(1-甲基环丙-2-烯甲酰胺基)赖氨酸。在一些实施方案中,可以通过使用马氏甲烷八叠球菌(*M.mazei*) tRNA制备本文公开的IL-2缀合物,马氏甲烷八叠球菌tRNA通过巴氏甲烷八叠球菌(*M.barkeri*)吡咯赖氨酰-tRNA合成酶(Mb Py1RS)选择性装载非天然氨基酸,如N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)。其他方法是本领域普通技术人员已知的,如Zhang等人,Nature 2017,551(7682):644-647中公开的那些,将其公开内容通过引用并入本文。

[0334] 在一些情形下,通过US 9,988,619和US 9,938,516中公开的合成酶将非天然氨基酸掺入本文所述的细胞因子(例如,IL多肽)中,将其中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0335] 在合适的培养基中培养或维持引入了本文公开的构建体或载体的宿主细胞,使得产生tRNA、tRNA合成酶和目的蛋白质。培养基还包含一种或多种非天然氨基酸,使得目的蛋白质掺入所述一种或多种非天然氨基酸。在一些实施方案中,来自细菌、植物或藻类的核苷三磷酸转运蛋白(NTT)也存在于宿主细胞中。在一些实施方案中,通过使用表达NTT的宿主

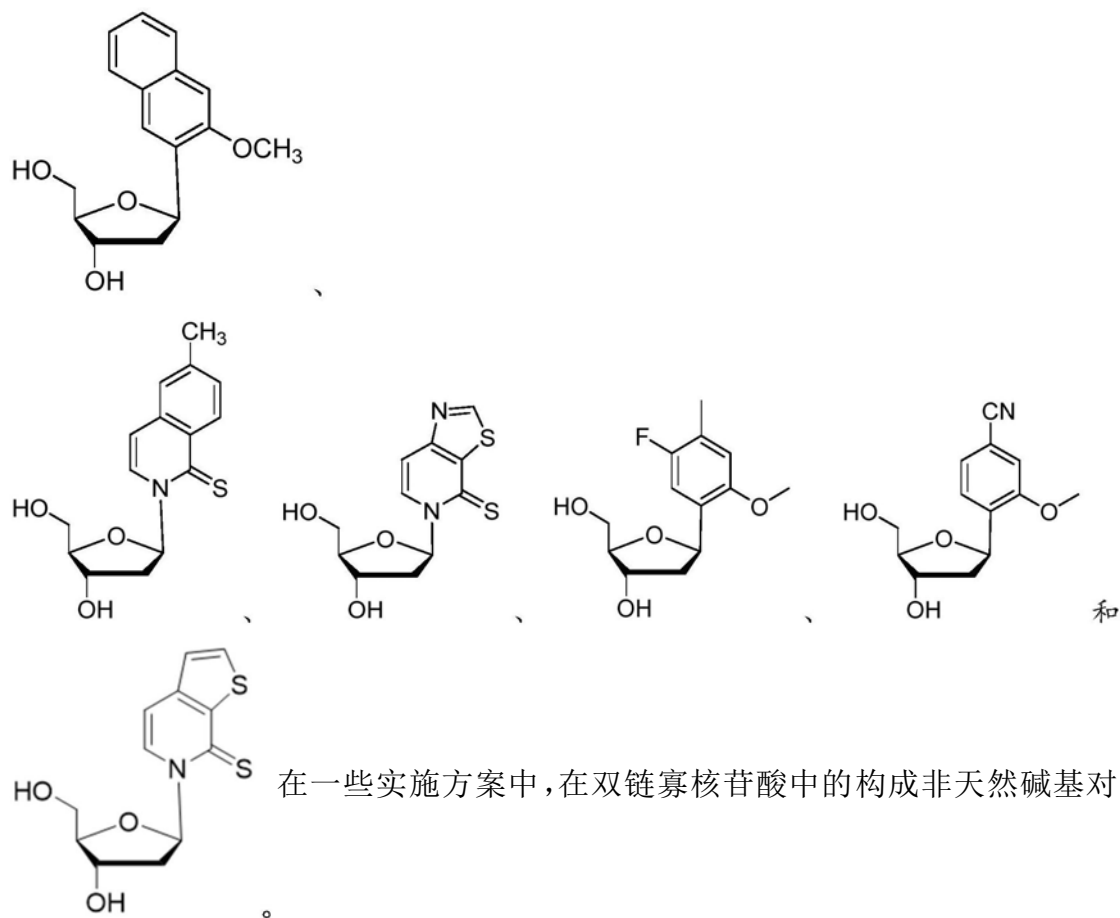
细胞制备本文公开的IL-2缀合物。在一些实施方案中,用于宿主细胞中的核苷酸核苷三磷酸转运蛋白可以选自TpNTT1、TpNTT2、TpNTT3、TpNTT4、TpNTT5、TpNTT6、TpNTT7、TpNTT8(假微型海链藻(*T.pseudonana*))、PtNTT1、PtNTT2、PtNTT3、PtNTT4、PtNTT5、PtNTT6(三角褐指藻(*P.tricornutum*))、GsNTT(嗜硫原始红藻(*Galdieria sulphuraria*))、AtNTT1、AtNTT2(拟南芥(*Arabidopsis thaliana*))、CtNTT1、CtNTT2(沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*))、PamNTT1、PamNTT2(嗜阿米巴原衣原体(*Protochlamydia amoebophila*))、CcNTT(*Caedibacter caryophilus*)、RpNTT1(普氏立克次体(*Rickettsia prowazekii*))。在一些实施方案中,NTT选自PtNTT1、PtNTT2、PtNTT3、PtNTT4、PtNTT5和PtNTT6。在一些实施方案中,NTT是PtNTT1。在一些实施方案中,NTT是PtNTT2。在一些实施方案中,NTT是PtNTT3。在一些实施方案中,NTT是PtNTT4。在一些实施方案中,NTT是PtNTT5。在一些实施方案中,NTT是PtNTT6。可以使用的其他NTT公开于Zhang等人,Nature 2017,551(7682):644-647; Malyshev等人Nature 2014(509(7500),385-388;和Zhang等人Proc Natl Acad Sci USA, 2017,114:1317-1322中,将其中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0336] 正交tRNA合成酶/tRNA对用非天然氨基酸装载tRNA,并且响应于密码子将所述非天然氨基酸掺入多肽链中。示例性aaRS-tRNA对包括但不限于詹氏甲烷球菌(Mj-Tyr)aaRS/tRNA对、大肠杆菌TyrRS(Ec-Tyr)/嗜热脂肪芽孢杆菌tRNA_{CUA}对、大肠杆菌LeuRS(Ec-Leu)/嗜热脂肪芽孢杆菌tRNA_{CUA}对和吡咯赖氨酰-tRNA对。可以根据本公开文本使用的其他aaRS-tRNA对包括源自马氏甲烷八叠球菌的那些,描述于Feldman等人,J Am Chem Soc.,2018 140:1447-1454;和Zhang等人Proc Natl Acad Sci USA,2017,114:1317-1322中的那些,将其中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

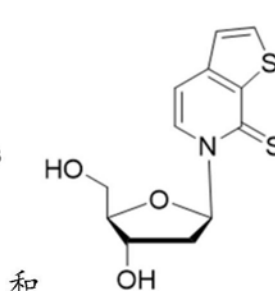
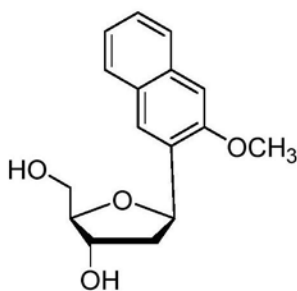
[0337] 在一些实施方案中提供了在表达NTT和tRNA合成酶的细胞系统中制备本文公开的IL-2缀合物的方法。在本文所述的一些实施方案中,NTT选自PtNTT1、PtNTT2、PtNTT3、PtNTT4、PtNTT5和PtNTT6,并且tRNA合成酶选自詹氏甲烷球菌、大肠杆菌TyrRS(Ec-Tyr)/嗜热脂肪芽孢杆菌和马氏甲烷八叠球菌。在一些实施方案中,NTT是PtNTT1,并且tRNA合成酶源自詹氏甲烷球菌、大肠杆菌TyrRS(Ec-Tyr)/嗜热脂肪芽孢杆菌或马氏甲烷八叠球菌。在一些实施方案中,NTT是PtNTT2,并且tRNA合成酶源自詹氏甲烷球菌、大肠杆菌TyrRS(Ec-Tyr)/嗜热脂肪芽孢杆菌或马氏甲烷八叠球菌。在一些实施方案中,NTT是PtNTT3,并且tRNA合成酶源自詹氏甲烷球菌、大肠杆菌TyrRS(Ec-Tyr)/嗜热脂肪芽孢杆菌或马氏甲烷八叠球菌。在一些实施方案中,NTT是PtNTT4,并且tRNA合成酶源自詹氏甲烷球菌、大肠杆菌TyrRS(Ec-Tyr)/嗜热脂肪芽孢杆菌或马氏甲烷八叠球菌。在一些实施方案中,NTT是PtNTT5,并且tRNA合成酶源自詹氏甲烷球菌、大肠杆菌TyrRS(Ec-Tyr)/嗜热脂肪芽孢杆菌或马氏甲烷八叠球菌。在一些实施方案中,NTT是PtNTT6,并且tRNA合成酶源自詹氏甲烷球菌、大肠杆菌TyrRS(Ec-Tyr)/嗜热脂肪芽孢杆菌或马氏甲烷八叠球菌。

[0338] 在一些实施方案中,可以在细胞(如大肠杆菌)中制备本文公开的IL-2缀合物,所述细胞包含(a)核苷酸三磷酸转运蛋白PtNTT2(包括截短型变体,其中全长蛋白质的前65个氨基酸残基缺失);(b)包含双链寡核苷酸的质粒,所述双链寡核苷酸编码具有所需氨基酸序列的IL-2变体并且含有包含第一非天然核苷酸和第二非天然核苷酸的非天然碱基对,以

在将掺入非天然氨基酸(如N6-((2-叠氨基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK))的所需位置提供密码子; (c) 编码源自马氏甲烷八叠球菌并且包含非天然核苷酸以提供公认的反密码子(针对IL-2变体的密码子)来代替其天然序列的tRNA的质粒; 以及(d) 编码巴氏甲烷八叠球菌来源的吡咯赖氨酰-tRNA合成酶(Mb PyIRS)的质粒,其可以是编码tRNA的相同质粒或不同质粒。在一些实施方案中,细胞进一步补充有包含一种或多种非天然碱基的脱氧核糖三磷酸酯。在一些实施方案中,细胞进一步补充有包含一种或多种非天然碱基的核糖三磷酸酯。在一些实施方案中,细胞进一步补充有一种或多种非天然氨基酸,如N6-((2-叠氨基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)。在一些实施方案中,编码所需IL-2变体的氨基酸序列的双链寡核苷酸在例如编码具有SEQ ID NO:3的蛋白质的序列的位置34、37、40、41、42、43、44、61、64、68或71处,或者在编码具有SEQ ID NO:4的蛋白质的序列的位置35、38、41、42、43、45、62、65、69或72处含有密码子AXC,其中X是非天然核苷酸。在一些实施方案中,细胞进一步包含质粒,所述质粒可以是蛋白质表达质粒或另一种质粒,其编码来自马氏甲烷八叠球菌的正交tRNA基因,所述正交tRNA基因包含AXC匹配的反密码子GYT代替其天然序列,其中Y是互补的并且可以与密码子中的非天然核苷酸相同或不同的非天然核苷酸。在一些实施方案中,密码子中的非天然核苷酸与反密码子中的非天然核苷酸不同且互补。在一些实施方案中,密码子中的非天然核苷酸与反密码子中的非天然核苷酸相同。在一些实施方案中,在双链寡核苷酸中的构成非天然碱基对的第一和第二非天然核苷酸可以源自

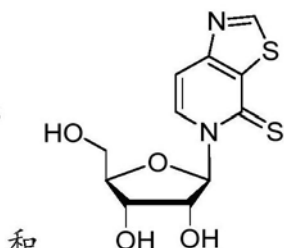
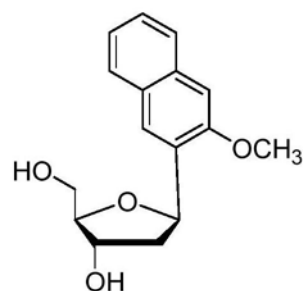


第二非天然核苷酸可以源自



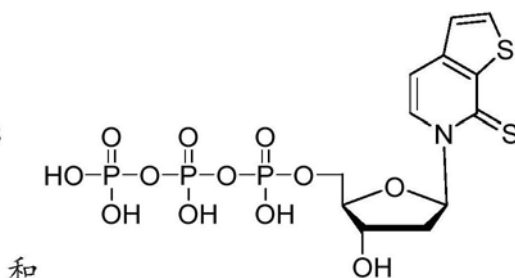
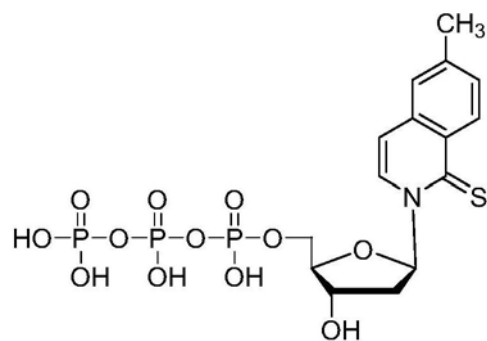
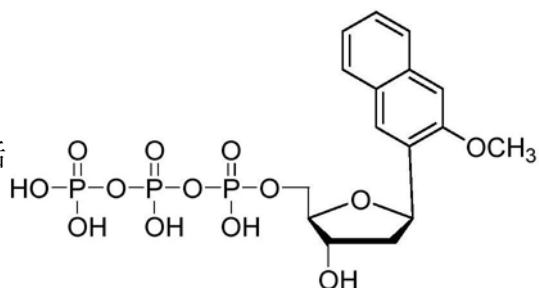
在一些实施方案

中,在双链寡核苷酸中的构成非天然碱基对的第一和第二非天然核苷酸可以源自



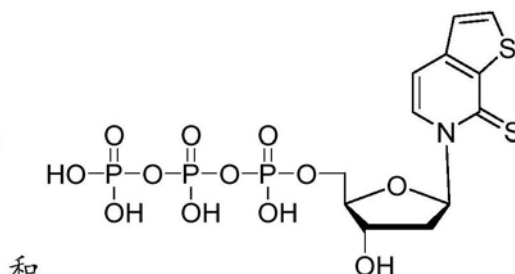
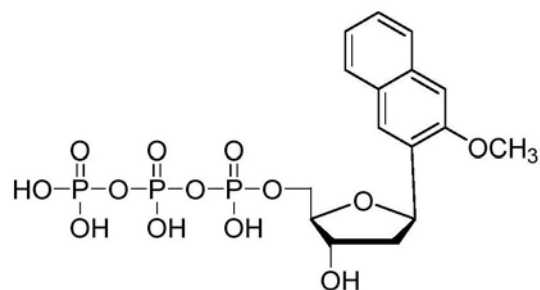
在一些实施方案中,第一和第二非天然核苷酸

的三磷酸酯包括



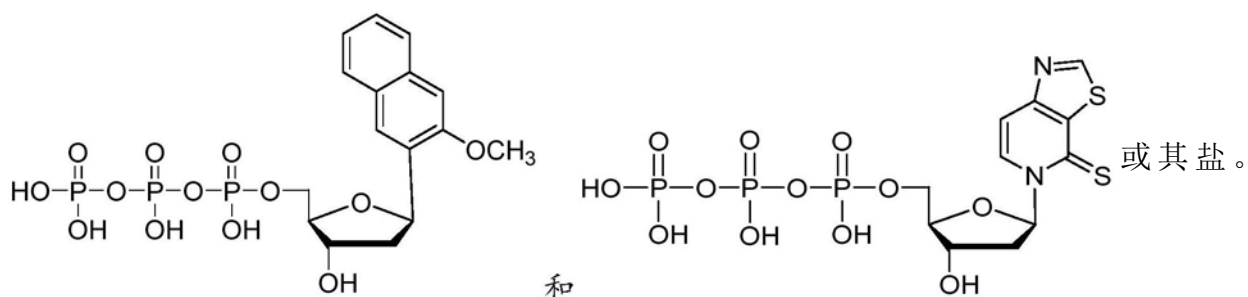
或其盐。在一些实

施方案中,第一和第二非天然核苷酸的三磷酸酯包括



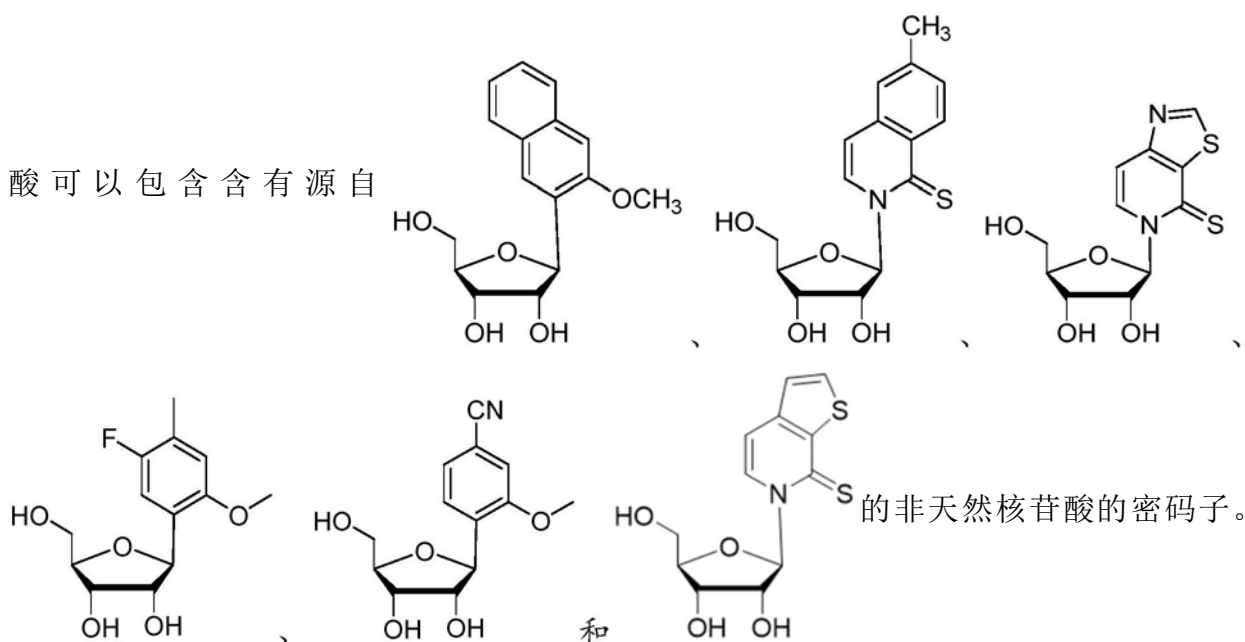
或其盐。在一

些实施方案中,第一和第二非天然核苷酸的三磷酸酯包括

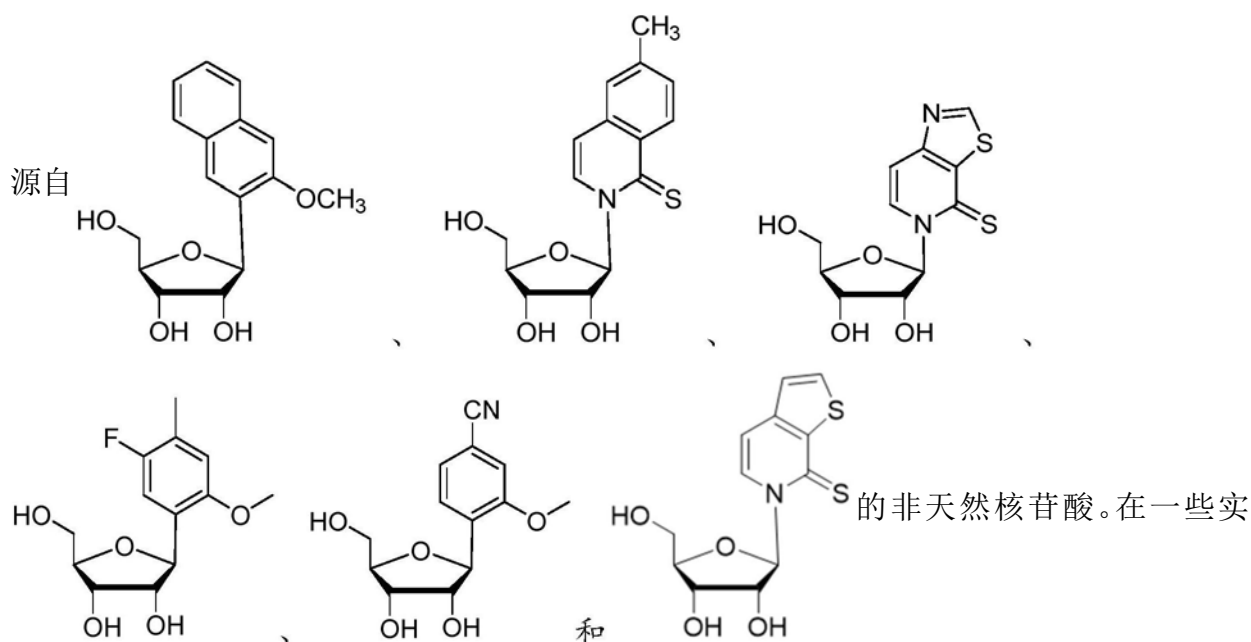


在一些实施方案中,包含第一非天然核苷酸和第二非天然核苷酸的mRNA来源的双链寡核苷

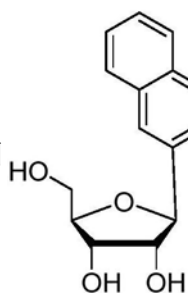
酸可以包含含有源自



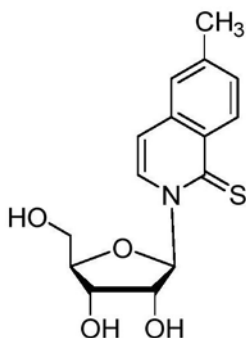
在一些实施方案中,马氏甲烷八叠球菌tRNA可以包含含有非天然核苷酸的反密码子,其识别包含所述mRNA的非天然核苷酸的密码子。马氏甲烷八叠球菌tRNA中的反密码子可以包含



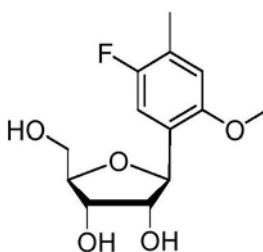
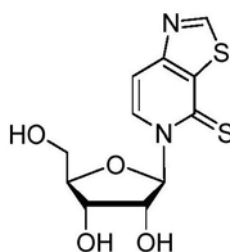
实施方案中,mRNA包含源自



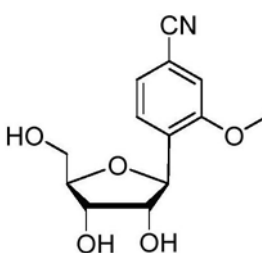
包含源自



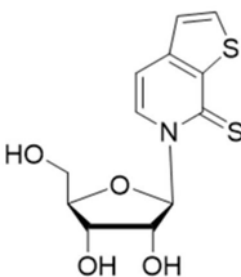
的非天然核苷酸。在一些实施方案中,mRNA包含源自



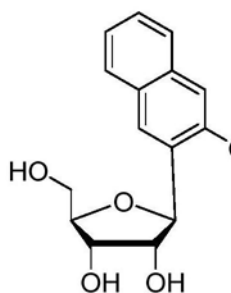
非天然核苷酸。在一些实施方案中,mRNA包含源自

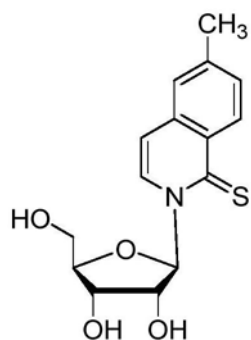


一些实施方案中,mRNA包含源自

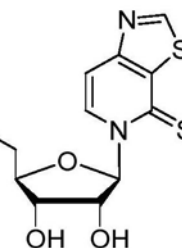


tRNA包含源自

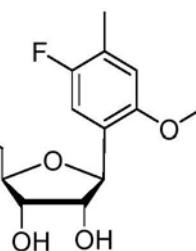




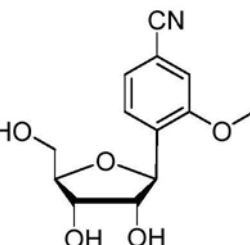
的非天然核苷酸。在一些实施方案中，tRNA包含源自HO-的



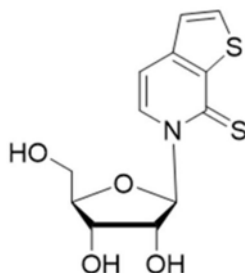
非天然核苷酸。在一些实施方案中，tRNA包含源自HO-的非天然核苷酸。在



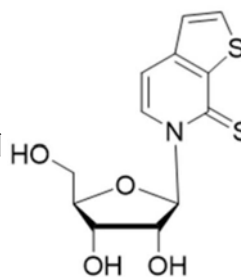
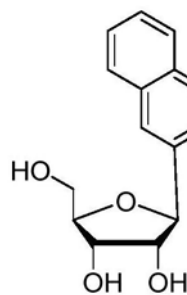
一些实施方案中，tRNA包含源自 HO-C(=O)-C(=O)-O- 的非天然核苷酸。在一些实施方案中，



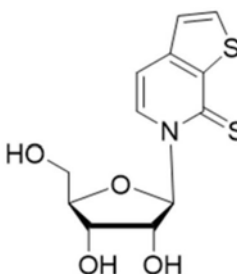
tRNA包含源自的非天然核苷酸。在一些实施方案中,mRNA包含源自

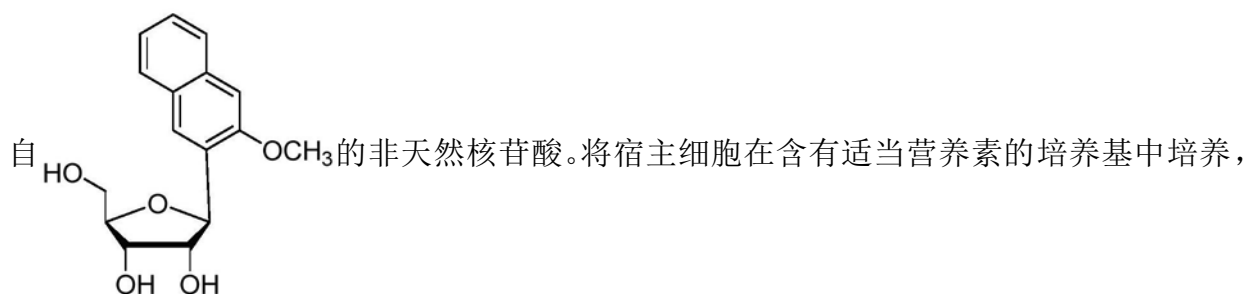
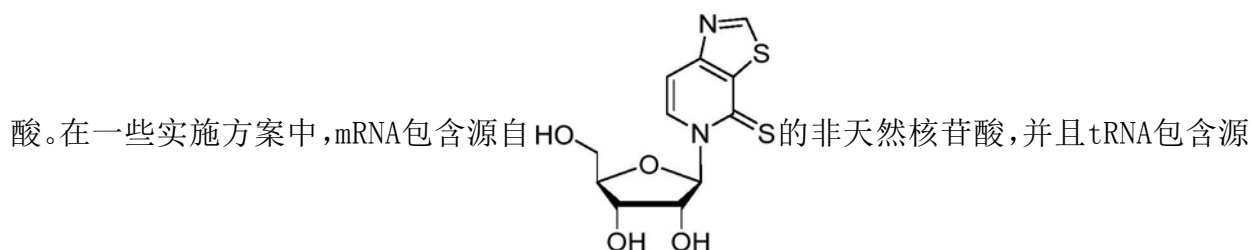
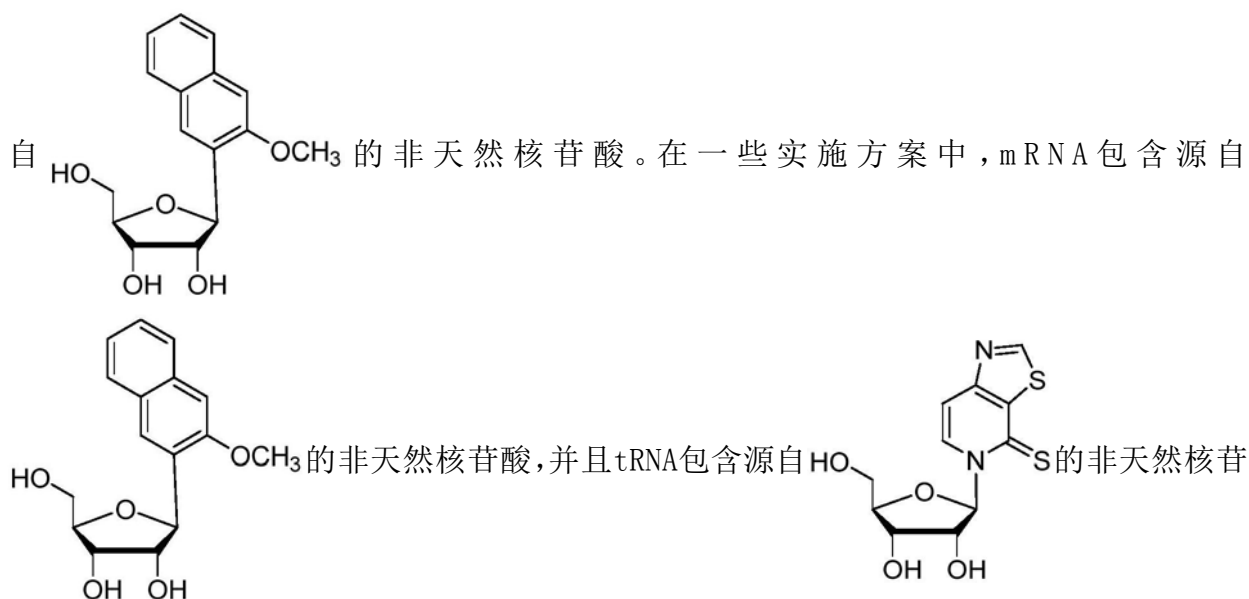


...OCH₃的非天然核苷酸,并且tRNA包含源自...N=S的非天然核苷



酸。在一些实施方案中,mRNA包含源自 的非天然核苷酸,并且tRNA包含源





并且补充有以下物质：(a) 包含一种或多种非天然碱基的脱氧核糖核苷三磷酸酯，所述非天然碱基是编码具有密码子的细胞因子基因的一种或多种质粒的复制所必需的；(b) 包含一种或多种非天然碱基的核糖核苷三磷酸酯，所述非天然碱基是以下的转录所必需的：(i) 对应于细胞因子的编码序列并且含有包含一种或多种非天然碱基的密码子的 mRNA，和 (ii) 含有包含一种或多种非天然碱基的反密码子的 tRNA；以及 (c) 待掺入目的细胞因子的多肽序列中的一种或多种非天然氨基酸。然后将宿主细胞维持在允许目的蛋白质表达的条件下。

[0339] 所表达的含 AzK 的所得蛋白质可以通过本领域普通技术人员已知的方法来纯化，然后可以允许其与炔烃（如包含具有如本文所公开的所需平均分子量的 PEG 链的 DBCO）在本领域普通技术人员已知的条件下反应，以提供本文公开的 IL-2 缀合物。其他方法是本领域普通技术人员已知的，如 Zhang 等人，Nature 2017, 551 (7682) :644-647; WO 2015157555; WO 2015021432; WO 2016115168; WO 2017106767; WO 2017223528; WO 2019014262; WO 2019014267; WO 2019028419; 和 WO 2019/028425 中公开的那些，将其中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0340] 所表达的包含一种或多种非天然氨基酸（例如 Azk）的所得蛋白质可以通过本领域

普通技术人员已知的方法来纯化,然后可以允许其与炔烃(如包含具有如本文所公开的所需平均分子量的PEG链的DBCO)在本领域普通技术人员已知的条件下反应,以提供本文公开的IL-2缀合物。其他方法是本领域普通技术人员已知的,如Zhang等人,Nature 2017,551(7682):644-647;WO 2015157555;WO 2015021432;WO 2016115168;WO 2017106767;WO 2017223528;WO 2019014262;WO 2019014267;WO 2019028419;和WO 2019/028425中公开的那些,将其中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0341] 可替代地,通过将本文所述的核酸构建体引入宿主细胞中来制备包含一种或多种非天然氨基酸的细胞因子(例如,IL-2)多肽,所述核酸构建体包含tRNA和氨酰基tRNA合成酶并且包含具有因子或多种框内正交(终止)密码子的目的核酸序列。将宿主细胞在含有适当营养素的培养基中培养,补充有(a)包含一种或多种非天然碱基的脱氧核糖核苷三磷酸酯,所述非天然碱基是编码具有新密码子和反密码子的细胞因子基因的一种或多种质粒的复制所需的;(b)对应于以下的mRNA的转录所需的核糖核苷三磷酸酯:(i)含有密码子的细胞因子序列,和(ii)含有反密码子的正交tRNA;以及(c)一种或多种非天然氨基酸。然后将宿主细胞维持在允许目的蛋白质表达的条件下。响应于非天然密码子,将一种或多种非天然氨基酸掺入多肽链中。例如,将一种或多种非天然氨基酸掺入细胞因子(例如,IL-2)多肽中。可替代地,可以在蛋白质中的两个或更多个位点处将两种或更多种非天然氨基酸掺入细胞因子(例如,IL-2)多肽中。

[0342] 一旦在宿主细胞中产生了掺入一种或多种非天然氨基酸的细胞因子(例如,IL-2)多肽,便可以通过本领域已知的多种技术(包括酶促、化学和/或渗透裂解和物理破坏)从所述宿主细胞提取所述多肽。可以通过本领域已知的标准技术(如制备型离子交换色谱法、疏水色谱法、亲和色谱法或本领域普通技术人员已知的任何其他合适的技术)纯化细胞因子(例如,IL-2)多肽。

[0343] 合适的宿主细胞可以包括细菌细胞(例如,大肠杆菌,BL21(DE3)),但是最合适的宿主细胞是真核细胞,例如昆虫细胞(例如果蝇,如黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*))、酵母细胞、线虫(例如秀丽隐杆线虫(*C.elegans*))、小鼠(例如小家鼠(*Mus musculus*))或哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或COS细胞、人293T细胞、HeLa细胞、NIH 3T3细胞和小鼠红白血病(MEL)细胞)或人细胞或其他真核细胞。其他合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。合适地,宿主细胞是哺乳动物细胞,如人细胞或昆虫细胞。在一些实施方案中,合适的宿主细胞包括大肠杆菌。

[0344] 通常可以在本发明的实施方案中使用的其他合适的宿主细胞是在实施例部分中提到的那些。可以经由常规转化或转染技术将载体DNA引入宿主细胞中。如本文所用,术语“转化”和“转染”旨在指代用于将外来核酸分子(例如,DNA)引入宿主细胞中的多种公认的技术,包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体转染或电穿孔。用于转化或转染宿主细胞的合适方法是本领域熟知的。

[0345] 当创建细胞系时,通常优选地制备稳定细胞系。例如,对于哺乳动物细胞的稳定转染,已知根据所使用的表达载体和转染技术,只有一小部分细胞可以将外来DNA整合到其基因组中。为了鉴定和选择这些整合体,通常将编码可选择标记物(例如,对抗生素的抗性)的基因与目的基因一起引入宿主细胞中。优选的可选择标记物包括赋予对药物(如G418、潮霉素或甲氨蝶呤)的抗性的那些。可以将编码可选择标记物的核酸分子在同一载体上引入宿

主细胞中,或者可以在单独的载体上引入。可以通过药物选择来鉴定被引入的核酸分子稳定转染的细胞(例如,已经掺入可选择标记基因的细胞将存活,而其他细胞死亡)。

[0346] 在一个实施方案中,将本文所述的构建体整合到宿主细胞的基因组中。稳定整合的优点是实现了各个细胞或克隆之间的均匀性。另一个优点是可以进行最佳生产者的选择。因此,希望创建稳定的细胞系。在另一个实施方案中,将本文所述的构建体转染到宿主细胞中。将构建体转染到宿主细胞中的优点是可以使蛋白质产量最大化。在一个方面,描述了包含本文所述的核酸构建体或载体的细胞。

另外的药剂

[0347] 在一些实施方案中,本文描述了治疗有需要的受试者的增殖性疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)。在一些实施方案中,本文描述了治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与一种或多种另外的药剂的组合。在一些实施方案中,本文描述了治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与一种或多种免疫检查点抑制剂的组合。

[0348] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的药剂包括选自PD-1抑制剂的一种或多种免疫检查点抑制剂。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的药剂包括一种或多种PD-1抑制剂。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、兰博利珠单抗(lambrolizumab)、AMP-224、信迪利单抗(sintilimab)、特瑞普利单抗(toripalimab)、卡瑞利珠单抗(camrelizumab)、替雷利珠单抗(tislelizumab)、多塔利单抗(dostarlimab)(GSK)、PDR001(Novartis)、MGA012(Macrogenics/Incyte)、GLS-010(Arcus/Wuxi)、AGEN2024(Agenus)、西利单抗(cetrelimab)(Janssen)、ABBV-181(Abbvie)、AMG-404(Amgen)、BI-754091(Boehringer Ingelheim)、CC-90006(Celgene)、JTX-4014(Jounce)、PF-06801591(Pfizer)和杰诺单抗(genolimzumab)(Apollomics/Genor BioPharma)。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是纳武单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是西米普利单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是兰博利珠单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是AMP-224。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是信迪利单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是特瑞普利单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是卡瑞利珠单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是替雷利珠单抗。

[0349] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的药剂包括选自PD-L1抑制剂的免疫检查点抑制剂。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-L1抑制剂选自阿替利珠单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、和德瓦鲁单抗(durvalumab)、ASC22(Alphamab/Ascletis)、CX-072(Cytomx)、CS1001(Cstone)、柯希利单抗(cosibelimab)(Checkpoint Therapeutics)、INCB86550(Incyte)和TG-1501(TG Therapeutics)。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-L1抑制剂是阿替利珠单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-L1抑制剂是阿维鲁单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-L1抑制剂是德瓦鲁单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自CTLA-4抑制剂。在一些实施方案中,

所述一种或多种CTLA-4抑制剂选自曲美木单抗 (tremelimumab)、伊匹单抗 (ipilimumab) 和 AGEN-1884 (Agenus)。在一些实施方案中,所述一种或多种CTLA-4抑制剂是曲美木单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种CTLA-4抑制剂是伊匹单抗。

[0350] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的药剂包括选自CTLA-4抑制剂的免疫检查点抑制剂。在一些实施方案中,CTLA-4抑制剂选自曲美木单抗和伊匹单抗。在一些实施方案中,CTLA-4抑制剂是曲美木单抗。在一些实施方案中,CTLA-4抑制剂是伊匹单抗。

治疗方法

[0351] 本文描述了治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的:(a)如本文所述的IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂。在一些实施方案中,本文描述了治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的:(a)如本文所述的IL-2缀合物和(b)一种或多种免疫检查点抑制剂。

癌症类型

[0352] 本文描述了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的本文所述的IL-2缀合物。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,所述受试者的癌症选自肾细胞癌(RCC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、经典型霍奇金淋巴瘤(cHL)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、尿路上皮癌、微卫星不稳定癌、微卫星稳定癌、胃癌、宫颈癌、肝细胞癌(HCC)、梅克尔细胞癌(MCC)、黑色素瘤、小细胞肺癌(SCLC)、食管癌、胶质母细胞瘤、间皮瘤、乳腺癌、三阴性乳腺癌、前列腺癌、去势抵抗性前列腺癌、转移性去势抵抗性前列腺癌、或具有DNA损伤反应(DDR)缺陷的转移性去势抵抗性前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、中度至低度突变负担的肿瘤、皮肤鳞状细胞癌(CSCC)、鳞状细胞皮肤癌(SCSC)、低表达至不表达PD-L1的肿瘤、超出其原发解剖学起源部位的全身性播散至肝脏和CNS的肿瘤以及弥漫性大B细胞淋巴瘤。

[0353] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,所述受试者的癌症选自肾细胞癌(RCC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、尿路上皮癌、黑色素瘤、梅克尔细胞癌(MCC)和头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)。在一个实施方案中,癌症是肾细胞癌(RCC)。在一个实施方案中,癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)。在一个实施方案中,癌症是尿路上皮癌。在一个实施方案中,癌症是黑色素瘤。在一个实施方案中,癌症是梅克尔细胞癌(MCC)。在一个实施方案中,癌症是头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)。

[0354] 在一些实施方案中提供了本文所述的方法,其中所述一种或多种另外的药剂包括一种或多种免疫检查点抑制剂。

[0355] 在一些实施方案中,所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、PD-L2抑制剂、CTLA-4抑制剂、OX40激动剂和4-1BB激动剂。

[0356] 在一些实施方案中,所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自PD-1抑制剂。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、兰博利珠单抗、AMP-224、信迪利单抗、特瑞普利单抗、卡瑞利珠单抗、替雷利珠单抗、多塔利单抗(GSK)、PDR001 (Novartis)、MGA012 (Macrogenics/Incyte)、GLS-010 (Arcus/Wuxi)、AGEN2024 (Agenus)、西利单抗(Janssen)、ABBV-181 (Abbvie)、AMG-404 (Amgen)、BI-754091 (Boehringer Ingelheim)、CC-90006 (Celgene)、JTX-4014 (Jounce)、PF-06801591 (Pfizer)和杰诺单抗(Apollomics/Genor BioPharma)。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑

制剂是派姆单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是纳武单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是西米普利单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是兰博利珠单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是AMP-224。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是信迪利单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是特瑞普利单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是卡瑞利珠单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-1抑制剂是替雷利珠单抗。

[0357] 在一些实施方案中,所述一种或多种PD-L1抑制剂选自阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、和德瓦鲁单抗、ASC22 (Alphamab/Ascletis)、CX-072 (Cytomx)、CS1001 (Cstone)、柯希利单抗 (Checkpoint Therapeutics)、INCB86550 (Incyte) 和TG-1501 (TG Therapeutics)。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-L1抑制剂是阿替利珠单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-L1抑制剂是阿维鲁单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种PD-L1抑制剂是德瓦鲁单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自CTLA-4抑制剂。在一些实施方案中,所述一种或多种CTLA-4抑制剂选自曲美木单抗、伊匹单抗和AGEN-1884 (Agenus)。在一些实施方案中,所述一种或多种CTLA-4抑制剂是曲美木单抗。在一些实施方案中,所述一种或多种CTLA-4抑制剂是伊匹单抗。

[0358] 在一些实施方案中,所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自CTLA-4抑制剂。在一些实施方案中,CTLA-4抑制剂选自曲美木单抗和伊匹单抗。在一些实施方案中,CTLA-4抑制剂是曲美木单抗。在一些实施方案中,CTLA-4抑制剂是伊匹单抗。

[0359] 在一些实施方案中,癌症呈实体瘤形式。在一些实施方案中,癌症呈液体瘤形式。

[0360] 在一些实施方案中,在向受试者施用所述一种或多种另外的药剂之前,将所述IL-2缀合物施用至受试者。在一些实施方案中,在向受试者施用所述IL-2缀合物之前,将所述一种或多种另外的药剂施用至受试者。在一些实施方案中,将所述IL-2缀合物和所述一种或多种另外的药剂同时施用至受试者。

[0361] 在一些实施方案中,除一种或多种检查点抑制剂之外,所述方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的一种或多种血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 途径或哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 抑制剂。在一些实施方案中,向受试者施用一种或多种VEGF途径抑制剂。在一些实施方案中,所述一种或多种VEGF途径抑制剂选自血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR) 酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 和抗VEGF单克隆抗体。在一些实施方案中,所述一种或多种VEGF途径抑制剂选自一种或多种VEGFR TKI。在一些实施方案中,所述一种或多种VEGFR TKI选自卡博替尼、阿昔替尼、帕唑帕尼、舒尼替尼或索拉非尼。在一些实施方案中,所述一种或多种VEGFR TKI是卡博替尼。在一些实施方案中,所述一种或多种VEGFR TKI是阿昔替尼。在一些实施方案中,所述一种或多种VEGFR TKI是帕唑帕尼。在一些实施方案中,所述一种或多种VEGFR TKI是舒尼替尼。在一些实施方案中,其中所述一种或多种VEGFR TKI是索拉非尼。在一些实施方案中,所述一种或多种VEGF途径抑制剂选自一种或多种抗VEGF单克隆抗体。在一些实施方案中,所述一种或多种抗VEGF单克隆抗体是贝伐单抗。

[0362] 在一些实施方案中,所述一种或多种mTOR抑制剂选自雷帕霉素、依维莫司、替西罗莫司 (temsirolimus)、地磷莫司 (ridaforolimus) 和地氟莫司 (deforolimus)。在一些实施方案中,所述一种或多种mTOR抑制剂是雷帕霉素。在一些实施方案中,所述一种或多种mTOR抑制剂是依维莫司。在一些实施方案中,所述一种或多种mTOR抑制剂是替西罗莫司。在一些

实施方案中,所述一种或多种mTOR抑制剂是地磷莫司。在一些实施方案中,所述一种或多种mTOR抑制剂是地氟莫司。在一些实施方案中,所述受试者的癌症是肾细胞癌(RCC)。

[0363] 在一些实施方案中,除一种或多种检查点抑制剂之外,所述方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的一种或多种聚ADP核糖聚合酶(PARP)抑制剂。在一些实施方案中,PARP抑制剂选自奥拉帕尼、尼拉帕尼、卢卡帕尼、他拉唑帕尼(talazoparib)、维利帕尼、CEP-9722和E7016。在一些实施方案中,PARP抑制剂是奥拉帕尼。在一些实施方案中,PARP抑制剂是尼拉帕尼。在一些实施方案中,PARP抑制剂是卢卡帕尼。在一些实施方案中,PARP抑制剂是他拉唑帕尼。在一些实施方案中,PARP抑制剂是维利帕尼。在一些实施方案中,PARP抑制剂是CEP-9722。在一些实施方案中,PARP抑制剂是E7016。

[0364] 在一些实施方案中,除一种或多种检查点抑制剂之外,所述方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的非甾体类抗雄激素化合物(NSAA)。在一些实施方案中,NSAA是氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、图普鲁胺(topilutamide)、阿帕鲁胺(apalutamide)或恩扎鲁胺。在一些实施方案中,NSAA是氟他胺。在一些实施方案中,NSAA是尼鲁米特。在一些实施方案中,NSAA是比卡鲁胺。在一些实施方案中,NSAA是图普鲁胺。在一些实施方案中,NSAA是阿帕鲁胺。在一些实施方案中,NSAA是恩扎鲁胺。

[0365] 在一些实施方案中,除一种或多种检查点抑制剂之外,所述方法进一步包括向受试者施用治疗有效量的一种或多种聚ADP核糖聚合酶(PARP)抑制剂和非甾体类抗雄激素化合物(NSAA),其中PARP抑制剂和NSAA可以独立地选自上文阐明的那些。

[0366] 在一些实施方案中,除一种或多种检查点抑制剂之外,所述一种或多种另外的药剂进一步包括一种或多种化学治疗剂。在一些实施方案中,所述一种或多种化学治疗剂包括一种或多种基于铂的化学治疗剂。在一些实施方案中,所述一种或多种化学治疗剂包括卡铂和培美曲塞。在一些实施方案中,所述一种或多种化学治疗剂包括卡铂和白蛋白结合型紫杉醇(nab-paclitaxel)。在一些实施方案中,所述一种或多种化学治疗剂包括卡铂和多西紫杉醇。在一些实施方案中,所述受试者的癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0367] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的药剂是一种或多种化学治疗剂。在一些实施方案中,所述一种或多种化学治疗剂包括一种或多种基于铂的化学治疗剂。在一些实施方案中,在施用所述IL-2缀合物和一种或多种另外的药剂之前,受试者测试人乳头瘤病毒(HPV)呈阳性。在一些实施方案中,所述受试者的癌症是头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)。在一些实施方案中,所述方法进一步包括受试者测试人乳头瘤病毒呈阳性(HPV+),然后施用所述IL-2缀合物和一种或多种另外的药剂。

施用

[0368] 在一些实施方案中,在施用所述IL-2缀合物和所述一种或多种另外的药剂后,受试者经历了如通过实体瘤免疫相关疗效评价标准(Immune-related Response Evaluation Criteria in Solid Tumors,iRECIST)所测量的反应。

[0369] 在一些实施方案中,反应是完全反应、部分反应或疾病稳定。在一些实施方案中,通过静脉内、皮下、肌内、脑内、鼻内、动脉内、关节内、皮内、玻璃体内、骨内输注、腹膜内或鞘内施用将所述IL-2缀合物施用至受试者。在一些实施方案中,通过静脉内、皮下或肌内施用将所述IL-2缀合物施用至受试者。在一些实施方案中,通过静脉内施用将所述IL-2缀合物施用至受试者。在一些实施方案中,通过皮下施用将所述IL-2缀合物施用至受试者。在一

些实施方案中,通过肌肉施用将所述IL-2缀合物施用至受试者。

[0370] 在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次、每七周一次、每八周一次、每九周一次、每十周一次、每十一周一次、每十二周一次、每十三周一次、每十四周一次、每十五周一次、每十六周一次、每十七周一次、每十八周一次、每十九周一次、每二十周一次、每二十一周一次、每二十二周一次、每二十三周一次、每二十四周一次、每二十五周一次、每二十六周一次、每二十七周一次或每二十八周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每两周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每三周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每四周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每五周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每六周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每七周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每八周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每九周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每十周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每十一周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每十二周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每十三周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每十四周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每十五周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每十六周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每十七周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每十八周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每十九周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每二十周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每二十一周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每二十二周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每二十三周一次。在一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至有需要的受试者,每二十四周一次。

[0371] 在一些实施方案中,对应于这种量的给定药剂的量根据多种因素而变化,所述因素如特定化合物、疾病的严重程度、需要治疗的受试者或宿主的特性(例如,体重),然而根据围绕病例的特定情况(包括例如所施用的具体药剂、施用途径和所治疗的受试者或宿主)以本领域已知的方式常规地确定。在一些情形下,所需剂量方便地以单一剂量或作为分开的剂量呈现,所述分开的剂量是同时(或在短时间段内)或以适当的间隔(例如每天两个、三个、四个或更多个子剂量)施用。

[0372] 在一些实施方案中,所述方法包括以以下范围内的剂量将IL-2缀合物给药至有需要的受试者:从1 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约2 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约4 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约6 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约8 μ

g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约10 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约12 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约14 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约16 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约18 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约20 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约22 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约24 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约26 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约28 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约32 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约34 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约36 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约40 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约45 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约50 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约55 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约60 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约65 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约70 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约75 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约80 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约85 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约90 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约95 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约100 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约110 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约120 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约130 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约140 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约150 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约160 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约170 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约180 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或从约190 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重至约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重。前述范围仅仅是提示性的,因为关于单一治疗方案的变量数量很大,并且相对于这些推荐值的显著偏差并不罕见。此类剂量根据许多变量而改变,不限于所使用化合物的活性、待治疗的疾病或病症、施用方式、个体受试者的需求、所治疗疾病或病症的严重程度以及执业医师的判断。在一些实施方案中,通过细胞培养物或实验动物中的标准制药学程序来确定

此类治疗方案的毒性和治疗功效,所述标准制药学程序包括但不限于LD50(对50%的群体致死的剂量)和ED50(对50%的群体具有治疗效果的剂量)的确定。毒性与治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并且其表示为LD50与ED50之间的比率。展现出高治疗指数的化合物是优选的。将从细胞培养测定和动物研究获得的数据用于制定用于人的剂量范围。此类化合物的剂量优选地在循环浓度的范围内,所述循环浓度包括具有最小毒性的ED50。剂量根据所采用的剂型和所利用的施用途径而在此范围内变化。

[0373] 在一些实施方案中,所述方法包括以以下剂量将IL-2缀合物给药至有需要的受试者:约1 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或约2 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约4 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约6 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约8 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约10 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约12 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约14 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约16 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约18 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约20 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约22 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约24 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约26 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约28 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约30 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约32 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约34 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约36 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约38 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约40 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约42 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约44 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约46 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约48 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约50 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约55 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约60 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约65 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约70 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约75 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约80 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约85 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约90 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约95 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约100 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约110 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约120 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约130 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约140 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约150 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约160 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约170 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约180 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、约190 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重、或约200 μ g的IL-2缀合物/kg的受试者体重。前述范围仅仅是提示性的,因为关于单一治疗方案的变量数量很大,并且相对于这些推荐值的显著偏差并不罕见。此类剂量根据许多变量而改变,不限于所使用化合物的活性、待治疗的疾病或病症、施用方式、个体受试者的需求、所治疗疾病或病症的严重程度以及执业医师的判断。在一些实施方案中,通过细胞培养物或实验动物中的标准制药学程序来确定此类治疗方案的毒性和治疗功效,所述标准制药学程序包括但不限于LD50(对50%的群体致死的剂量)和ED50(对50%的群体具有治疗效果的剂量)的确定。毒性与治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并且其表示为LD50与ED50之间的比率。展现出高治疗指数的化合物是优选的。将从细胞培养测定和动物研究获得的数据用于制定用于人的剂量范围。此类化合物的剂量优选地在循环浓度的范围内,所述循环浓度包括具有最小毒性的ED50。剂量根据所采用的剂型和所利用的施用途径而在此范围内变化。

[0374] 在一些实施方案中,可以以这样的剂量并且使用这样的给药方案来施用另外的药

剂,所述剂量和给药方案已经被确定为对于该另外的药剂安全且有效。例如,可以根据本文所述的方法以每3周约200mg的剂量将派姆单抗施用至有需要的受试者。在另一个例子中,可以根据本文所述的方法以每2周约240mg的剂量或每4周约480mg的剂量将纳武单抗施用至有需要的受试者。在另一个例子中,可以根据本文所述的方法以每3周约350mg的剂量经30分钟作为静脉内输注将西米普利单抗施用至有需要的受试者。在另一个例子中,可以根据本文所述的方法以每2周840mg、每3周1200mg或每4周1680mg的剂量将阿替利珠单抗施用至受试者。在另一个例子中,可以根据本文所述的方法以每2周800mg的剂量将阿维鲁单抗施用至受试者。在另一个例子中,可以根据本文所述的方法以每2周10mg/kg的受试者体重的剂量将德瓦鲁单抗施用至受试者。在另一个例子中,可以根据本文所述的方法以每三周约3mg/kg的受试者体重(经90分钟,总共4剂)或约10mg/kg的受试者体重(经90分钟,总共4剂),然后是10mg/kg的受试者体重(持续3年)的剂量将伊匹单抗施用至受试者以治疗黑色素瘤。对于晚期肾细胞癌,可以根据本文所述的方法以1mg/kg的受试者体重的剂量经30分钟施用伊匹单抗。

[0375] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不需要加强监护设施或者心肺或加强监护医学方面的熟练专家的可用性。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不需要加强监护设施或者心肺或加强监护医学方面的熟练专家的可用性。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不需要加强监护设施的可用性。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不需要心肺或加强监护医学方面的熟练专家的可用性。

施用影响

[0376] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的血管渗漏综合征。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的2级、3级或4级血管渗漏综合征。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的2级血管渗漏综合征。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的3级血管渗漏综合征。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的4级血管渗漏综合征。

[0377] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的血管张力丧失。

[0378] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的血浆蛋白和流体外渗至血管外空间。

[0379] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的低血压和器官灌注减少。

[0380] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的嗜中性粒细胞功能受损。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的趋化作用降低。

[0381] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至

受试者与受试者的播散性感染的风险增加无关。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,播散性感染是脓毒症或细菌性心内膜炎。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,播散性感染是脓毒症。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,播散性感染是细菌性心内膜炎。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,在施用所述IL-2缀合物之前,针对任何预先存在的细菌感染治疗受试者。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,在施用所述IL-2缀合物之前,用选自苯唑西林、萘夫西林、环丙沙星和万古霉素的抗菌剂治疗受试者。

[0382] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会加重受试者的预先存在的或初始呈现的自身免疫性疾病或炎性障碍。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会加重受试者的预先存在的或初始呈现的自身免疫性疾病。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会加重受试者的预先存在的或初始呈现的炎性障碍。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍选自克罗恩病、硬皮病、甲状腺炎、炎性关节炎、糖尿病、眼球型重症肌无力(oculo-bulbar myasthenia gravis)、新月体性IgA肾小球肾炎、胆囊炎、脑血管炎、史-约综合征和大疱性类天疱疮。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是克罗恩病。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是硬皮病。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是甲状腺炎。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是炎性关节炎。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是糖尿病。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是眼球型重症肌无力。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是新月体性IgA肾小球肾炎。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是胆囊炎。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是脑血管炎。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是史-约综合征。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是大疱性类天疱疮。

[0383] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的精神状态变化、言语困难、皮质盲、肢体或步态共济失调、幻觉、激越、迟钝或昏迷。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的癫痫发作。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者在患有已知癫痫症的受试者中不受禁忌。

[0384] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的毛细血管渗漏综合征。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的2级、3级或4级毛细血管渗漏综合征。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的2级毛细血管渗漏综合征。在本文所述的治疗癌症的方法的一

些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的3级毛细血管渗漏综合征。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会引起受试者的4级毛细血管渗漏综合征。

[0385] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至受试者之后引起受试者的平均动脉血压下降。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至受试者之后引起受试者的低血压。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至受试者之后引起受试者经历收缩压低于90mm Hg或从基线收缩压下降20mm Hg。

[0386] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至受试者之后引起受试者的水肿。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至受试者之后引起受试者的肾功能或肝功能受损。

[0387] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至受试者之后引起受试者的嗜酸性粒细胞增多症。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至受试者之后引起受试者外周血中的嗜酸性粒细胞计数超过500/ μ L。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至受试者之后引起受试者外周血中的嗜酸性粒细胞计数超过500/ μ L至1500/ μ L。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至受试者之后引起受试者外周血中的嗜酸性粒细胞计数超过1500/ μ L至5000/ μ L。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至受试者之后引起受试者外周血中的嗜酸性粒细胞计数超过5000/ μ L。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者在正在进行精神药物的现有方案的受试者中不受禁忌。

[0388] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者在正在进行肾毒性药物、骨髓毒性药物、心脏毒性药物或肝毒性药物的现有方案的受试者中不受禁忌。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者在正在进行氨基糖苷类、细胞毒性化学疗法、多柔比星、甲氨蝶呤或天冬酰胺酶的现有方案的受试者中不受禁忌。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者在接受含有抗肿瘤剂的组合方案的受试者中不受禁忌。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,抗肿瘤剂选自达卡巴嗪、顺铂、他莫昔芬和干扰素- α 。

[0389] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至受试者之后引起受试者的一种或多种4级不良事件。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,所述一种或多种4级不良事件选自体温过低;休克;心动过缓;室性期外收缩;心肌缺血;晕厥;出血;房性心律失常;静脉炎;二度房室传导阻滞;心内膜炎;心包积液;外周坏疽;血栓形成;冠状动脉障碍;口炎;恶心和呕

吐;肝功能测试异常;胃肠出血;呕血;血性腹泻;胃肠道障碍;肠穿孔;胰腺炎;贫血;白细胞减少;白细胞增多;低钙血症;碱性磷酸酶升高;血尿素氮(BUN)升高;高尿酸血症;非蛋白氮(NPN)升高;呼吸性酸中毒;嗜睡;激越;神经病;偏执狂反应;抽搐;癫痫大发作性抽搐;谵妄;哮喘;肺水肿;通气过度;低氧症;咯血;通气不足;气胸;瞳孔散大;瞳孔障碍;肾功能异常;肾衰;和急性肾小管坏死。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至一组受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至受试者之后在大于1%的受试者中引起一种或多种4级不良事件。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,所述一种或多种4级不良事件选自体温过低;休克;心动过缓;室性期外收缩;心肌缺血;晕厥;出血;房性心律失常;静脉炎;二度房室传导阻滞;心内膜炎;心包积液;外周坏疽;血栓形成;冠状动脉障碍;口炎;恶心和呕吐;肝功能测试异常;胃肠出血;呕血;血性腹泻;胃肠道障碍;肠穿孔;胰腺炎;贫血;白细胞减少;白细胞增多;低钙血症;碱性磷酸酶升高;血尿素氮(BUN)升高;高尿酸血症;非蛋白氮(NPN)升高;呼吸性酸中毒;嗜睡;激越;神经病;偏执狂反应;抽搐;癫痫大发作性抽搐;谵妄;哮喘;肺水肿;通气过度;低氧症;咯血;通气不足;气胸;瞳孔散大;瞳孔障碍;肾功能异常;肾衰;和急性肾小管坏死。

[0390] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至一组受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至受试者之后在大于1%的受试者中引起一种或多种不良事件,其中所述一种或多种不良事件选自十二指肠溃疡形成;肠坏死;心肌炎;室上性心动过速;继发于视神经炎的永久性或暂时性失明;短暂脑缺血发作;脑膜炎;脑水肿;心包炎;过敏性间质性肾炎;和气管食管瘘。

[0391] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将有效量的IL-2缀合物施用至一组受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至受试者之后在大于1%的受试者中引起一种或多种不良事件,其中所述一种或多种不良事件选自恶性高热;心脏停搏;心肌梗死;肺栓塞;脑卒中;肠穿孔;肝或肾衰竭;导致自杀的严重抑郁症;肺水肿;呼吸停止;呼吸衰竭。

[0392] 在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将所述IL-2缀合物施用至受试者在不增加受试者的外周血CD4⁺调节性T细胞的数量,的情况下增加受试者的外周血CD8⁺ T和NK细胞的数量。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将所述IL-2缀合物施用至受试者在不增加受试者的外周血嗜酸性粒细胞的数量的情况下增加受试者的外周血CD8⁺ T和NK细胞的数量。在本文所述的治疗癌症的方法的一些实施方案中,将所述IL-2缀合物施用至受试者在不增加受试者的瘤内CD4⁺调节性T细胞的数量,的情况下,在不增加受试者的瘤内CD8⁺ T和NK细胞的数量,的情况下增加受试者的外周血CD8⁺ T和NK细胞的数量。

药物组合物和配制品

[0393] 本文描述了药物组合物,其包含有效量的本文所述的IL-2缀合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0394] 在一些实施方案中,通过多种施用途径将本文所述的包含细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)的药物组合物和配制品施用至受试者,所述施用途径包括但不限于肠胃外、口服、经颊、直肠、舌下或透皮施用途径。在一些情况下,肠胃外施用包括静脉内、皮下、肌肉、脑内、鼻内、动脉内、关节内、皮内、玻璃体内、骨内输注、腹膜内或鞘内施用。在一些情形下,将药物组合物配制用于局部施用。在其他情形下,将药物组合物配制用于全身施用。在一些实施方案中,通过静脉内、皮下和肌肉施用将本文所述的药物组合物和配制品施用至受试

者。在一些实施方案中,通过静脉内施用将本文所述的药物组合物和配制品施用至受试者。在一些实施方案中,通过施用将本文所述的药物组合物和配制品施用至受试者。在一些实施方案中,通过肌内施用将本文所述的药物组合物和配制品施用至受试者。

[0395] 在一些实施方案中,药物配制品包括但不限于水性液体分散液、自乳化分散液、固体溶液、脂质体分散液、气溶胶、固体剂型、粉末、速释配制品、控释配制品、速融配制品、片剂、胶囊、丸剂、延迟释放配制品、延长释放配制品、脉冲式释放配制品、多颗粒配制品(例如,纳米颗粒配制品)和混合式速释与控释配制品。

[0396] 在一些实施方案中,药物配制品包括基于与本文公开的组合物相容性和所需剂型的释放曲线特性而选择的载体或载体材料。示例性载体材料包括例如粘合剂、助悬剂、崩解剂、填充剂、表面活性剂、增溶剂、稳定剂、润滑剂、润湿剂、稀释剂等。药学上相容的载体材料包括但不限于阿拉伯胶、明胶、胶体二氧化硅、甘油磷酸钙、乳酸钙、麦芽糊精、甘油、硅酸镁、聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)、胆固醇、胆固醇酯、酪蛋白酸钠、大豆卵磷脂、牛磺胆酸、磷脂酰胆碱、氯化钠、磷酸三钙、磷酸氢二钾、纤维素和纤维素缀合物、糖硬脂酰乳酸钠、角叉菜胶、甘油单酯、甘油二酯、预胶化淀粉等。参见例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第十九版(Easton,Pa.:Mack Publishing Company,1995),Hoover,John E.,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pennsylvania 1975,Liberman,H.A.和Lachman,L.编辑,Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Decker,New York,N.Y.,1980,和Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第七版(Lippincott Williams&Wilkins1999),将其中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[0397] 在一些情况下,将药物组合物配制为免疫脂质体,其包含与脂质体的脂质双层直接或间接结合的多种IL-2缀合物。示例性脂质包括但不限于脂肪酸;磷脂;固醇,如胆固醇;鞘脂,如鞘磷脂;糖鞘脂,如神经节苷脂、红细胞糖苷脂和脑苷脂;表面活性剂胺,如硬脂酰胺、油胺和亚油胺。在一些情形下,脂质包括阳离子脂质。在一些情形下,脂质包括磷脂。示例性磷脂包括但不限于磷脂酸("PA")、磷脂酰胆碱("PC")、磷脂酰甘油("PG")、磷脂酰乙醇胺("PE")、磷脂酰肌醇("PI")、和磷脂酰丝氨酸("PS")、鞘磷脂(包括脑鞘磷脂)、卵磷脂、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、脑苷脂、二花生酰基磷脂酰胆碱("DAPC")、二癸酰基-L- α -磷脂酰胆碱("DDPC")、二反油酰基磷脂酰胆碱("DEPC")、二月桂酰基磷脂酰胆碱("DLPC")、二亚油酰基磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱("DMPC")、二油酰基磷脂酰胆碱("DOPC")、二棕榈酰基磷脂酰胆碱("DPPC")、二硬脂酰基磷脂酰胆碱("DSPC")、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱("POPC")、二花生酰基磷脂酰甘油("DAPG")、二癸酰基-L- α -磷脂酰甘油("DDPG")、二反油酰基磷脂酰甘油("DEPG")、二月桂酰基磷脂酰甘油("DLPG")、二亚油酰基磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油("DMPG")、二油酰基磷脂酰甘油("DOPG")、二棕榈酰基磷脂酰甘油("DPPG")、二硬脂酰基磷脂酰甘油("DSPG")、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰甘油("POPG")、二花生酰基磷脂酰乙醇胺("DAPE")、二癸酰基-L- α -磷脂酰乙醇胺("DDPE")、二反油酰基磷脂酰乙醇胺("DEPE")、二月桂酰基磷脂酰乙醇胺("DLPE")、二亚油酰基磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺("DMPE")、二油酰基磷脂酰乙醇胺("DOPE")、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺("DPPE")、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺("DSPE")、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺("POPE")、二花生酰基磷脂酰肌醇("DAPI")、二癸酰基-L- α -

磷脂酰肌醇(“DDPI”)、二反油酰基磷脂酰肌醇(“DEPI”)、二月桂酰基磷脂酰肌醇(“DLPI”)、二亚油酰基磷脂酰肌醇、二肉豆蔻酰基磷脂酰肌醇(“DMPI”)、二油酰基磷脂酰肌醇(“DOPI”)、二棕榈酰基磷脂酰肌醇(“DPPI”)、二硬脂酰基磷脂酰肌醇(“DSPI”)、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰肌醇(“POPI”)、二花生酰基磷脂酰丝氨酸(“DAPS”)、二癸酰基-L- α -磷脂酰丝氨酸(“DDPS”)、二反油酰基磷脂酰丝氨酸(“DEPS”)、二月桂酰基磷脂酰丝氨酸(“DLPS”)、二亚油酰基磷脂酰丝氨酸、二肉豆蔻酰基磷脂酰丝氨酸(“DMPS”)、二油酰基磷脂酰丝氨酸(“DOPS”)、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸(“DPPS”)、二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸(“DSPS”)、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰丝氨酸(“POPS”)、二花生酰基鞘磷脂、二癸酰基鞘磷脂、二反油酰基鞘磷脂、二月桂酰基鞘磷脂、二亚油酰基鞘磷脂、二肉豆蔻酰基鞘磷脂、鞘磷脂、二油酰基鞘磷脂、二棕榈酰基鞘磷脂、二硬脂酰基鞘磷脂以及1-棕榈酰基-2-油酰基-鞘磷脂。

[0398] 在一些情形下,药物配制品进一步包括pH调节剂或缓冲剂,其包括酸,如乙酸、硼酸、柠檬酸、乳酸、磷酸和盐酸;碱,如氢氧化钠、磷酸钠、硼酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠、乳酸钠和三羟甲基氨基甲烷;以及缓冲液,如柠檬酸盐/右旋糖、碳酸氢钠和氯化铵。以使组合物的pH维持在可接受范围内所需的量包括此类酸、碱和缓冲液。

[0399] 在一些情形下,药物配制品以使组合物的渗透压在可接受范围内所需的量包括一种或多种盐。此类盐包括具有钠、钾或铵阳离子和氯离子、柠檬酸根、抗坏血酸根、硼酸根、磷酸根、碳酸氢根、硫酸根、硫代硫酸根或亚硫酸氢根阴离子的那些,合适的盐包括氯化钠、氯化钾、硫代硫酸钠、亚硫酸氢钠和硫酸铵。

[0400] 在一些实施方案中,药物配制品包括但不限于糖(如海藻糖、蔗糖、甘露醇、麦芽糖、葡萄糖)或盐(如磷酸钾、柠檬酸钠、硫酸铵)和/或其他药剂(如肝素),以增加多肽的溶解度和体内稳定性。

[0401] 在一些情形下,药物配制品进一步包括用于稳定化合物的稀释剂,因为它们可以提供更稳定的环境。溶解于缓冲溶液中的盐(其也可以提供pH控制或维持)在本领域中用作稀释剂,包括但不限于磷酸盐缓冲盐水溶液。在某些情形下,稀释剂增加组合物的体积以有助于压缩或产生足够的均匀共混物体积用于胶囊填充。此类化合物可以包括例如乳糖、淀粉、甘露醇、山梨醇、右旋糖、微晶纤维素(如Avicel[®])、磷酸氢钙、磷酸氢钙二水合物、磷酸三钙、磷酸钙、无水乳糖、喷雾干燥的乳糖、预胶化淀粉、可压缩糖(如Di-Pac[®] (Amstar))、甘露醇、羟丙基甲基纤维素、醋酸硬脂酸羟丙基甲基纤维素、基于蔗糖的稀释剂、糖果剂的糖、硫酸二氢钙一水合物、硫酸钙二水合物、乳酸钙三水合物、葡萄糖结合剂(dextrate)、谷物水解固形物、直链淀粉、粉状纤维素、碳酸钙、甘氨酸、高岭土、甘露醇、氯化钠、肌醇、膨润土等。在一些实施方案中,本文公开的IL-2缀合物可以用于药物配制品中,所述药物配制品包含组氨酸、山梨醇和聚山梨醇酯80或者提供稳定配制品且可以施用至有需要的受试者的任何组合。在一个实施方案中,本文公开的IL-2缀合物可以呈现为合适的容器(如小瓶)中的成品药,如下:IL-2缀合物(约2mg至约10mg);L-组氨酸(约0.5mg至约2mg);L-组氨酸盐酸盐(约1mg至约2mg);山梨醇(约20mg至约80mg);和聚山梨醇酯80(约0.1mg至约0.2mg);具有足量的注射用水以提供适用于所公开方法中的液体配制品。

[0402] 在一些情况下,药物配制品包括崩解剂(disintegration agent)或崩解剂(disintegrant)以促进物质的分解或崩解。术语“崩解”包括剂型在与胃肠液接触时的溶解

和分散二者。崩解剂的例子包括淀粉,例如天然淀粉(如玉米淀粉或马铃薯淀粉)、预胶化淀粉(如National 1551或Amijel[®])或羟基乙酸淀粉钠(如Promogel[®]或Explotab[®]);纤维素,如木制品、甲基结晶纤维素(例如,Avicel[®]、Avicel[®] PH101、Avicel[®] PH102、Avicel[®] PH105、Elcema[®] P100、Emcocel[®]、Vivacel[®]、Ming Tia[®]和Solka-Floc[®])、甲基纤维素、交联羧甲基纤维素或交联纤维素(如交联羧甲基纤维素钠(Ac-Di-Sol[®]))、交联羧甲基纤维素或交联交联羧甲基纤维素);交联淀粉,如羟基乙酸淀粉钠;交联聚合物,如交联维酮、交联聚乙烯基吡咯烷酮;海藻酸盐,如海藻酸或海藻酸的盐(如海藻酸钠);黏土,如Veegum[®] HV(硅酸镁铝);胶质,如琼脂、瓜尔胶、槐豆胶、卡拉牙胶、果胶或黄蓍胶;羟基乙酸淀粉钠;膨润土;天然海绵;表面活性剂;树脂,如阳离子交换树脂;柑橘渣;十二烷基硫酸钠;十二烷基硫酸钠与淀粉的组合等。

[0403] 在一些情形下,药物配制品包括填充剂,如乳糖、碳酸钙、磷酸钙、磷酸氢钙、硫酸钙、微晶纤维素、纤维素粉、右旋糖、葡萄糖结合剂、葡聚糖、淀粉、预胶化淀粉、蔗糖、木糖醇、乳糖醇、甘露醇、山梨醇、氯化钠、聚乙二醇等。

[0404] 润滑剂和助流剂也任选地包括在本文所述的药物配制品中,用于防止、减少或抑制材料的粘附或摩擦。示例性润滑剂包括例如硬脂酸、氢氧化钙、滑石粉、硬脂酰富马酸钠、烃(如矿物油,或氢化植物油,如氢化大豆油(Sterotex[®]))、高级脂肪酸及其碱金属和碱土金属盐(如铝、钙、镁、锌、硬脂酸、硬脂酸钠)、甘油、滑石粉、蜡、Stearowet[®]、硼酸、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、亮氨酸、聚乙二醇(例如,PEG-4000)或甲氧基聚乙二醇(如Carbowax[™])、油酸钠、苯甲酸钠、山萘酸甘油酯、聚乙二醇、十二烷基硫酸镁或十二烷基硫酸钠、胶体二氧化硅(如Syloid[™]、Cab-O-Sil[®])、淀粉(如玉米淀粉)、硅油、表面活性剂等。

[0405] 增塑剂包括用于软化微囊化材料或薄膜包衣以使其脆性降低的化合物。合适的增塑剂包括例如聚乙二醇(如PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1450、PEG 3350和PEG 800)、硬脂酸、丙二醇、油酸、三甲基纤维素和三醋汀。增塑剂也可以起分散剂或润湿剂的作用。

[0406] 增溶剂包括诸如三醋汀、柠檬酸三乙酯、油酸乙酯、辛酸乙酯、十二烷基硫酸钠、多库酯钠、维生素E TPGS、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、N-羟乙基吡咯烷酮、聚乙烯基吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、羟丙基环糊精、乙醇、正丁醇、异丙醇、胆固醇、胆汁盐、聚乙二醇200-600、四氢呋喃聚乙二醇醚、二乙二醇单乙基醚、丙二醇和二甲基异山梨醇酯等化合物。

[0407] 稳定剂包括诸如任何抗氧化剂、缓冲剂、酸、防腐剂等化合物。示例性稳定剂包括L-精氨酸盐酸盐、氨基丁三醇、白蛋白(人)、柠檬酸、苯甲醇、苯酚、磷酸二氢二钠脱水合物、丙二醇、间甲酚(metacresol)或间甲酚(m-cresol)、乙酸锌、聚山梨醇酯-20或Tween[®]20或氨丁三醇。

[0408] 助悬剂包括诸如以下的化合物:聚乙烯基吡咯烷酮,例如聚乙烯基吡咯烷酮K12、聚乙烯基吡咯烷酮K17、聚乙烯基吡咯烷酮K25或聚乙烯基吡咯烷酮K30;乙烯基吡咯烷酮/乙酸乙烯酯共聚物(S630);聚乙二醇,例如聚乙二醇可以具有约300至约6000、或约3350至约4000、或约7000至约5400的分子量;羧甲基纤维素钠;甲基纤维素;羟丙基甲基纤维素;醋酸硬脂酸羟甲基纤维素;聚山梨醇酯-80;羟乙基纤维素;海藻酸钠;胶质,如例如黄蓍胶和阿拉伯胶、瓜尔胶、黄原胶类(包括黄原胶);糖;纤维质,如例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素;聚山梨醇酯-80;海藻酸钠;聚乙氧基化脱

水山梨醇单月桂酸酯、聚乙氧基化脱水山梨醇单月桂酸酯；聚维酮等。

[0409] 表面活性剂包括诸如十二烷基硫酸钠、多库酯钠、Tween 60或80、三醋汀、维生素E TPGS、脱水山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯、聚山梨酸酯、泊洛沙姆(polaxamer)、胆汁盐、单硬脂酸甘油酯、环氧乙烷与环氧丙烷的共聚物(例如, Pluronic® (BASF))等化合物。另外的表面活性剂包括聚氧乙烯脂肪酸甘油酯和植物油(例如, 聚氧乙烯(60)氢化蓖麻油)以及聚氧乙烯烷基醚和烷基苯基醚(例如, 辛苯聚醇10、辛苯聚醇40)。有时, 包括表面活性剂以增强物理稳定性或用于其他目的。

[0410] 粘度增强剂包括例如甲基纤维素、黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、醋酸硬脂酸羟丙基甲基纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、卡波姆、聚乙烯醇、海藻酸盐、阿拉伯胶、壳聚糖及其组合。

[0411] 润湿剂包括诸如油酸、单硬脂酸甘油酯、脱水山梨醇单油酸酯、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯、多库酯钠(sodium docusate)、油酸钠、十二烷基硫酸钠、多库酯钠(sodium docusate)、三醋汀、Tween 80、维生素E TPGS、铵盐等化合物。

[0412] 在一些情形下, 将包含IL-2缀合物(如式(I-XVII)的那些)和免疫检查点抑制剂的药物组合物作为包含两种药物的配制品施用。在一些情形下, 所述IL-2缀合物与免疫检查点抑制剂的重量百分比或反之亦然在10:1至1:10之间。在一些情形下, 所述IL-2缀合物与免疫检查点抑制剂的重量百分比或反之亦然在7:1至1:2之间。在一些情形下, 所述IL-2缀合物与免疫检查点抑制剂的重量百分比或反之亦然在5:1至1:5之间。在一些情形下, 所述IL-2缀合物与免疫检查点抑制剂的重量百分比或反之亦然在3:1至1:3之间。在一些情形下, 所述IL-2缀合物与免疫检查点抑制剂的重量百分比或反之亦然为约10:1、或约9:1、约8:1、约7:1、约6:1、约5:1、约4:1、约3:1、约2:1或约1:1。在一些情形下, 所述IL-2缀合物与免疫检查点抑制剂的重量百分比或反之亦然为10:1至1:1、7:1至2:1、5:1至1:1或3:1至1:1。

[0413] 在某些实施方案中, 将免疫检查点抑制剂(如PD-1抑制剂)、如本文所述的IL-2缀合物(如式(I-XVII)的那些)的组合作为纯化学品施用。在其他实施方案中, 将免疫检查点抑制剂和本文所述的IL-2缀合物的组合与基于所选择的施用途径和标准药学实践(如例如在Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 第21版Mack Pub.Co., Easton, PA (2005), 将其公开内容通过引用并入本文)中所述)而选择的药学上合适或可接受的载体(在本文中也称为药学上合适的(或可接受的)赋形剂、生理上合适的(或可接受的)赋形剂或生理上合适的(或可接受的)载体)组合。在一些实施方案中, 将免疫检查点抑制剂和本文所述的IL-2缀合物各自作为单独的组合物施用。在一些实施方案中, 将免疫检查点抑制剂和/或本文所述的IL-2缀合物的单独组合物与合适或可接受的赋形剂组合。在一些实施方案中, 将免疫检查点抑制剂和本文所述的IL-2缀合物作为单一的组合的组合物施用。

[0414] 本文提供了药物组合物, 其包含本文所述的IL-2缀合物和免疫检查点抑制剂以及一种或多种药学上可接受的载体。如果载体与组合物的其他成分相容并且对组合物的接受者(即, 受试者或患者)无害, 则一种或多种载体(或一种或多种赋形剂)是可接受的或合适的。在某些实施方案中, 免疫检查点抑制剂和本文所述的IL-2缀合物是基本上纯的, 因为它

含有小于约5%、或小于约1%、或小于约0.1%的其他有机小分子,如未反应的中间体或例如在合成方法的一个或多个步骤中产生的合成副产物。在一些情形下,药物组合物包含免疫检查点抑制剂和本文所述的IL-2缀合物以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。在一些情形下,包含免疫检查点抑制剂和本文所述的IL-2缀合物或其组合的药物组合物包含(通过非限制性例子的方式)诸如USP注射级0.9%氯化钠、脱水醇、dl- α 生育酚、无水柠檬酸、聚山梨醇酯80、聚乙二醇400、丙二醇、苯甲醇、柠檬酸钠、亚硫酸钠、聚氧乙烯蓖麻油(cremophor EL)、白蛋白或其任何组合等赋形剂。在一些情形下,药物组合物包含纳米颗粒。在一些情形下,药物组合物包含通常用于可注射组合物的其他赋形剂。在一些情形下,药物组合物包含造影剂,以帮助可视化药物组合物的递送。在一些情形下,药物组合物包含液体、悬浮液、溶液或凝胶。在一些情形下,包含免疫检查点抑制剂和本文所述的IL-2缀合物或其组合的药物组合物是可注射的。在一些情形下,药物组合物包含使免疫检查点抑制剂和本文所述的IL-2缀合物或其组合增溶的赋形剂。在另一个实施方案中,包含免疫检查点抑制剂和本文所述的IL-2缀合物的药物组合物以用于肠胃外施用的剂型提供,所述剂型包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。在一些情形下,包含免疫检查点抑制剂和本文所述的IL-2缀合物或其组合的药物组合物是可注射的。在将药物组合物配制用于静脉内、皮肤或皮下注射的情况下,活性成分呈肠胃外可接受的水溶液形式,其是无热原的,并且具有合适的pH、等渗性和稳定性。本领域相关技术人员完全能够使用例如等渗媒介物(如氯化钠注射液、林格注射液或乳酸钠林格注射液)来制备合适的溶液。在一些实施方案中,包括防腐剂、稳定剂、赋形剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。

试剂盒/制品

[0415] 在某些实施方案中,本文公开了与本文所述的一种或多种方法和组合物一起使用的试剂盒和制品。此类试剂盒包括载体、包装或容器,其被分隔以容纳一个或多个容器如小瓶、管等,所述一个或多个容器中的每一个包含待在本文所述的方法中使用的单独要素之一。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器和试管。在一个实施方案中,容器由各种材料(如玻璃或塑料)形成。

[0416] 试剂盒通常包括列出内容物和/或使用说明书的标签以及包含使用说明书的包装说明书。通常还将包括一组说明书。

[0417] 在一个实施方案中,标签在容器上或与容器相关。在一个实施方案中,当形成标签的字母、数字或其他字符被贴附、模制或蚀刻到容器本身中时,标签在容器上;当标签存在于也容纳容器的器皿或载体内时,标签与容器相关,例如作为包装说明书。在一个实施方案中,标签用于指示内容物将用于特定治疗应用。标签还指示如在本文所述的方法中使用内容物的指导。

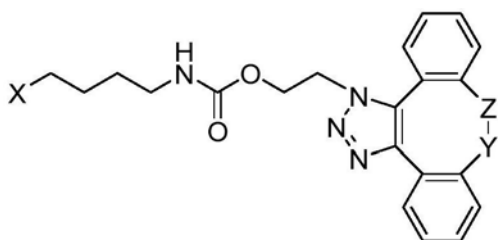
[0418] 在某些实施方案中,药物组合物呈现在包装或分配器装置中,所述装置含有一个或多个含有本文提供的化合物的单位剂型。包装例如含有金属或塑料箔,如泡罩包装。在一个实施方案中,包装或分配器装置附有施用说明书。在一个实施方案中,包装或分配器还附有与容器相连的通知,所述通知的形式由管理药物制造、使用或销售的政府机构规定,所述通知反映了所述机构对药物形式用于人用或兽用施用的批准。例如,这样的通知是由美国食品药品监督管理局批准的药物标签或者经批准的产品说明书。在一个实施方案中,还制备了含有在相容的药物载体中配制的本文提供的化合物的组合物,将其放置在适当的容器

中,并且标记用于治疗所指示病症。

示例性实施方案

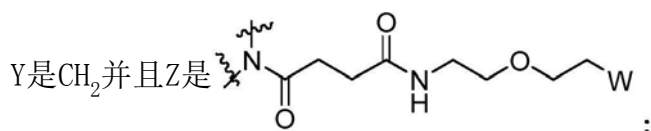
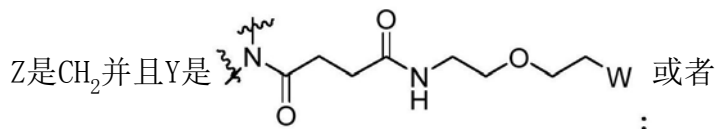
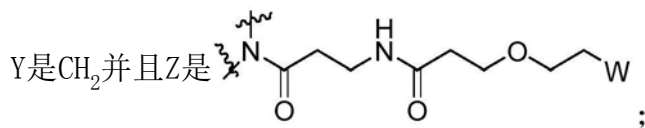
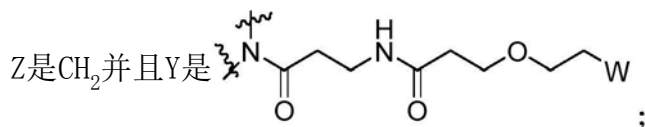
[0419] 通过以下实施方案进一步描述本公开文本。每个实施方案的特征都可在适当和实用的情况下与任何其他实施方案组合。

[0420] 实施方案1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(I)的结构或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物替代:



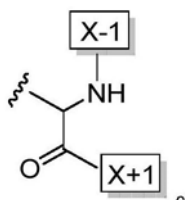
式 (I);

其中:

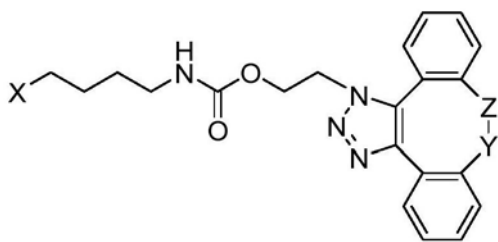


W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:

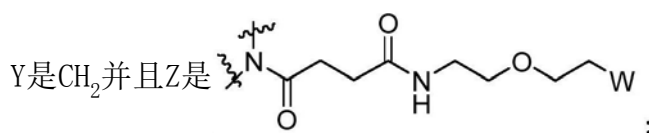
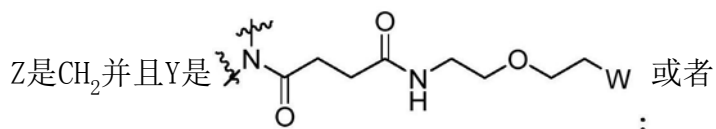
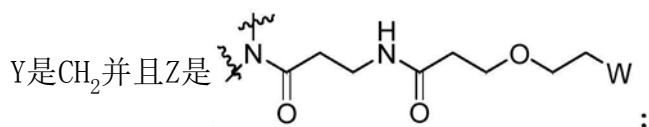
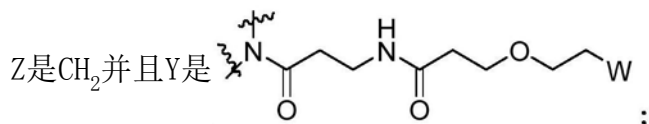


[0421] 实施方案1.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(I)的结构或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物替代:



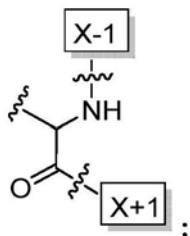
式 (I);

其中:



W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团;并且

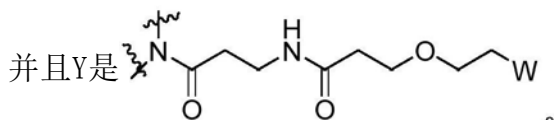
X具有以下结构:



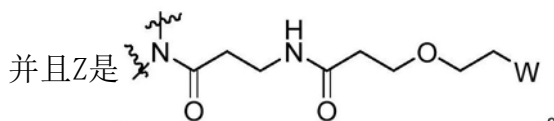
X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

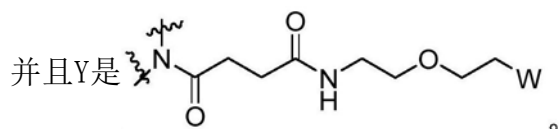
[0422] 实施方案2.根据实施方案1或1.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中,Z是CH₂



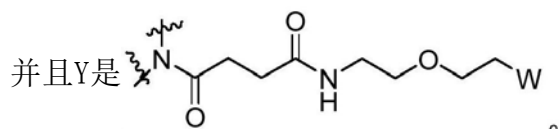
[0423] 实施方案3.根据实施方案1或1.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中,Y是CH₂



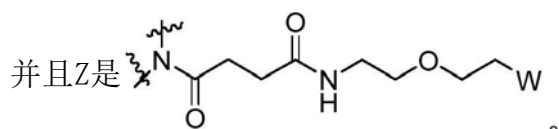
[0424] 实施方案4.根据实施方案1或1.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中,Z是CH₂



[0425] 实施方案5.根据实施方案1或1.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中,Z是CH₂



[0426] 实施方案6.根据实施方案1或1.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中,Y是CH₂



[0427] 实施方案7.根据实施方案1或1.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有选自5kDa、10kDa、20kDa和30kDa的平均分子量。

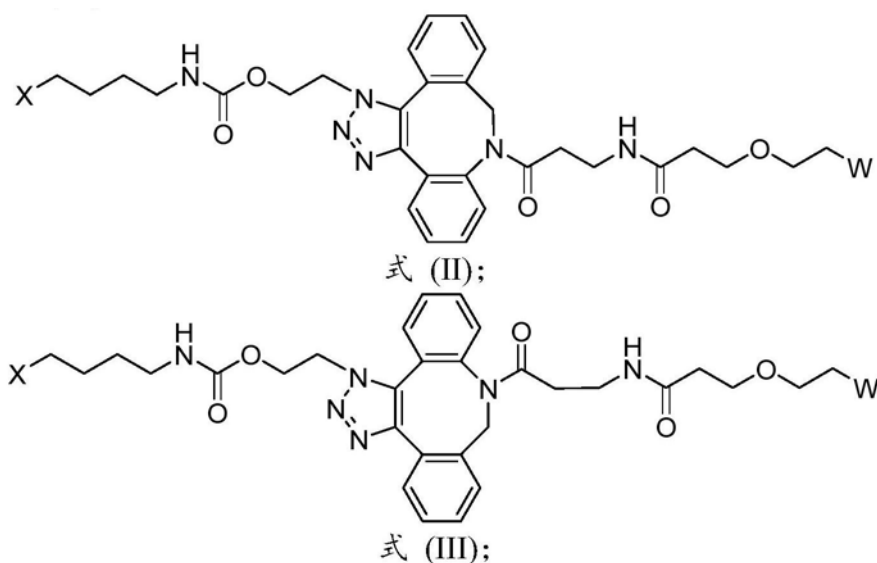
[0428] 实施方案8.根据实施方案1或1.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有10kDa、20kDa或30kDa的平均分子量,或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0429] 实施方案9.根据实施方案1或1.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中,所述PEG基团具有30kDa的平均分子量。

[0430] 实施方案10.根据实施方案1或1.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中,所述式(I)的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71。

[0431] 实施方案11.根据实施方案1或1.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中,所述式(I)的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自F41、E61和P64。

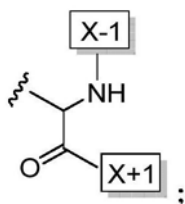
[0432] 实施方案12.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:15-19中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]具有式(II)或式(III)或者式(II)和式(III)的混合物的结构:



其中:

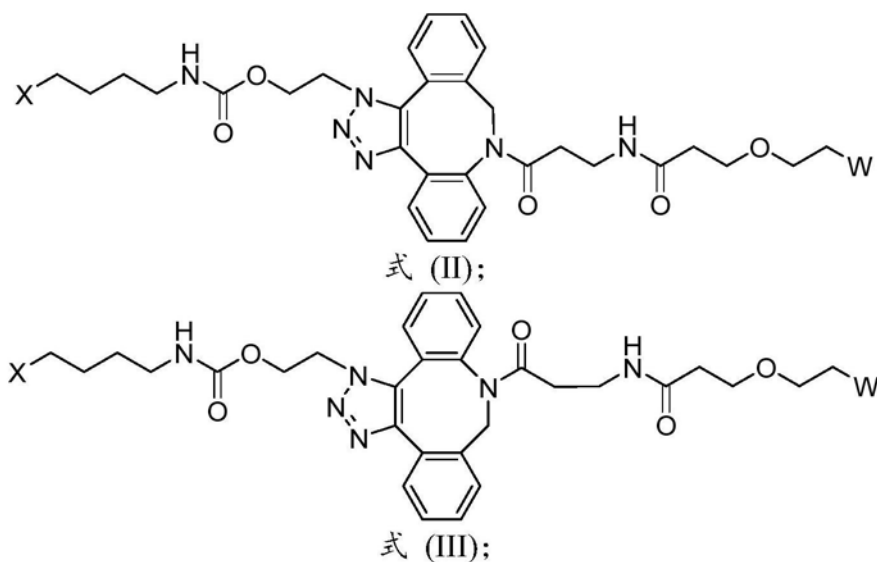
W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团；并且

X具有以下结构：



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

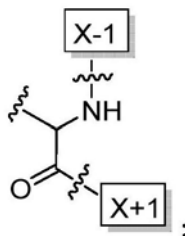
[0433] 实施方案12.1. 一种治疗受试者的癌症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂，其中所述IL-2缀合物包含 SEQ ID NO:15-19中任一个的氨基酸序列，其中[AzK_PEG]具有式 (II) 或式 (III) 或者式 (II) 和式 (III) 的混合物的结构：



其中：

W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团；并且

X具有以下结构：



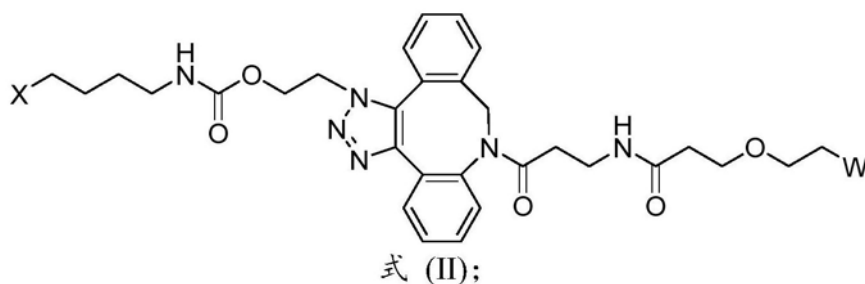
X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点；并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点；

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0434] 实施方案13. 根据实施方案12或12.1所述的方法，其中[AzK_PEG]是式 (II) 和式 (III) 的混合物。

[0435] 实施方案14.根据实施方案12或12.1所述的方法,其中[AzK_PEG]具有式(II)的结构:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0436] 实施方案15.根据实施方案14所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO: 15的氨基酸序列。

[0437] 实施方案16.根据实施方案15所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0438] 实施方案17.根据实施方案16所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0439] 实施方案18.根据实施方案17所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0440] 实施方案19.根据实施方案17所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0441] 实施方案20.根据实施方案12或12.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0442] 实施方案21.根据实施方案20所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0443] 实施方案22.根据实施方案21所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0444] 实施方案23.根据实施方案22所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0445] 实施方案24.根据实施方案22所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0446] 实施方案25.根据实施方案12或12.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0447] 实施方案26.根据实施方案25所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0448] 实施方案27.根据实施方案26所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0449] 实施方案28.根据实施方案27所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0450] 实施方案29.根据实施方案27所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0467] 实施方案46.根据实施方案12或12.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0468] 实施方案47.根据实施方案46所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0469] 实施方案48.根据实施方案47所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0470] 实施方案49.根据实施方案48所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0471] 实施方案50.根据实施方案48所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0472] 实施方案51.根据实施方案12或12.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0473] 实施方案52.根据实施方案51所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0474] 实施方案53.根据实施方案52所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0475] 实施方案54.根据实施方案53所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0476] 实施方案55.根据实施方案53所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0477] 实施方案56.根据实施方案12或12.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0478] 实施方案57.根据实施方案56所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0479] 实施方案58.根据实施方案57所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0480] 实施方案59.根据实施方案58所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0481] 实施方案60.根据权利要求实施方案58所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0482] 实施方案61.根据实施方案12或12.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0483] 实施方案62.根据实施方案61所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0484] 实施方案63.根据实施方案62所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0485] 实施方案64.根据实施方案63所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0486] 实施方案65.根据实施方案63所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG

基团。

[0487] 实施方案66.根据实施方案1至65中任一项所述的方法,其中W是线性或分支PEG基团。

[0488] 实施方案67.根据实施方案1至65中任一项所述的方法,其中W是线性PEG基团。

[0489] 实施方案68.根据实施方案1至65中任一项所述的方法,其中W是分支PEG基团。

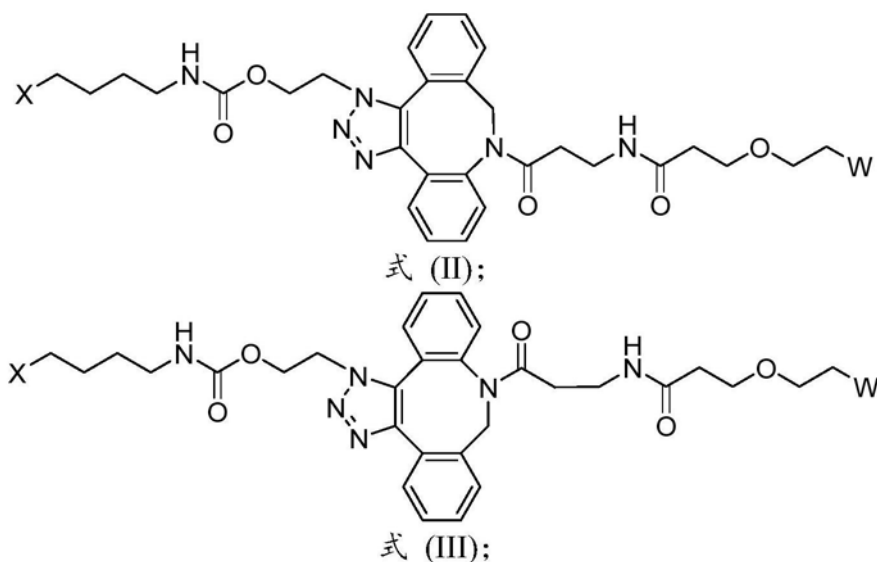
[0490] 实施方案69.根据实施方案1至65中任一项所述的方法,其中W是甲氧基PEG基团。

[0491] 实施方案70.根据实施方案69所述的方法,其中所述甲氧基PEG基团是线性或分支的。

[0492] 实施方案71.根据实施方案70所述的方法,其中所述甲氧基PEG组是线性的。

[0493] 实施方案72.根据实施方案70所述的方法,其中所述甲氧基PEG组是分支的。

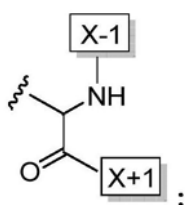
[0494] 实施方案73.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含 SEQ ID NO:20-24中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG5kD]具有式(II)或式(III)或者式(II)和式(III)的混合物的结构:



其中:

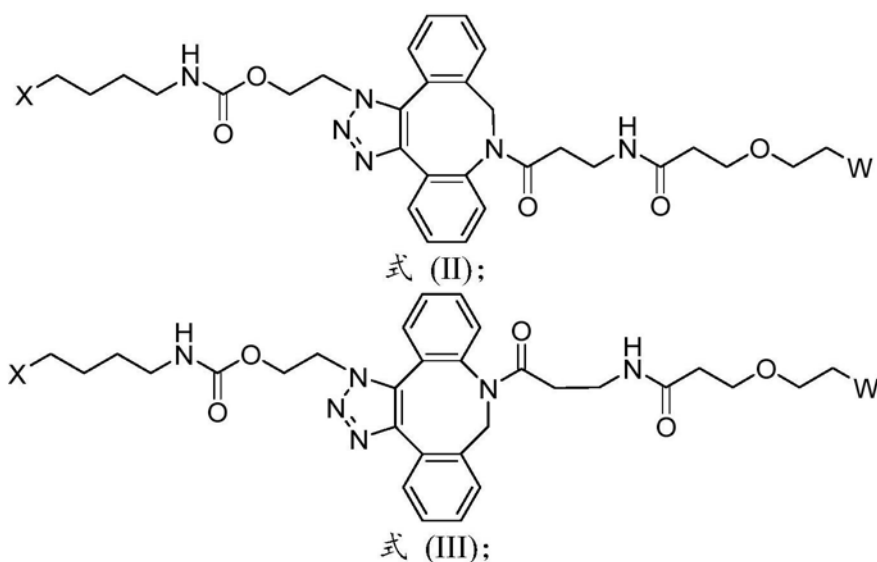
W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

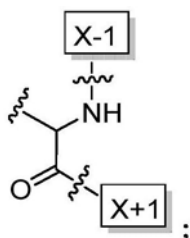
[0495] 实施方案73.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含 SEQ ID NO:20-24中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG5kD]具有式(II)或式(III)或者式(II)和式(III)的混合物的结构:



其中:

W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点;

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0496] 实施方案74.根据实施方案73或73.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

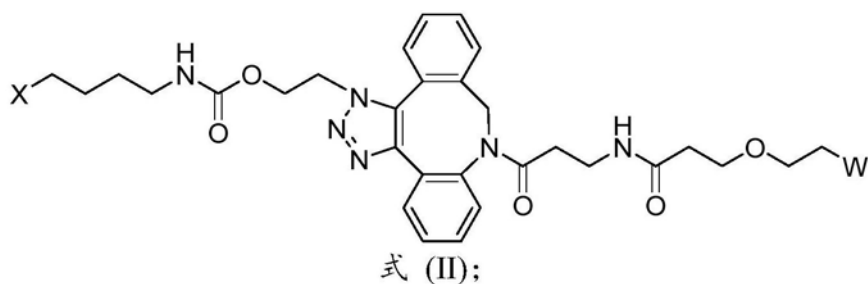
[0497] 实施方案75.根据实施方案73或73.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列。

[0498] 实施方案76.根据实施方案73或73.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0499] 实施方案77.根据实施方案73或73.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列。

[0500] 实施方案78.根据实施方案73或73.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

[0501] 实施方案79.根据实施方案73或73.1所述的方法,其中[AzK_PEG5kD]具有式(II)的结构:



[0502] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0503] 实施方案80. 根据实施方案79所述的方法, 其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO: 20的氨基酸序列。

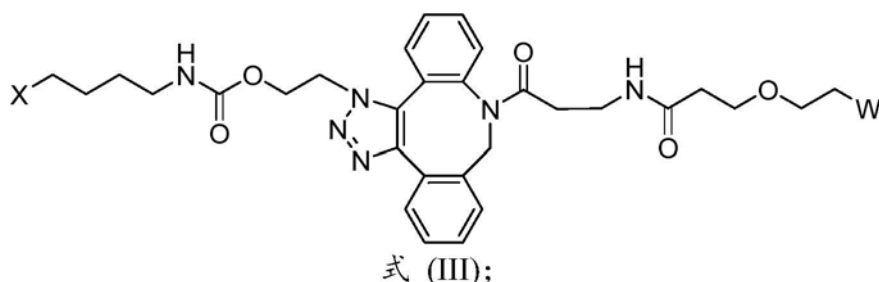
[0504] 实施方案81. 根据实施方案79所述的方法, 其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO: 21的氨基酸序列。

[0505] 实施方案82. 根据实施方案79所述的方法, 其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO: 22的氨基酸序列。

[0506] 实施方案83. 根据实施方案79所述的方法, 其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO: 23的氨基酸序列。

[0507] 实施方案84. 根据实施方案79所述的方法, 其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO: 24的氨基酸序列。

[0508] 实施方案85. 根据实施方案73或73.1所述的方法, 其中[AzK_PEG5kD]具有式(III)的结构:



[0509] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0510] 实施方案86. 根据实施方案85所述的方法, 其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO: 20的氨基酸序列。

[0511] 实施方案87. 根据实施方案85所述的方法, 其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO: 21的氨基酸序列。

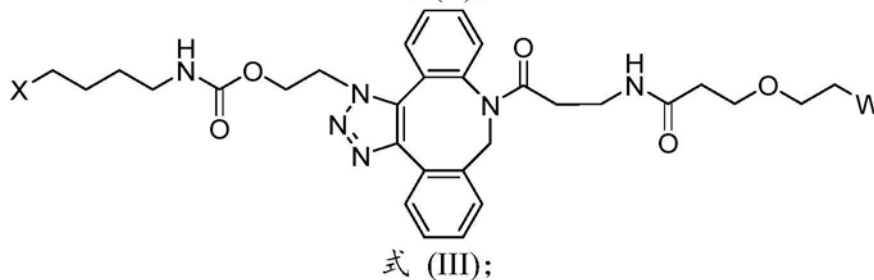
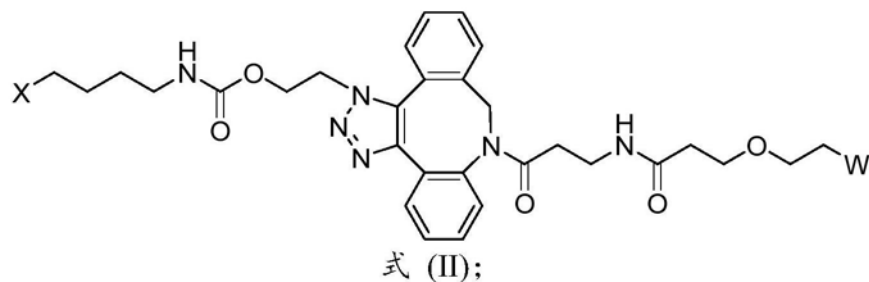
[0512] 实施方案88. 根据实施方案85所述的方法, 其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO: 22的氨基酸序列。

[0513] 实施方案89. 根据实施方案85所述的方法, 其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO: 23的氨基酸序列。

[0514] 实施方案90. 根据实施方案85所述的方法, 其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO: 24的氨基酸序列。

[0515] 实施方案91. 一种治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂, 其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO: 25-29中任一个的氨基酸序列, 其中[AzK_PEG30kD]具有式(II)或式(III)的结

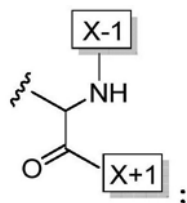
构,或者是式(II)和式(III)的结构的混合物:



其中:

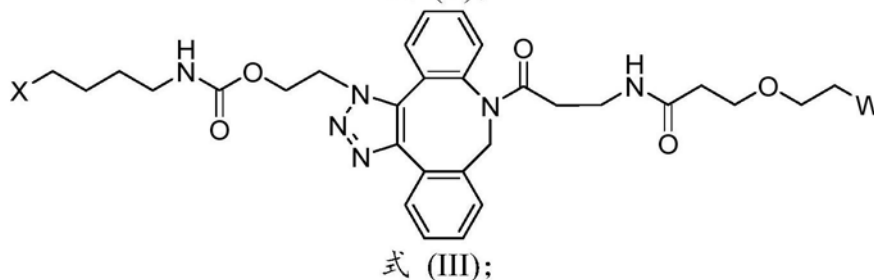
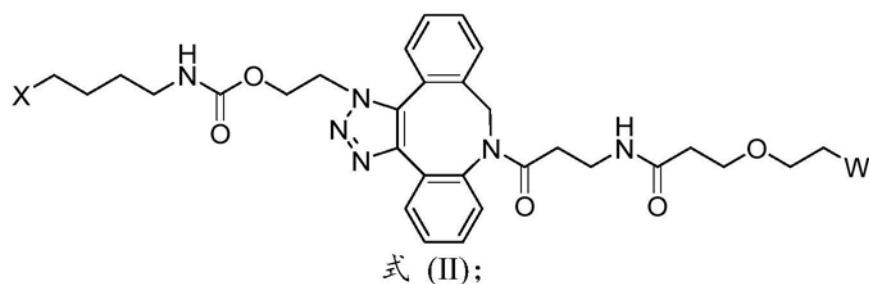
W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



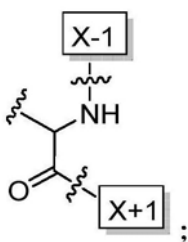
或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0516] 实施方案91.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:25-29中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG30kD]具有式(II)或式(III)的结构,或者是式(II)和式(III)的结构的混合物:



其中:

W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团；并且
X具有以下结构：



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点；并且
X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点；
或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0517] 实施方案92.根据实施方案91或91.1所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列。

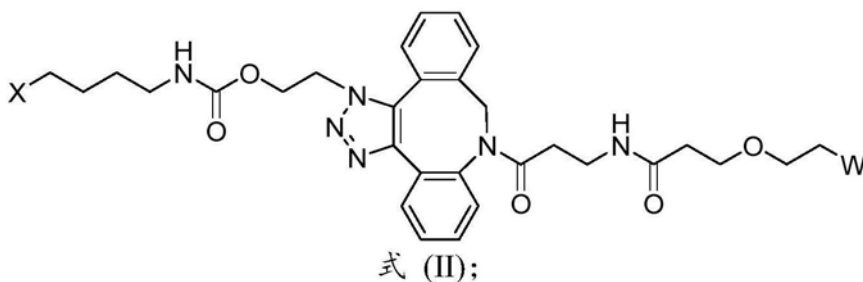
[0518] 实施方案93.根据实施方案91或91.1所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0519] 实施方案94.根据实施方案91或91.1所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0520] 实施方案95.根据实施方案91或91.1所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0521] 实施方案96.根据实施方案91或91.1所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0522] 实施方案97.根据实施方案91或91.1所述的方法，其中[AzK_PEG30kD]具有式(II)的结构：



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0523] 实施方案98.根据实施方案97所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列。

[0524] 实施方案99.根据实施方案97所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

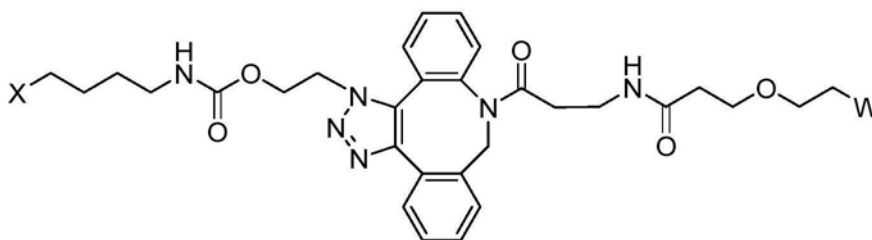
[0525] 实施方案100.根据实施方案97所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0526] 实施方案101.根据实施方案97所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0527] 实施方案102.根据实施方案97所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:

29的氨基酸序列。

[0528] 实施方案103.根据实施方案91或91.1所述的方法,其中[AzK_PEG30kD]具有式(III)的结构:



式 (III);

[0529] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0530] 实施方案104.根据实施方案103所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列。

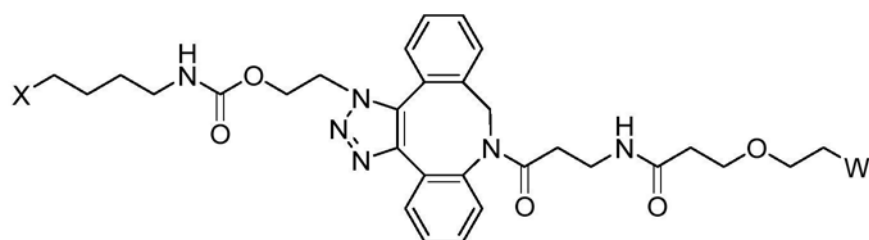
[0531] 实施方案105.根据实施方案103所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0532] 实施方案106.根据实施方案103所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

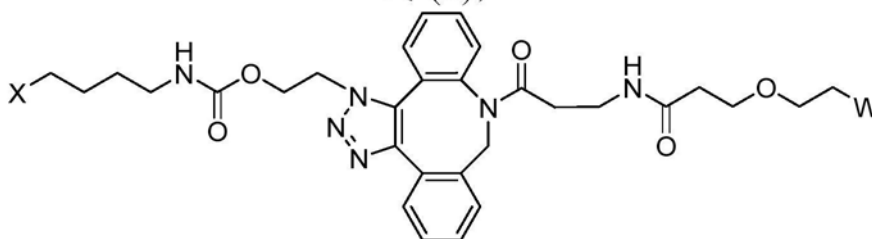
[0533] 实施方案107.根据实施方案103所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0534] 实施方案108.根据实施方案103所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0535] 实施方案109.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:15-19中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]是式(II)和式(III)的结构的混合物:



式 (II);



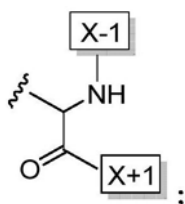
式 (III);

其中:

W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa

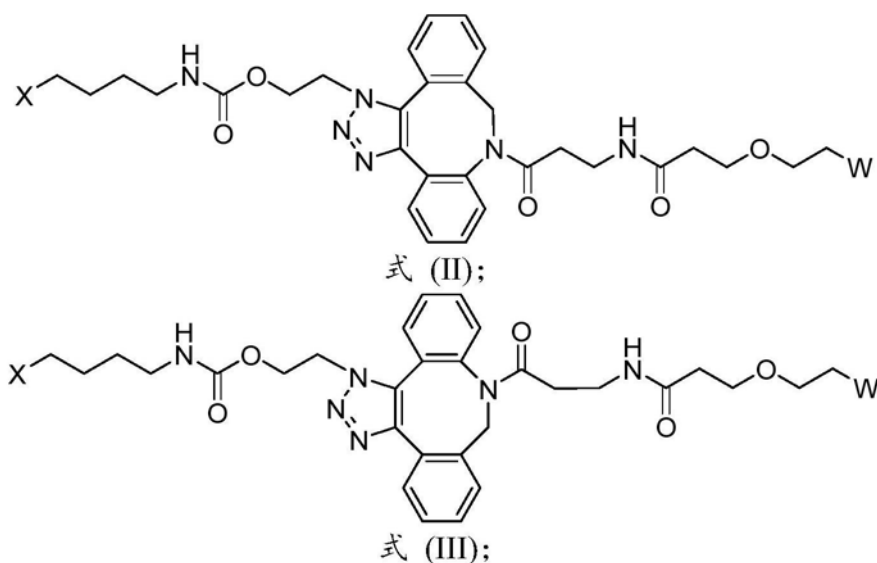
和60kDa的平均分子量的PEG基团；并且

X具有以下结构：



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

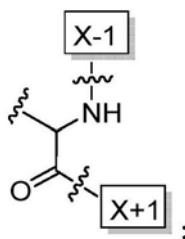
[0536] 实施方案109.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含 SEQ ID NO:15-19中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG]是式 (II) 和式 (III) 的结构的混合物:



其中:

W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团；并且

X具有以下结构：



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点；并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点；

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0537] 实施方案110.根据实施方案109或109.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG]的总量的式 (II) 的结构与式 (III) 的结构的量的比率为约1:1。

[0538] 实施方案111.根据实施方案109或109.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构

成[AzK_PEG]的总量的式(II)的结构的量与式(III)的结构的量的比率大于1:1。

[0539] 实施方案112.根据实施方案109或109.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG]的总量的式(II)的结构的量与式(III)的结构的量的比率小于1:1。

[0540] 实施方案113.根据实施方案109至112中任一项所述的方法,其中W是线性或分支PEG基团。

[0541] 实施方案114.根据实施方案109至112中任一项所述的方法,其中W是线性PEG基团。

[0542] 实施方案115.根据实施方案109至112中任一项所述的方法,其中W是分支PEG基团。

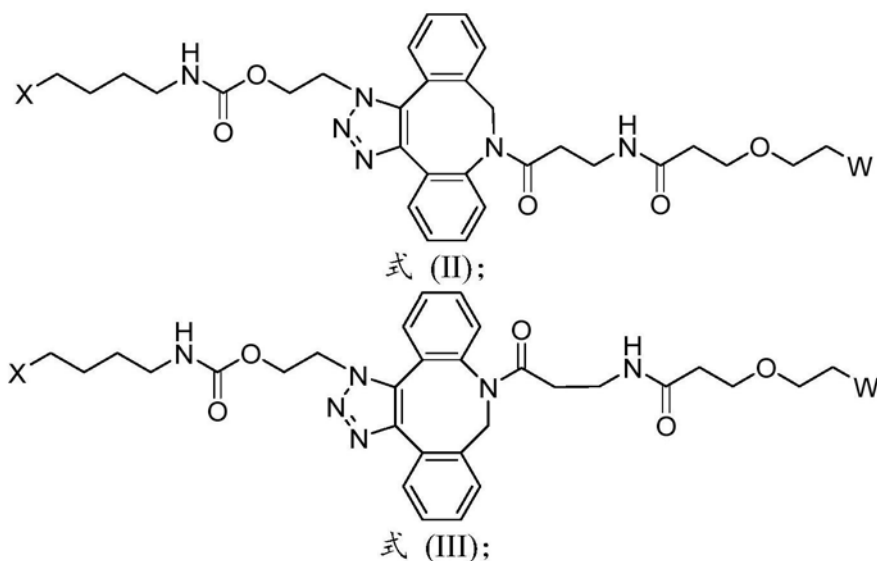
[0543] 实施方案116.根据实施方案109至112中任一项所述的方法,其中W是甲氧基PEG基团。

[0544] 实施方案117.根据实施方案116所述的方法,其中所述甲氧基PEG基团是线性或分支的。

[0545] 实施方案118.根据实施方案117所述的方法,其中所述甲氧基PEG组是线性的。

[0546] 实施方案119.根据实施方案117所述的方法,其中所述甲氧基PEG组是分支的。

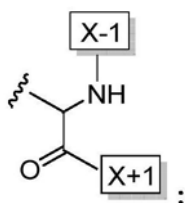
[0547] 实施方案120.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:20至24中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG5kD]是式(II)和式(III)的结构的混合物:



其中:

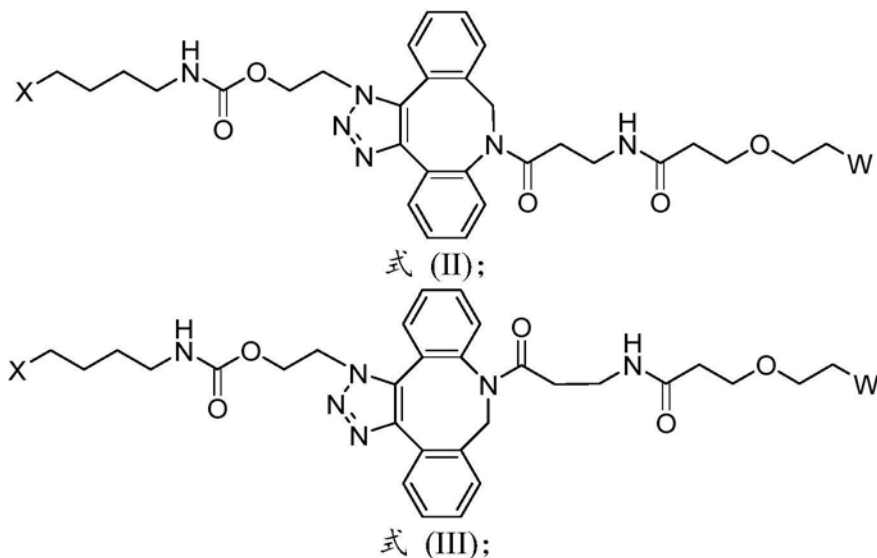
W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

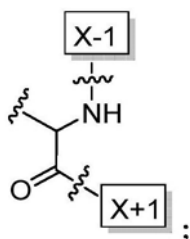
[0548] 实施方案120.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:20至24中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG5kD]是式(II)和式(III)的结构的混合物:



其中:

W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点;

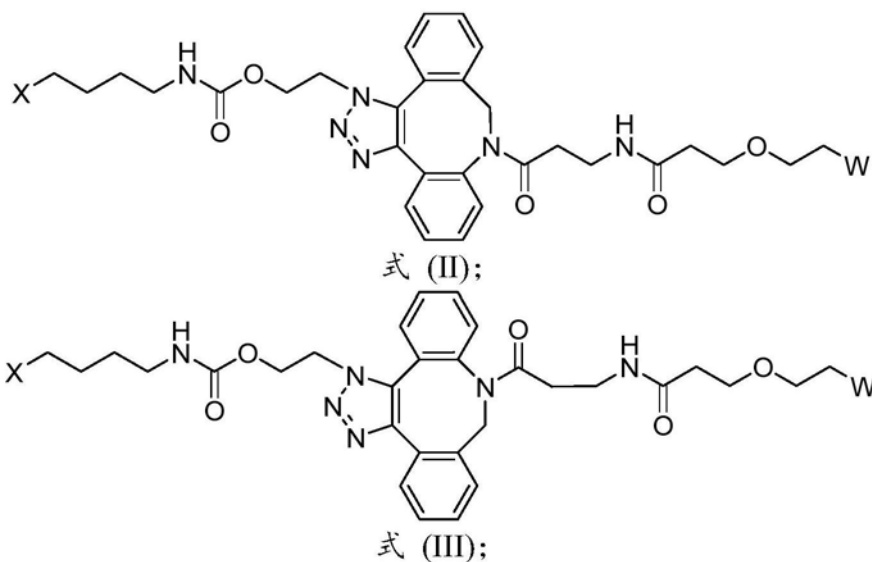
或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0549] 实施方案121.根据实施方案120或120.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG5kD]的总量的式(II)的结构的量与式(III)的结构的量的比率为约1:1。

[0550] 实施方案122.根据实施方案120或120.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG5kD]的总量的式(II)的结构的量与式(III)的结构的量的比率大于1:1。

[0551] 实施方案123.根据实施方案120或120.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG5kD]的总量的式(II)的结构的量与式(III)的结构的量的比率小于1:1。

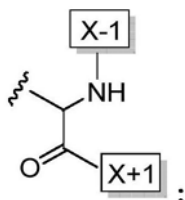
[0552] 实施方案124.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:25-29中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG30kD]是式(II)和式(III)的结构的混合物:



其中:

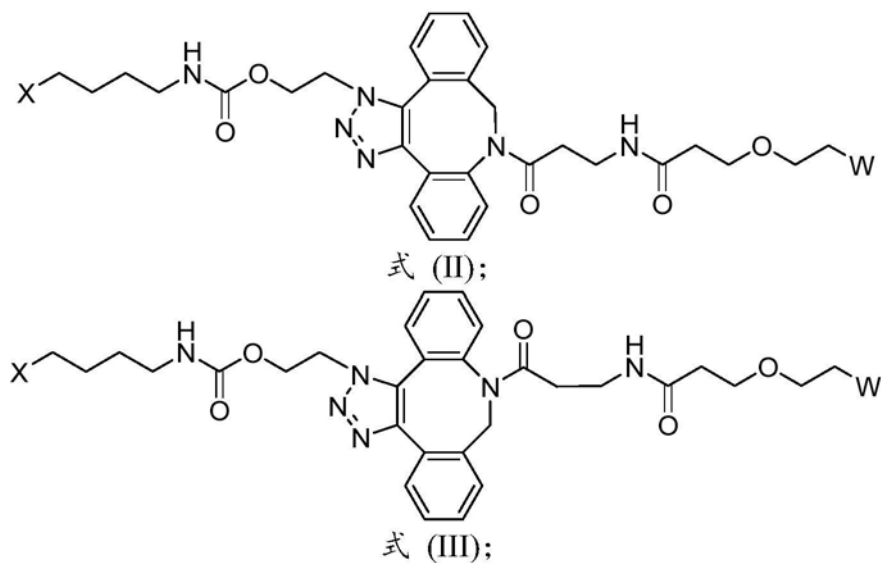
W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

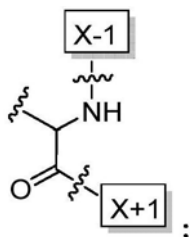
[0553] 实施方案124.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:25-29中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_PEG30kD]是式(II)和式(III)的结构的混合物:



其中:

W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构：



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点；并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点；

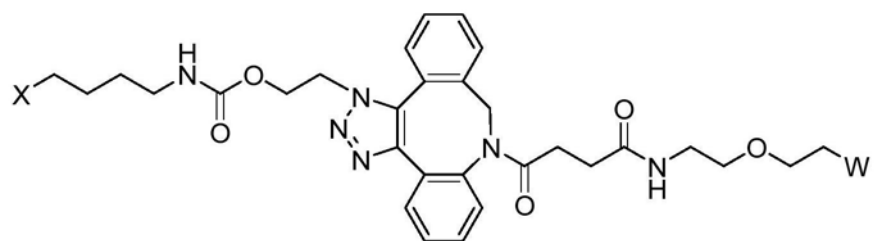
或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0554] 实施方案125.根据实施方案124或124.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG30kD]的总量的式(II)的结构量的与式(III)的结构量的比率为约1:1。

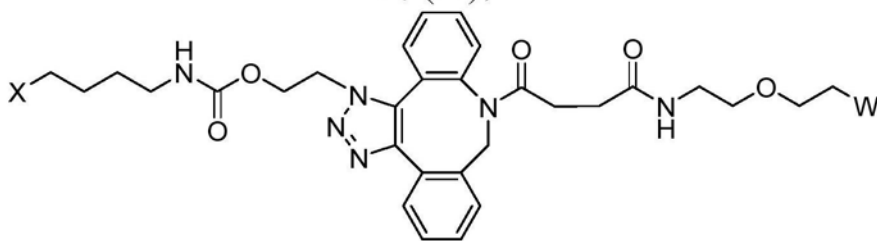
[0555] 实施方案126.根据实施方案124或124.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG30kD]的总量的式(II)的结构量的与式(III)的结构量的比率大于1:1。

[0556] 实施方案127.根据实施方案124或124.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_PEG30kD]的总量的式(II)的结构量的与式(III)的结构量的比率小于1:1。

[0557] 实施方案128.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:40-44中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]具有式(IV)或式(V)或者式(IV)和式(V)的混合物的结构:



式 (IV);

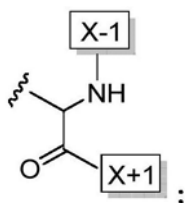


式 (V);

其中:

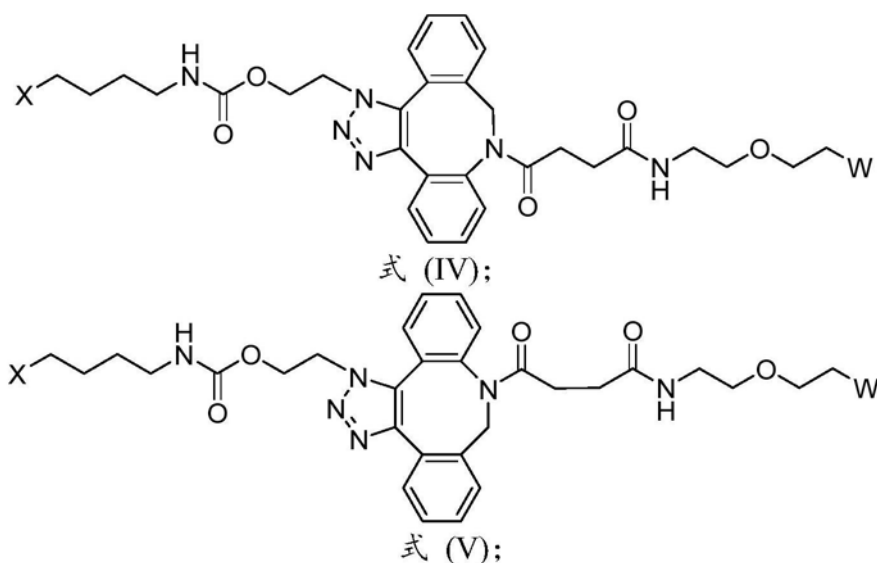
W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

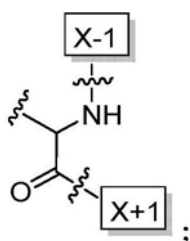
[0558] 实施方案128.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:40-44中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG]具有式(IV)或式(V)或者式(IV)和式(V)的混合物的结构:



其中:

W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



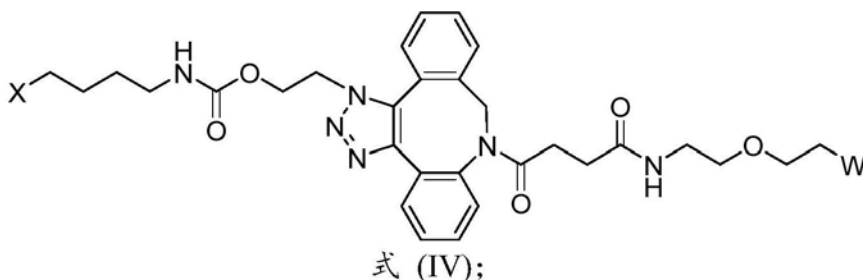
X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点;

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0559] 实施方案129.根据实施方案128或128.1所述的方法,其中[AzK_L1_PEG]是式(IV)和式(V)的混合物。

[0560] 实施方案130.根据实施方案128或128.1所述的方法,其中[AzK_L1_PEG]具有式(IV)的结构:



[0561] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0562] 实施方案131.根据实施方案128或128.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列。

[0563] 实施方案132. 根据实施方案131所述的方法, 其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0564] 实施方案133.根据实施方案132所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0565] 实施方案134.根据实施方案133所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0566] 实施方案135.根据实施方案133所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0567] 实施方案136.根据实施方案128或128.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0568] 实施方案137.根据实施方案136所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0569] 实施方案138.根据实施方案137所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0570] 实施方案139.根据实施方案138所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0571] 实施方案140.根据实施方案138所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0572] 实施方案141.根据实施方案128或128.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列。

[0573] 实施方案142. 根据实施方案141所述的方法, 其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0574] 实施方案143.根据实施方案142所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0575] 实施方案144.根据实施方案143所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0576] 实施方案145.根据实施方案143所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0577] 实施方案146.根据实施方案128或128.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列。

[0578] 实施方案147.根据实施方案146所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0579] 实施方案148.根据实施方案147所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0580] 实施方案149.根据实施方案148所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0581] 实施方案150.根据实施方案148所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0582] 实施方案151.根据实施方案128或128.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列。

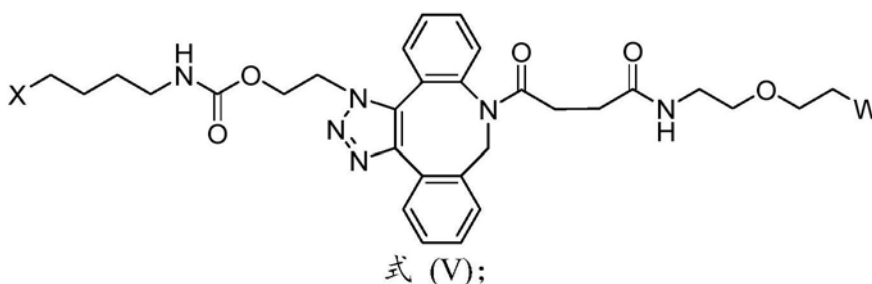
[0583] 实施方案152.根据实施方案151所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0584] 实施方案153.根据实施方案152所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0585] 实施方案154.根据实施方案153所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0586] 实施方案155.根据实施方案153所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0587] 实施方案156.根据实施方案128或128.1所述的方法,其中[AzK_L1_PEG]具有式(V)的结构:



[0588] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0589] 实施方案157.根据实施方案156所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列。

[0590] 实施方案158.根据实施方案156所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0591] 实施方案159.根据实施方案158所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0592] 实施方案160.根据实施方案159所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0593] 实施方案161.根据实施方案159所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0594] 实施方案162.根据实施方案156所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列。

[0595] 实施方案163.根据实施方案162所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0596] 实施方案164.根据实施方案163所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0597] 实施方案165.根据实施方案164所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0598] 实施方案166.根据实施方案164所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0599] 实施方案167.根据实施方案156所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列。

[0600] 实施方案168.根据实施方案167所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0601] 实施方案169.根据实施方案168所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0602] 实施方案170.根据实施方案169所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0603] 实施方案171.根据实施方案169所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0604] 实施方案172.根据实施方案156所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列。

[0605] 实施方案173.根据实施方案172所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0606] 实施方案174.根据实施方案173所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0607] 实施方案175.根据实施方案174所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0608] 实施方案176.根据实施方案174所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0609] 实施方案177.根据实施方案156所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列。

[0610] 实施方案178.根据实施方案177所述的方法,其中W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0611] 实施方案179.根据实施方案178所述的方法,其中W是具有选自5kDa和30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0612] 实施方案180.根据实施方案179所述的方法,其中W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团。

[0613] 实施方案181.根据实施方案179所述的方法,其中W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团。

[0614] 实施方案182.根据实施方案128至181中任一项所述的方法,其中W是线性或分支

PEG基团。

[0615] 实施方案183.根据实施方案128至181中任一项所述的方法,其中W是线性PEG基团。

[0616] 实施方案184.根据实施方案128至181中任一项所述的方法,其中W是分支PEG基团。

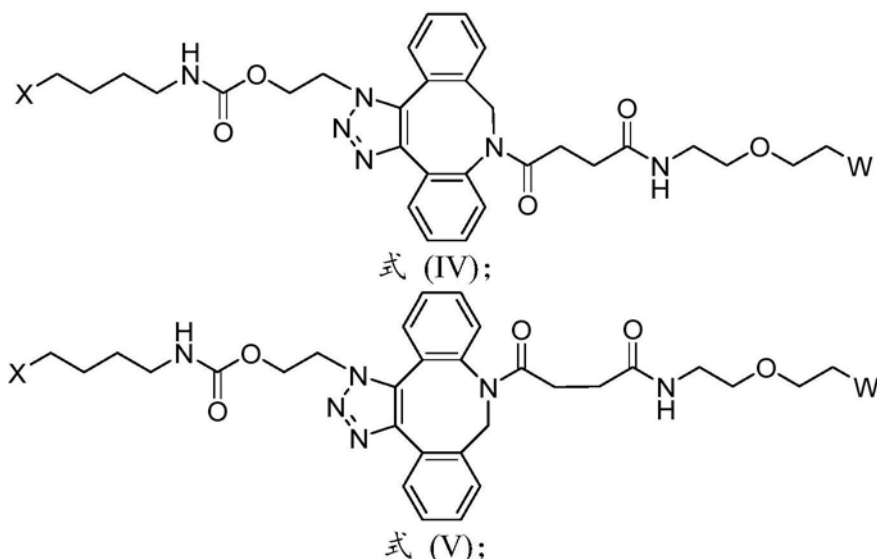
[0617] 实施方案185.根据实施方案128至181中任一项所述的方法,其中W是甲氧基PEG基团。

[0618] 实施方案186.根据实施方案185所述的方法,其中所述甲氧基PEG基团是线性或分支的。

[0619] 实施方案187.根据实施方案186所述的方法,其中所述甲氧基PEG组是线性的。

[0620] 实施方案188.根据实施方案186所述的方法,其中所述甲氧基PEG组是分支的。

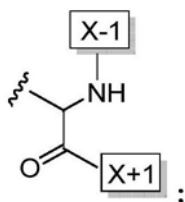
[0621] 实施方案189.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含 SEQ ID NO:45-49中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG5kD]具有式 (IV) 或式 (V) 或者式 (IV) 和式 (V) 的混合物的结构:



其中:

W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团;并且

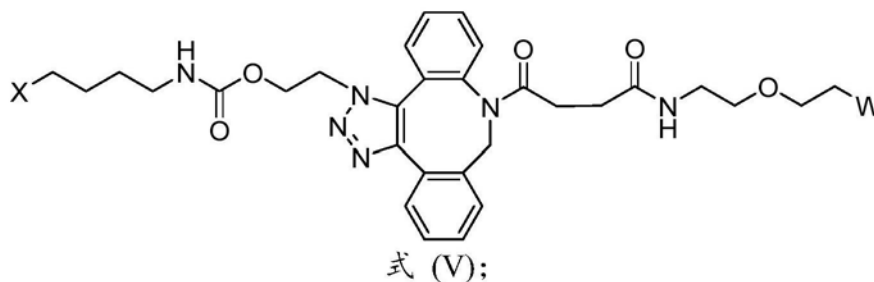
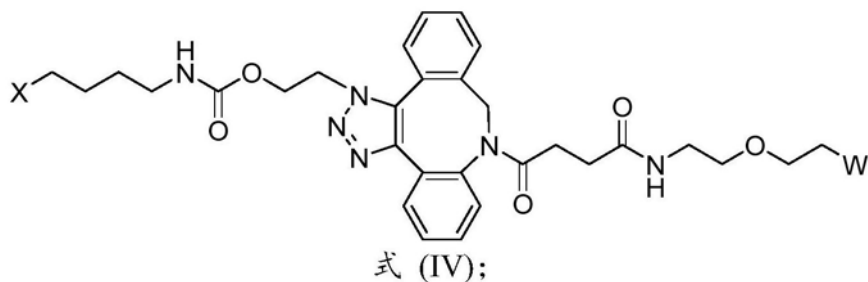
X具有以下结构:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0622] 实施方案189.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含 SEQ ID NO:45-49中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG5kD]具有式 (IV) 或式 (V) 或者

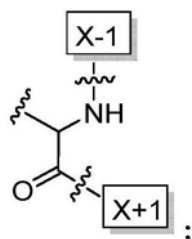
式 (IV) 和式 (V) 的混合物的结构:



其中:

W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点;

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0623] 实施方案190.根据实施方案189或189.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列。

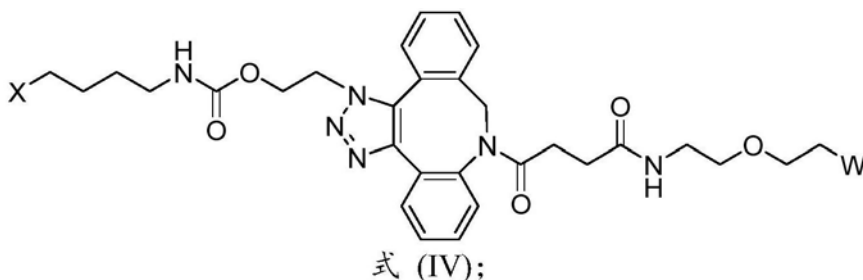
[0624] 实施方案191.根据实施方案189或189.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

[0625] 实施方案192.根据实施方案189或189.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列。

[0626] 实施方案193.根据实施方案189或189.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列。

[0627] 实施方案194.根据实施方案189或189.1所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列。

[0628] 实施方案195.根据实施方案189或189.1所述的方法,其中[AzK_L1_PEG5kD]具有式 (IV) 的结构:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0629] 实施方案196.根据实施方案195所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列。

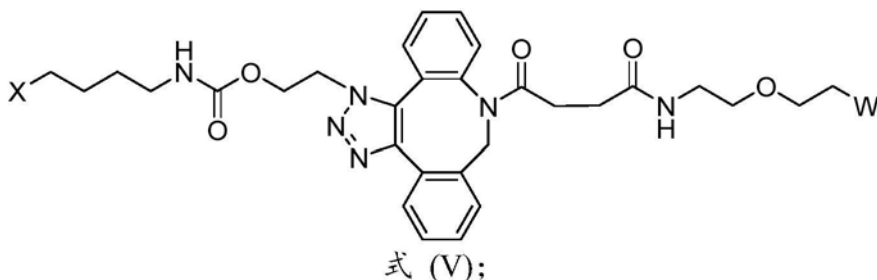
[0630] 实施方案197.根据实施方案195所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

[0631] 实施方案198.根据实施方案195所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列。

[0632] 实施方案199.根据实施方案195所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列。

[0633] 实施方案200.根据实施方案195所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列。

[0634] 实施方案201.根据实施方案189或189.1所述的方法,其中[AzK_L1_PEG5kD]具有式(V)的结构:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0635] 实施方案202.根据实施方案201所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:45的氨基酸序列。

[0636] 实施方案203.根据实施方案201所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

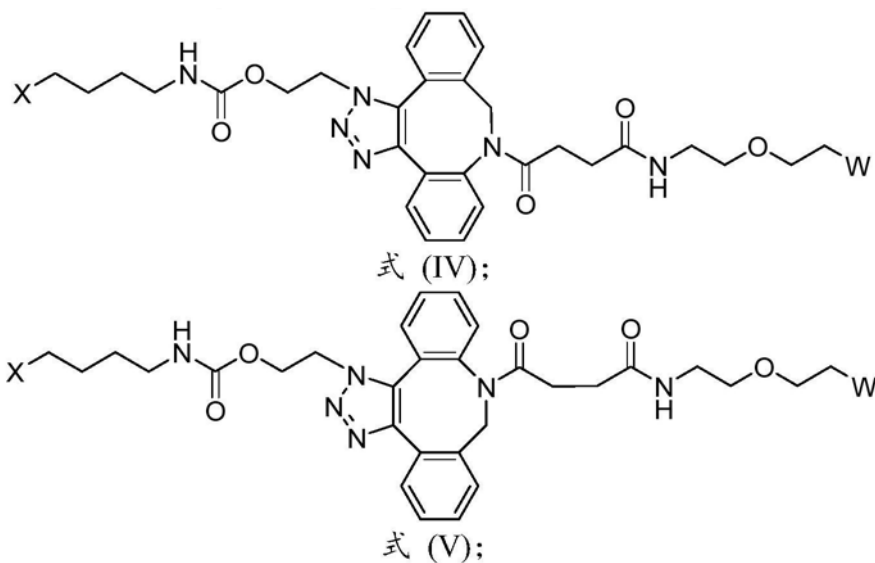
[0637] 实施方案204.根据实施方案201所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列。

[0638] 实施方案205.根据实施方案201所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列。

[0639] 实施方案206.根据实施方案201所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列。

[0640] 实施方案207.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:50-54中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG30kD]具有式(IV)或式(V)的结

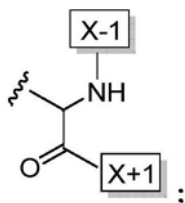
构,或者是式(IV)和式(V)的结构的混合物:



其中：

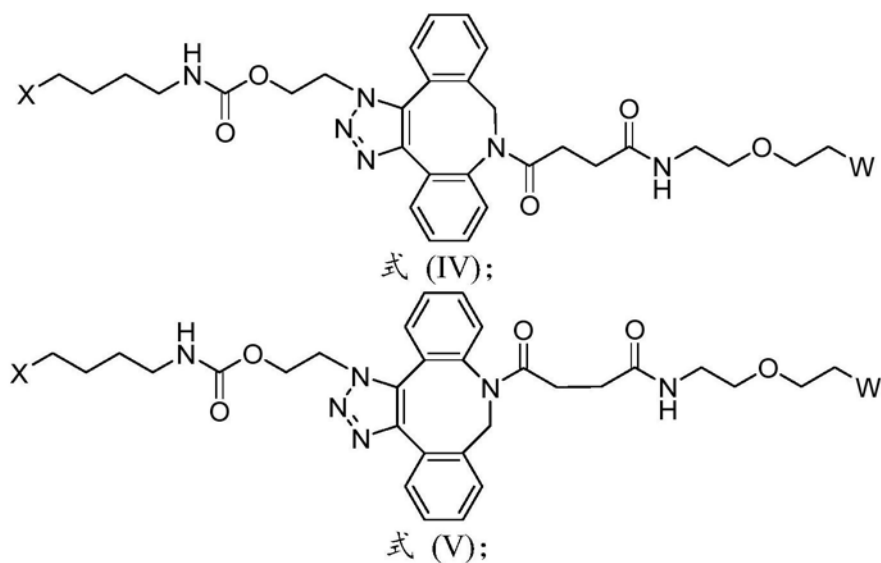
W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



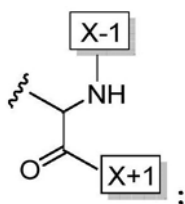
或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0641] 实施方案207.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含 SEQ ID NO:50-54中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG30kD]具有式(IV)或式(V)的结构,或者是式(IV)和式(V)的结构的混合物:



其中：

W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团；并且
X具有以下结构：



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0642] 实施方案208.根据实施方案207或207.1所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

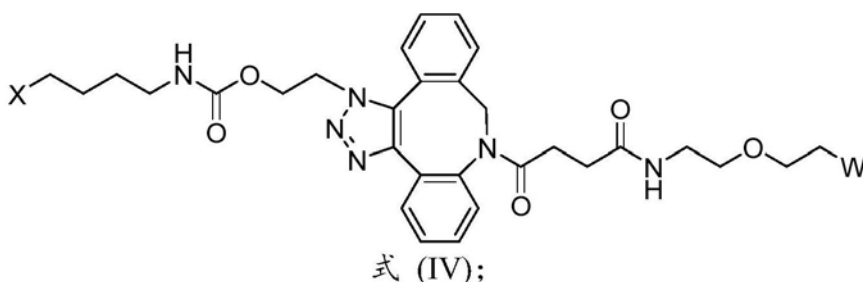
[0643] 实施方案209.根据实施方案207或207.1所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

[0644] 实施方案210.根据实施方案207或207.1所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列。

[0645] 实施方案211.根据实施方案207或207.1所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列。

[0646] 实施方案212.根据实施方案207或207.1所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列。

[0647] 实施方案213.根据实施方案207或207.1所述的方法，其中[AzK_L1_PEG30kD]具有式(IV)的结构：



[0648] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0649] 实施方案214.根据实施方案213所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

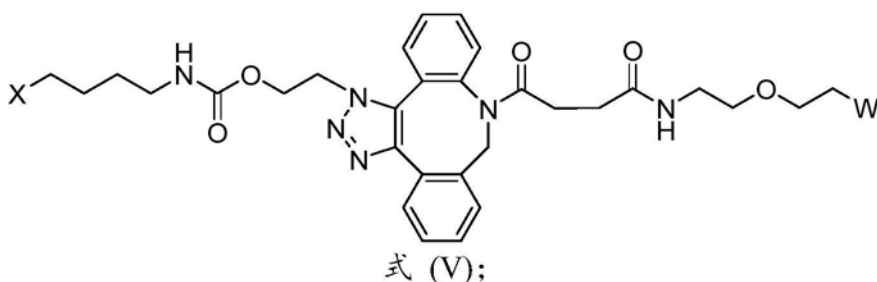
[0650] 实施方案215.根据实施方案213所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

[0651] 实施方案216.根据实施方案213所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列。

[0652] 实施方案217.根据实施方案213所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列。

[0653] 实施方案218.根据实施方案213所述的方法，其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列。

[0654] 实施方案219.根据实施方案207或207.1所述的方法，其中[AzK_L1_PEG30kD]具有式(V)的结构：



[0655] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0656] 实施方案220.根据实施方案219所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列。

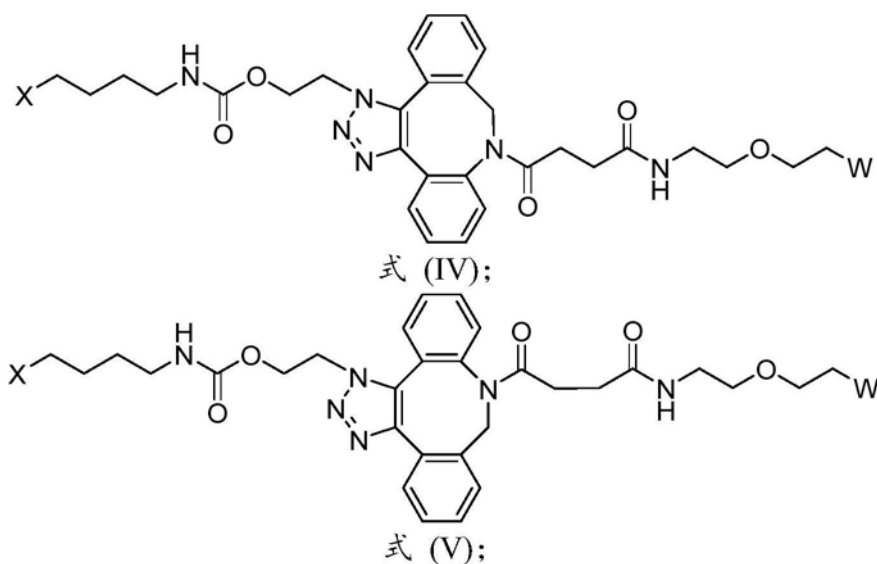
[0657] 实施方案221.根据实施方案219所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列。

[0658] 实施方案222.根据实施方案219所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列。

[0659] 实施方案223.根据实施方案219所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列。

[0660] 实施方案224.根据实施方案219所述的方法,其中所述IL-2缀合物具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列。

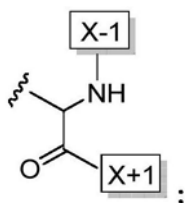
[0661] 实施方案225.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:40-44中任一个的氨基酸序列,其中[Azk_L1_PEG]是式 (IV) 和式 (V) 的结构的混合物:



其中:

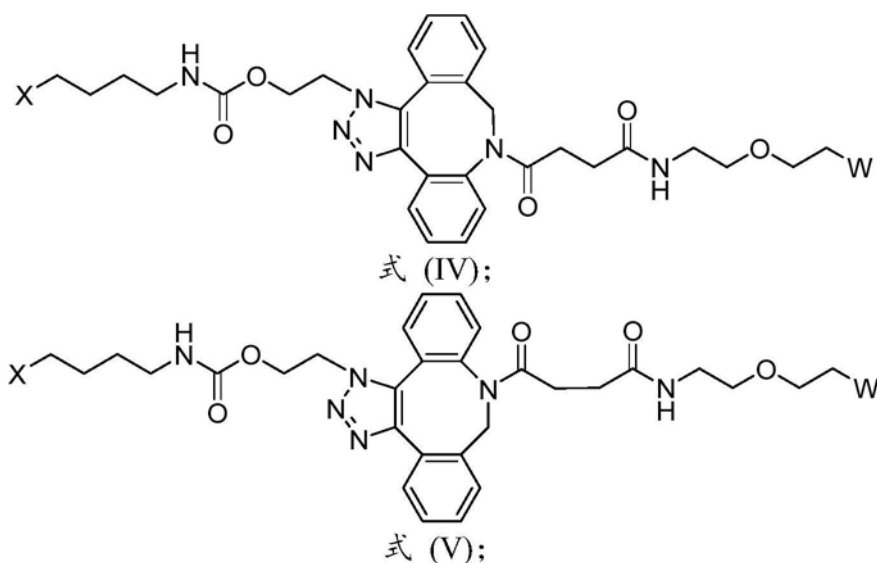
W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

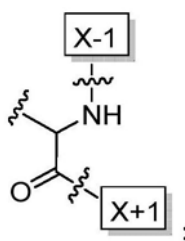
[0662] 实施方案225.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:40-44中任一个的氨基酸序列,其中[Azk_L1_PEG]是式(IV)和式(V)的结构的混合物:



其中:

W是具有选自5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点;

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0663] 实施方案226.根据实施方案225或225.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构成[Azk_L1_PEG]的总量的式(IV)的结构的量与式(V)的结构的量的比率为约1:1。

[0664] 实施方案227.根据实施方案225或225.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构成[Azk_L1_PEG]的总量的式(IV)的结构的量与式(V)的结构的量的比率大于1:1。

[0665] 实施方案228.根据实施方案225或225.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构

成[AzK_L1_PEG]的总量的式(IV)的结构的量与式(V)的结构的量的比率小于1:1。

[0666] 实施方案229.根据实施方案225至228中任一项所述的方法,其中W是线性或分支PEG基团。

[0667] 实施方案230.根据实施方案225至228中任一项所述的方法,其中W是线性PEG基团。

[0668] 实施方案231.根据实施方案225至228中任一项所述的方法,其中W是分支PEG基团。

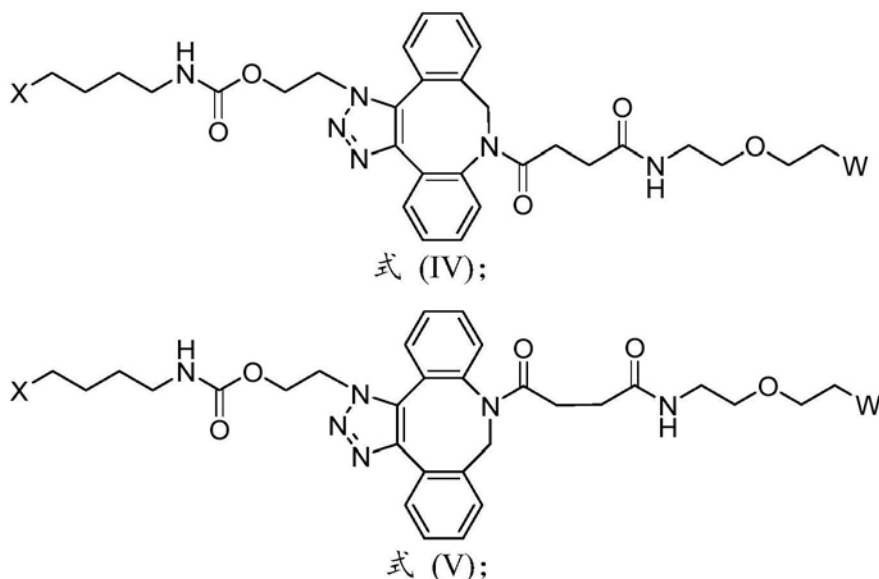
[0669] 实施方案232.根据实施方案225至228中任一项所述的方法,其中W是甲氧基PEG基团。

[0670] 实施方案233.根据实施方案232所述的方法,其中所述甲氧基PEG基团是线性或分支的。

[0671] 实施方案234.根据实施方案233所述的方法,其中所述甲氧基PEG组是线性的。

[0672] 实施方案235.根据实施方案233所述的方法,其中所述甲氧基PEG组是分支的。

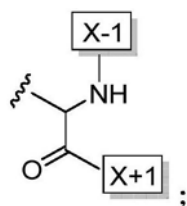
[0673] 实施方案236.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:45至49中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1_PEG5kD]是式(IV)和式(V)的结构的混合物:



其中:

W是具有5kDa的平均分子量的PEG基团;并且

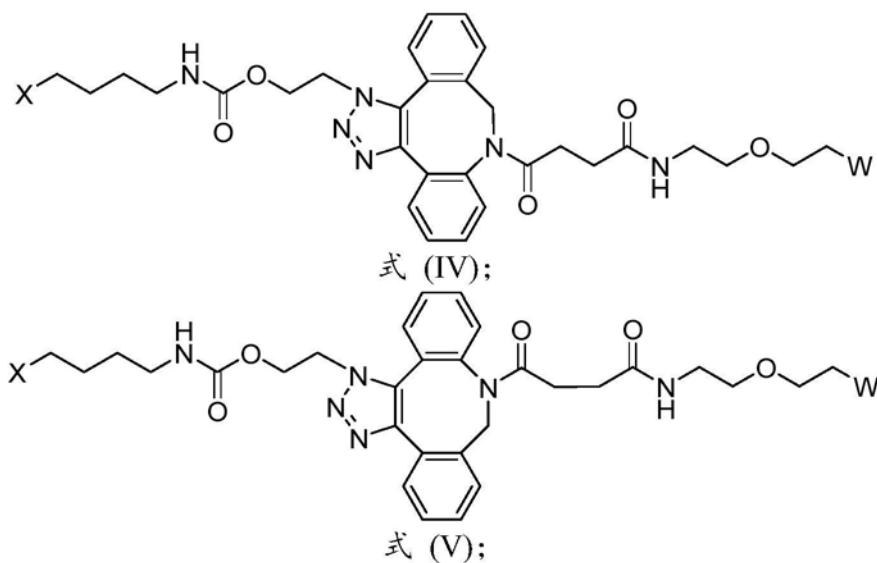
X具有以下结构:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0674] 实施方案236.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者

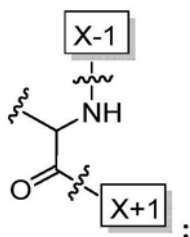
施用治疗有效量的 (a) IL-2 缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂, 其中所述 IL-2 缀合物包含 SEQ ID NO:45 至 49 中任一个的氨基酸序列, 其中 [AzK_L1_PEG5kD] 是式 (IV) 和式 (V) 的结构的混合物:



其中:

W 是具有 5kDa 的平均分子量的 PEG 基团; 并且

X 具有以下结构:



X-1 指示与前一个氨基酸残基的附接点; 并且

X+1 指示与下一个氨基酸残基的附接点;

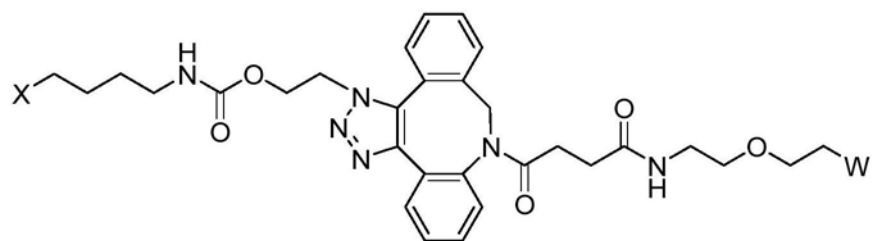
或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0675] 实施方案 237. 根据实施方案 236 或 236.1 所述的方法, 其中在所述 IL-2 缀合物中构成 [AzK_L1_PEG5kD] 的总量的式 (IV) 的结构的量与式 (V) 的结构的量的比率为约 1:1。

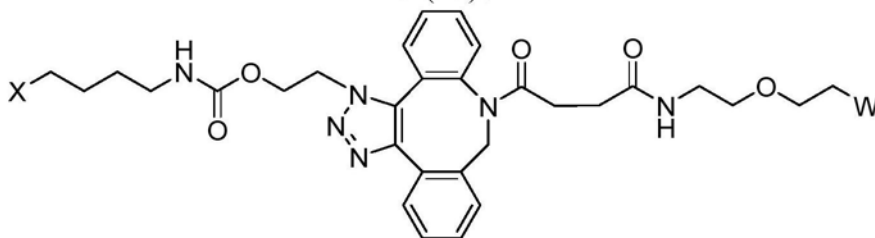
[0676] 实施方案 238. 根据实施方案 236 或 236.1 所述的方法, 其中在所述 IL-2 缀合物中构成 [AzK_L1_PEG5kD] 的总量的式 (IV) 的结构的量与式 (V) 的结构的量的比率大于 1:1。

[0677] 实施方案 239. 根据实施方案 236 或 236.1 所述的方法, 其中在所述 IL-2 缀合物中构成 [AzK_L1_PEG5kD] 的总量的式 (IV) 的结构的量与式 (V) 的结构的量的比率小于 1:1。

[0678] 实施方案 240. 一种治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2 缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂, 其中所述 IL-2 缀合物包含 SEQ ID NO:50-54 中任一个的氨基酸序列, 其中 [AzK_L1_PEG30kD] 是式 (IV) 和式 (V) 的结构的混合物:



式 (IV);

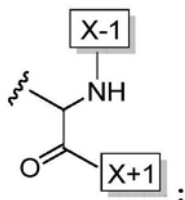


式 (V);

其中:

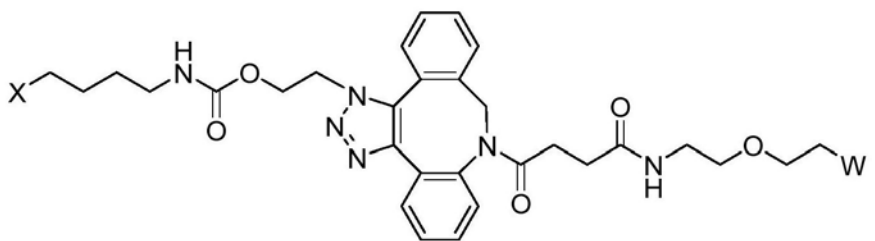
W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构:

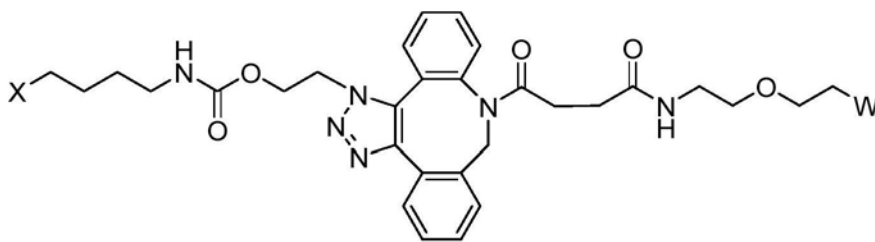


或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0679] 实施方案240.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:50-54中任一个的氨基酸序列,其中[AzK_L1 PEG30kD]是式(IV)和式(V)的结构的混合物:



式 (IV);

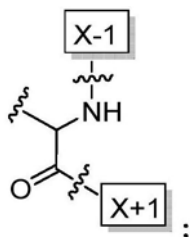


式 (V);

其中:

W是具有30kDa的平均分子量的PEG基团;并且

X具有以下结构：



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点；并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点；

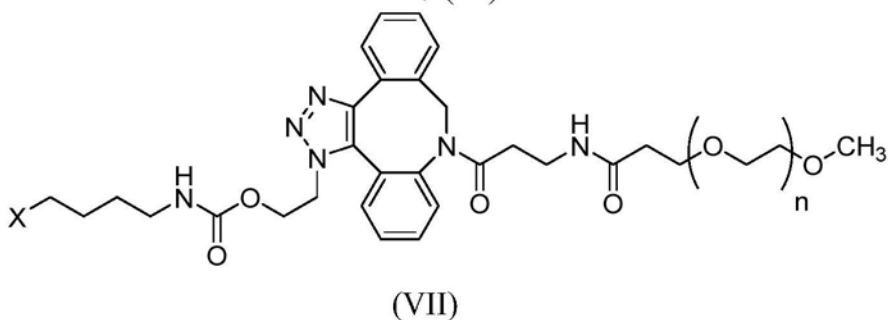
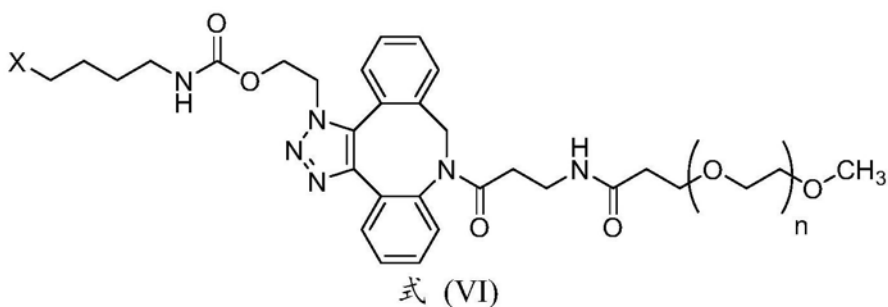
或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0680] 实施方案241.根据实施方案240或240.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_L1_PEG30kD]的总量的式(IV)的结构与式(V)的结构量的比率为约1:1。

[0681] 实施方案242.根据实施方案240或240.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_L1_PEG30kD]的总量的式(IV)的结构与式(V)的结构量的比率大于1:1。

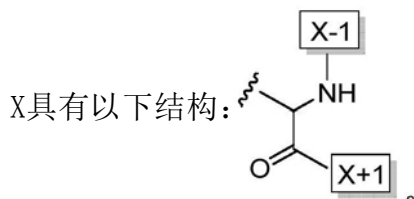
[0682] 实施方案243.根据实施方案240或240.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中构成[AzK_L1_PEG30kD]的总量的式(IV)的结构与式(V)的结构量的比率小于1:1。

[0683] 实施方案244.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VI)或(VII)或者(VI)和(VII)的混合物的结构或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物替代：

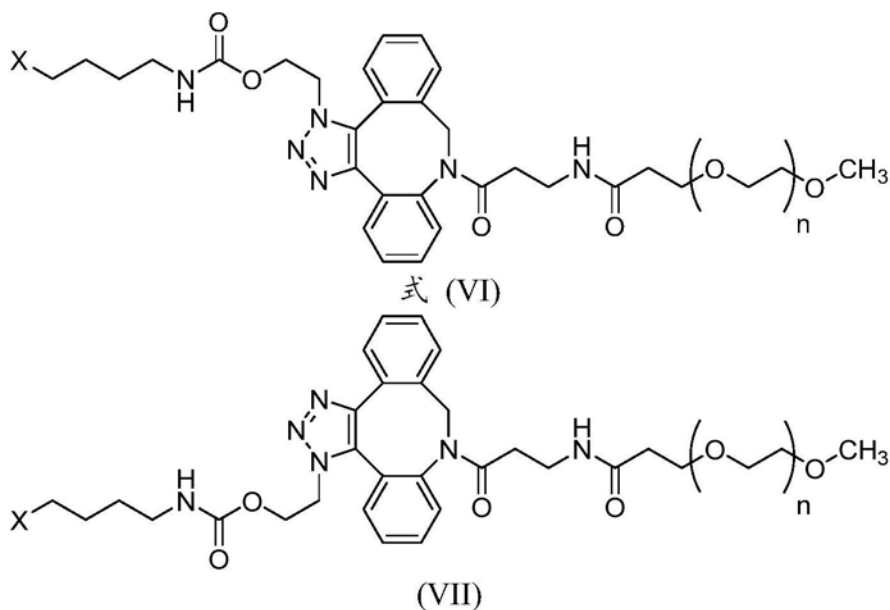


其中：

n是在从约2至约5000范围内的整数；并且



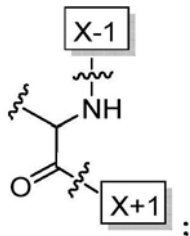
[0684] 实施方案244.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(VI)或(VII)或者(VI)和(VII)的混合物的结构或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物替代:



其中:

n是在从约2至约5000范围内的整数;并且

X具有以下结构:



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

[0685] 实施方案245.根据实施方案244或244.1所述的方法,其中所述式(VI)和(VII)的化合物中的n在从约5至约4600、或从约10至约4000、或从约20至约3000、或从约100至约3000、或从约100至约2900、或从约150至约2900、或从约125至约2900、或从约100至约2500、或从约100至约2000、或从约100至约1900、或从约100至约1850、或从约100至约1750、或从约100至约1650、或从约100至约1500、或从约100至约1400、或从约100至约1300、或从约100至约1250、或从约100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约

2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的范围内。

[0686] 实施方案246. 根据实施方案244或244.1所述的方法, 其中所述式(VI)和(VII)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。

[0687] 实施方案247. 根据实施方案244至246中任一项所述的方法, 其中所述式(VI)、式(VII)或者式(VI)和(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71。

[0688] 实施方案248. 根据实施方案247所述的方法, 其中所述式(VI)、式(VII)或者式(VI)和(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是K34。

[0689] 实施方案249. 根据实施方案247所述的方法, 其中所述式(VI)、式(VII)或者式(VI)和(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是F41。

[0690] 实施方案250. 根据实施方案247所述的方法, 其中所述式(VI)、式(VII)或者式(VI)和(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是F43。

[0691] 实施方案251. 根据实施方案247所述的方法, 其中所述式(VI)、式(VII)或者式(VI)和(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是K42。

[0692] 实施方案252. 根据实施方案247所述的方法, 其中所述式(VI)、式(VII)或者式(VI)和(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是E61。

[0693] 实施方案253. 根据实施方案247所述的方法, 其中所述式(VI)、式(VII)或者式(VI)和(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是P64。

[0694] 实施方案254. 根据实施方案247所述的方法, 其中所述式(VI)、式(VII)或者式(VI)和(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是R37。

[0695] 实施方案255. 根据实施方案247所述的方法, 其中所述式(VI)、式(VII)或者式(VI)和(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是T40。

[0696] 实施方案256. 根据实施方案247所述的方法, 其中所述式(VI)、式(VII)或者式(VI)和(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是E67。

[0697] 实施方案257. 根据实施方案247所述的方法, 其中所述式(VI)、式(VII)或者式(VI)和(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是Y44。

[0698] 实施方案258. 根据实施方案247所述的方法, 其中所述式(VI)、式(VII)或者式(VI)和(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是V68。

[0699] 实施方案259. 根据实施方案247所述的方法, 其中所述式(VI)、式(VII)或者式(VI)和(VII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是L71。

[0700] 实施方案260. 根据实施方案244至259中任一项所述的方法, 其中构成所述IL-2缀

合物的总量的式 (VI) 的结构量与式 (VII) 的结构量的比率大于1:1。

[0701] 实施方案261.根据实施方案244至259中任一项所述的方法,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式 (VI) 的结构量与式 (VII) 的结构量的比率小于1:1。

[0702] 实施方案262.根据实施方案244或244.1所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。

[0703] 实施方案263.根据实施方案244或244.1所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137和1249的整数。

[0704] 实施方案264.根据实施方案244或244.1所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。

[0705] 实施方案265.根据实施方案264所述的方法,其中所述式 (VI) 和 (VII) 的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0706] 实施方案266.根据实施方案244或244.1所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。

[0707] 实施方案267.根据实施方案266所述的方法,其中所述式 (VI) 和 (VII) 的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0708] 实施方案268.根据实施方案266所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是从约500至约1000的整数。

[0709] 实施方案269.根据实施方案266所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是从约550至约800的整数。

[0710] 实施方案270.根据实施方案267所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是681。

[0711] 实施方案271.根据实施方案244或244.1所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。

[0712] 实施方案272.根据实施方案271所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中所述式 (VI) 和 (VII) 的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0713] 实施方案273.根据实施方案271所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约500至约1000的整数。

[0714] 实施方案274.根据实施方案273所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约550至约800的整数。

[0715] 实施方案275.根据实施方案271所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是681。

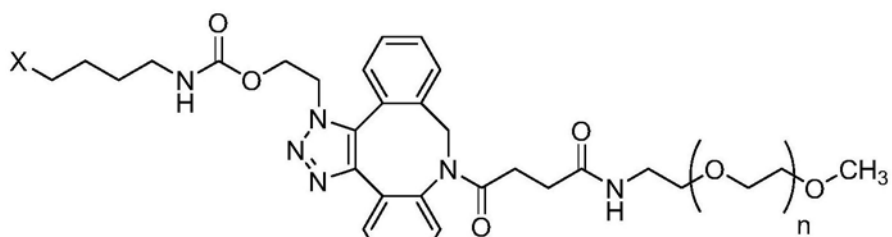
[0716] 实施方案276.根据实施方案244或244.1所述的方法,其中n是使得PEG部分的分子量在从约1,000道尔顿至约200,000道尔顿、或从约2,000道尔顿至约150,000道尔顿、或从

约3,000道尔顿至约125,000道尔顿、或从约4,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约90,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约80,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约65,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约30,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约30,000道尔顿范围内的整数。

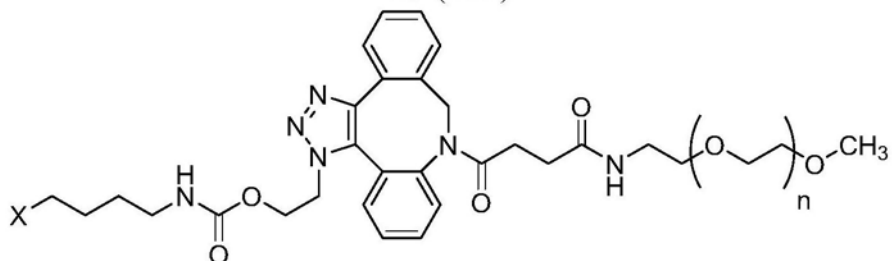
[0717] 实施方案277. 根据实施方案244或244.1所述的方法, 其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约60,000道尔顿、约70,000道尔顿、约80,000道尔顿、约90,000道尔顿、约100,000道尔顿、约125,000道尔顿、约150,000道尔顿、约175,000道尔顿或约200,000道尔顿的整数。

[0718] 实施方案278. 根据实施方案244或244.1所述的方法, 其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿或约50,000道尔顿的整数。

[0719] 实施方案279. 一种治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂, 其中所述IL-2缀合物包含 SEQ ID NO:3的氨基酸序列, 其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式 (VIII) 或 (IX) 或者 (VIII) 和 (IX) 的混合物的结构或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物替代:



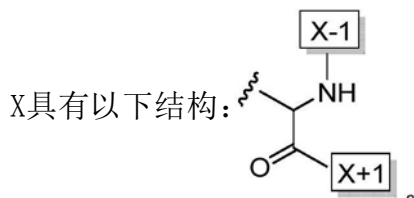
式 (VIII)



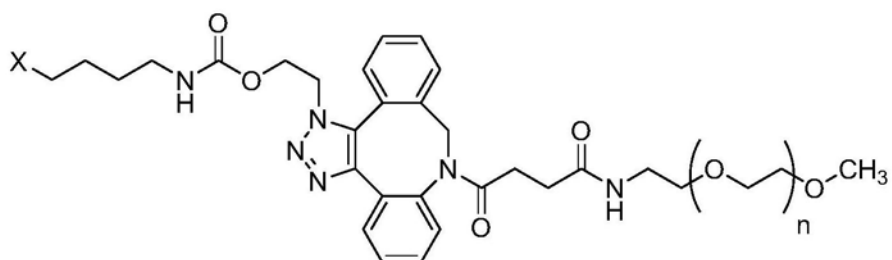
(IX)

其中:

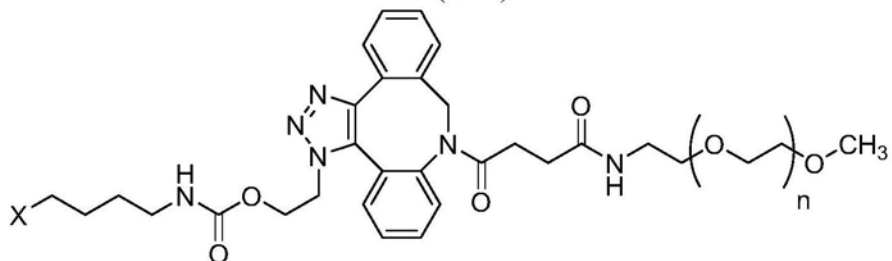
n是在从约2至约5000范围内的整数;并且



[0720] 实施方案279.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含 SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式 (VIII) 或 (IX) 或者 (VIII) 和 (IX) 的混合物的结构或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物替代:



式 (VIII)

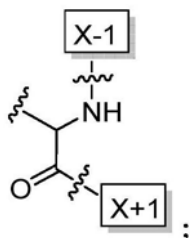


(IX)

其中:

n是在从约2至约5000范围内的整数;并且

X具有以下结构：



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点；并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

[0721] 实施方案280.根据实施方案279或279.1所述的方法，其中所述式(VIII)和(IX)的化合物中的n在从约5至约4600、或从约10至约4000、或从约20至约3000、或从约100至约3000、或从约100至约2900、或从约150至约2900、或从约125至约2900、或从约100至约2500、或从约100至约2000、或从约100至约1900、或从约100至约1850、或从约100至约1750、或从约100至约1650、或从约100至约1500、或从约100至约1400、或从约100至约1300、或从约100至约1250、或从约100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的范围内。

[0722] 实施方案281.根据实施方案279或279.1所述的方法，其中所述式(VIII)和(IX)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。

[0723] 实施方案282.根据实施方案279至281中任一项所述的方法，其中所述式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71。

[0724] 实施方案283.根据实施方案282所述的方法，其中所述式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是K34。

[0725] 实施方案284.根据实施方案282所述的方法，其中所述式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是F41。

[0726] 实施方案285.根据实施方案282所述的方法，其中所述式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是F43。

- [0727] 实施方案286.根据实施方案282所述的方法,其中所述式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是K42。
- [0728] 实施方案287.根据实施方案282所述的方法,其中所述式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是E61。
- [0729] 实施方案288.根据实施方案282所述的方法,其中所述式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是P64。
- [0730] 实施方案289.根据实施方案282所述的方法,其中所述式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是R37。
- [0731] 实施方案290.根据实施方案282所述的方法,其中所述式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是T40。
- [0732] 实施方案291.根据实施方案282所述的方法,其中所述式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是E67。
- [0733] 实施方案292.根据实施方案282所述的方法,其中所述式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是Y44。
- [0734] 实施方案293.根据实施方案282所述的方法,其中所述式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是V68。
- [0735] 实施方案294.根据实施方案282所述的方法,其中所述式(VIII)、式(IX)或者式(VIII)和(IX)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是L71。
- [0736] 实施方案295.根据实施方案279至294中任一项所述的方法,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(VIII)的结构的量与式(IX)的结构的量的比率大于1:1。
- [0737] 实施方案296.根据实施方案279至294中任一项所述的方法,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(VIII)的结构的量与式(IX)的结构的量的比率小于1:1。
- [0738] 实施方案297.根据实施方案279或279.1所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。
- [0739] 实施方案298.根据实施方案279或279.1所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137和1249的整数。
- [0740] 实施方案299.根据实施方案279或279.1所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。
- [0741] 实施方案300.根据实施方案299所述的方法,其中所述式(VIII)和(IX)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。
- [0742] 实施方案301.根据实施方案279或279.1所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。
- [0743] 实施方案302.根据实施方案300所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中所述式(VIII)和(IX)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0744] 实施方案303.根据实施方案279或279.1所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是从约500至约1000的整数。

[0745] 实施方案304.根据实施方案303所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是从约550至约800的整数。

[0746] 实施方案305.根据实施方案302所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是681。

[0747] 实施方案306.根据实施方案279或279.1所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。

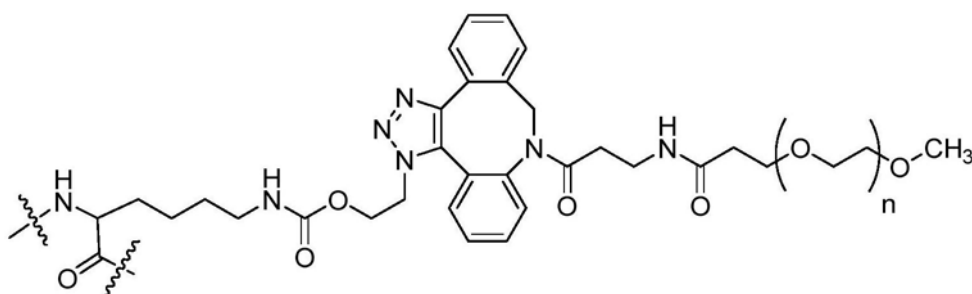
[0748] 实施方案307.根据实施方案279或279.1所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中所述式(VIII)和(IX)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0749] 实施方案308.根据实施方案279或279.1所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约500至约1000的整数。

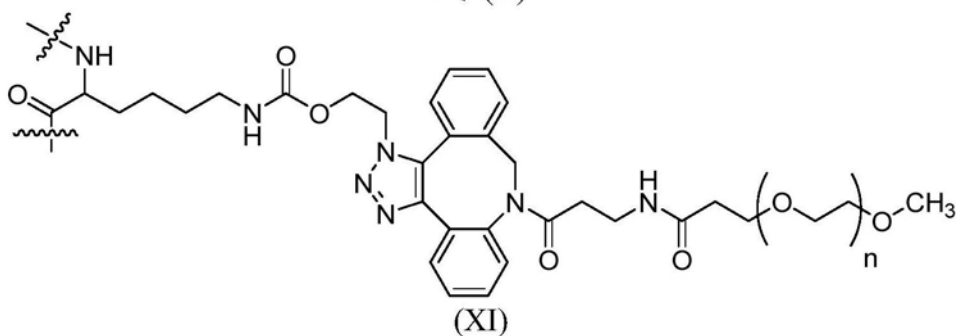
[0750] 实施方案309.根据实施方案279或279.1所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约550至约800的整数。

[0751] 实施方案310.根据实施方案307所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是681。

[0752] 实施方案311.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(X)或(XI)或者(X)和(XI)的混合物的结构替代:



式 (X)



其中:

n是在从约2至约5000范围内的整数;并且

波浪线指示与SEQ ID NO:3内未被替代的氨基酸残基的共价键。

[0753] 实施方案312.根据实施方案311所述的方法,其中所述式(X)和(XI)的化合物中的n在从约5至约4600、或从约10至约4000、或从约20至约3000、或从约100至约3000、或从约100至约2900、或从约150至约2900、或从约125至约2900、或从约100至约2500、或从约100至约2000、或从约100至约1900、或从约100至约1850、或从约100至约1750、或从约100至约1650、或从约100至约1500、或从约100至约1400、或从约100至约1300、或从约100至约1250、或从约100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的范围内。

[0754] 实施方案313.根据实施方案311所述的方法,其中所述式(X)和(XI)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。

[0755] 实施方案314.根据实施方案311至313中任一项所述的方法,其中所述式(X)、式(XI)或者式(X)和(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71。

[0756] 实施方案315.根据实施方案314所述的方法,其中所述式(X)、式(XI)或者式(X)和(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是K34。

[0757] 实施方案316.根据实施方案314所述的方法,其中所述式(X)、式(XI)或者式(X)和(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是F41。

[0758] 实施方案317.根据实施方案314所述的方法,其中所述式(X)、式(XI)或者式(X)和(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是F43。

[0759] 实施方案318.根据实施方案314所述的方法,其中所述式(X)、式(XI)或者式(X)和(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是K42。

[0760] 实施方案319.根据实施方案314所述的方法,其中所述式(X)、式(XI)或者式(X)和(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是E61。

[0761] 实施方案320.根据实施方案314所述的方法,其中所述式(X)、式(XI)或者式(X)和(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是P64。

[0762] 实施方案321.根据实施方案314所述的方法,其中所述式(X)、式(XI)或者式(X)和(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是R37。

[0763] 实施方案322.根据实施方案314所述的方法,其中所述式(X)、式(XI)或者式(X)和(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是T40。

[0764] 实施方案323.根据实施方案314所述的方法,其中所述式(X)、式(XI)或者式(X)和(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是E67。

[0765] 实施方案324.根据实施方案314所述的方法,其中所述式(X)、式(XI)或者式(X)和(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是Y44。

[0766] 实施方案325.根据实施方案314所述的方法,其中所述式(X)、式(XI)或者式(X)和(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是V68。

[0767] 实施方案326.根据实施方案314所述的方法,其中所述式(X)、式(XI)或者式(X)和(XI)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是L71。

[0768] 实施方案327.根据实施方案311至326中任一项所述的方法,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(X)的结构量与式(XI)的结构量的比率大于1:1。

[0769] 实施方案328.根据实施方案311至326中任一项所述的方法,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(X)的结构量与式(XI)的结构量的比率小于1:1。

[0770] 实施方案329.根据实施方案311所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。

[0771] 实施方案330.根据实施方案311所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137和1249的整数。

[0772] 实施方案331.根据实施方案311所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。

[0773] 实施方案332.根据实施方案330所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且其中所述式(X)和(XI)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0774] 实施方案333.根据实施方案311所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。

[0775] 实施方案334.根据实施方案311所述的方法,其中所述式(X)和(XI)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0776] 实施方案335.根据实施方案311所述的方法,其中n是从约500至约1000。

[0777] 实施方案336.根据实施方案335所述的方法,其中n是从约550至约800。

[0778] 实施方案337.根据实施方案332所述的方法,其中n是681。

[0779] 实施方案338.根据实施方案311所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。

[0780] 实施方案339.根据实施方案311所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中所述式(X)和(XI)的化合物中的n是选自454、455、568、569、

680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0781] 实施方案340.根据实施方案311所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约500至约1000的整数。

[0782] 实施方案341.根据实施方案340所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约550至约800的整数。

[0783] 实施方案342.根据实施方案339所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是681。

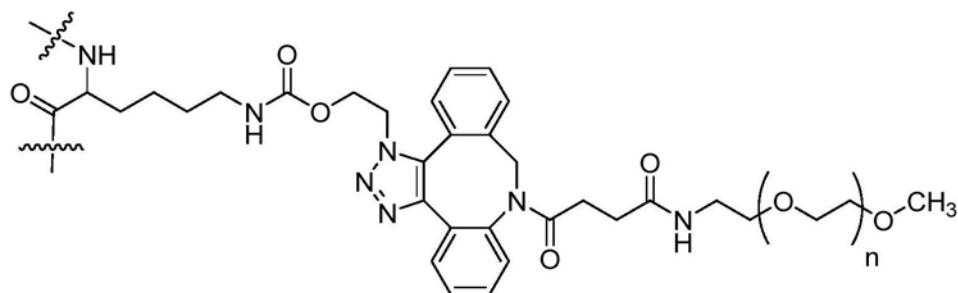
[0784] 实施方案343.根据实施方案311所述的方法,其中n是使得PEG部分的分子量在从约1,000道尔顿至约200,000道尔顿、或从约2,000道尔顿至约150,000道尔顿、或从约3,000道尔顿至约125,000道尔顿、或从约4,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约90,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约80,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约65,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约30,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约30,000道尔顿范围内的整数。

[0785] 实施方案344.根据实施方案311所述的方法,其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约60,000道尔顿、约70,000道尔顿、约80,000道尔顿、约90,000道尔顿、约100,000道尔顿、约125,000道尔顿、约150,000道尔顿、约175,000道尔顿或约200,000道尔顿的整数。

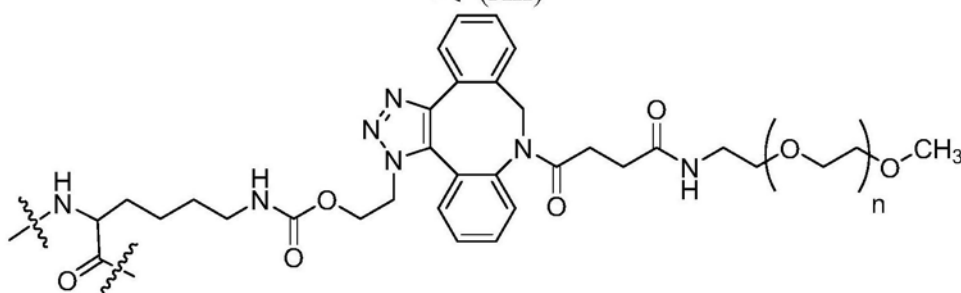
[0786] 实施方案345.根据实施方案311所述的方法,其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿或约50,000道尔顿的整数。

[0787] 实施方案346.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含

SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被式(XII)或(XIII)或者(XII)和(XIII)的混合物的结构替代:



式 (XII)



(XIII)

其中:

n是在从约2至约5000范围内的整数;并且

波浪线指示与SEQ ID NO:3内未被替代的氨基酸残基的共价键。

[0788] 实施方案347.根据实施方案346所述的方法,其中所述式(XII)和(XIII)的化合物中的n在从约5至约4600、或从约10至约4000、或从约20至约3000、或从约100至约3000、或从约100至约2900、或从约150至约2900、或从约125至约2900、或从约100至约2500、或从约100至约2000、或从约100至约1900、或从约100至约1850、或从约100至约1750、或从约100至约1650、或从约100至约1500、或从约100至约1400、或从约100至约1300、或从约100至约1250、或从约100至约1150、或从约100至约1100、或从约100至约1000、或从约100至约900、或从约100至约750、或从约100至约700、或从约100至约600、或从约100至约575、或从约100至约500、或从约100至约450、或从约100至约350、或从约100至约275、或从约100至约230、或从约150至约475、或从约150至约340、或从约113至约340、或从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约340至约795、或从约341至约682、或从约568至约909、或从约227至约1500、或从约225至约2280、或从约460至约2160、或从约460至约2050、或从约341至约1820、或从约341至约1710、或从约341至约1250、或从约225至约1250、或从约341至约1250、或从约341至约1136、或从约341至约1023、或从约341至约910、或从约341至约796、或从约341至约682、或从约341至约568、或从约114至约1000、或从约114至约950、或从约114至约910、或从约114至约800、或从约114至约690、或从约114至约575的范围内。

[0789] 实施方案348.根据实施方案346所述的方法,其中所述式(XII)和(XIII)的化合物中的n是选自2、5、10、11、22、23、113、114、227、228、340、341、454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137、1249、1250、1251、1362、1363、1364、1476、1477、1478、1589、1590、1591、1703、1704、1705、1817、1818、1819、

1930、1931、1932、2044、2045、2046、2158、2159、2160、2271、2272、2273、2839、2840、2841、2953、2954、2955、3408、3409、3410、3976、3977、3978、4544、4545和4546的整数。

[0790] 实施方案349.根据实施方案346至348中任一项所述的方法,其中所述式(XII)、式(XIII)或者式(XII)和(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置选自K34、F41、F43、K42、E61、P64、R37、T40、E67、Y44、V68和L71。

[0791] 实施方案350.根据实施方案349所述的方法,其中所述式(XII)、式(XIII)或者式(XII)和(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是K34。

[0792] 实施方案351.根据实施方案349所述的方法,其中所述式(XII)、式(XIII)或者式(XII)和(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是F41。

[0793] 实施方案352.根据实施方案349所述的方法,其中所述式(XII)、式(XIII)或者式(XII)和(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是F43。

[0794] 实施方案353.根据实施方案349所述的方法,其中所述式(XII)、式(XIII)或者式(XII)和(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是K42。

[0795] 实施方案354.根据实施方案349所述的方法,其中所述式(XII)、式(XIII)或者式(XII)和(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是E61。

[0796] 实施方案355.根据实施方案349所述的方法,其中所述式(XII)、式(XIII)或者式(XII)和(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是P64。

[0797] 实施方案356.根据实施方案349所述的方法,其中所述式(XII)、式(XIII)或者式(XII)和(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是R37。

[0798] 实施方案357.根据实施方案349所述的方法,其中所述式(XII)、式(XIII)或者式(XII)和(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是T40。

[0799] 实施方案358.根据实施方案349所述的方法,其中所述式(XII)、式(XIII)或者式(XII)和(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是E67。

[0800] 实施方案359.根据实施方案349所述的方法,其中所述式(XII)、式(XIII)或者式(XII)和(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是Y44。

[0801] 实施方案360.根据实施方案349所述的方法,其中所述式(XII)、式(XIII)或者式(XII)和(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是V68。

[0802] 实施方案361.根据实施方案349所述的方法,其中所述式(XII)、式(XIII)或者式(XII)和(XIII)的混合物的结构在所述IL-2缀合物的氨基酸序列中的位置是L71。

[0803] 实施方案362.根据实施方案346至361中任一项所述的方法,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(XII)的结构量与式(XIII)的结构量的比率大于1:1。

[0804] 实施方案363.根据实施方案346至361中任一项所述的方法,其中构成所述IL-2缀合物的总量的式(XII)的结构量与式(XIII)的结构量的比率小于1:1。

[0805] 实施方案364.根据实施方案346所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。

[0806] 实施方案365.根据实施方案346所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909、910、1021、1022、1023、1135、1136、1137和1249的整数。

[0807] 实施方案366.根据实施方案346所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自E61和P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。

[0808] 实施方案367.根据实施方案365所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基选自F41、F43、K42、E61和P64,并且其中所述式(XII)和(XIII)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0809] 实施方案368.根据实施方案346所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是E61,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。

[0810] 实施方案369.根据实施方案346所述的方法,其中所述式(XII)和(XIII)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0811] 实施方案370.根据实施方案346所述的方法,其中n是从约500至约1000。

[0812] 实施方案371.根据实施方案370所述的方法,其中n是从约550至约800。

[0813] 实施方案372.根据实施方案369所述的方法,其中n是681。

[0814] 实施方案373.根据实施方案346所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约450至约800、或从约454至约796、或从约454至约682、或从约568至约909的整数。

[0815] 实施方案374.根据实施方案346所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中所述式(XII)和(XIII)的化合物中的n是选自454、455、568、569、680、681、682、794、795、796、908、909和910的整数。

[0816] 实施方案375.根据实施方案346所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约500至约1000的整数。

[0817] 实施方案376.根据实施方案375所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是从约550至约800的整数。

[0818] 实施方案377.根据实施方案374所述的方法,其中在SEQ ID NO:3中被替代的所述氨基酸残基是P64,并且其中n是681。

[0819] 实施方案378.根据实施方案346所述的方法,其中n是使得PEG部分的分子量在从约1,000道尔顿至约200,000道尔顿、或从约2,000道尔顿至约150,000道尔顿、或从约3,000道尔顿至约125,000道尔顿、或从约4,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约100,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约90,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约80,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约70,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约65,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿、或从约5,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约6,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约7,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约40,000道尔顿、或从约8,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约35,000道尔顿、或从约9,500道尔顿至约30,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约50,000道尔

顿、或从约10,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约10,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约15,000道尔顿至约30,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约50,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约45,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约35,000道尔顿、或从约20,000道尔顿至约30,000道尔顿范围内的整数。

[0820] 实施方案379.根据实施方案346所述的方法,其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约60,000道尔顿、约70,000道尔顿、约80,000道尔顿、约90,000道尔顿、约100,000道尔顿、约125,000道尔顿、约150,000道尔顿、约175,000道尔顿或约200,000道尔顿的整数。

[0821] 实施方案380.根据实施方案346所述的方法,其中n是使得PEG部分的分子量为约5,000道尔顿、约7,500道尔顿、约10,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿或约50,000道尔顿的整数。

[0822] 实施方案381.根据实施方案1至380中任一项所述的方法,其中所述一种或多种另外的药剂是选自PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、PD-L2抑制剂、CTLA-4抑制剂、OX40激动剂和4-1BB激动剂的一种或多种免疫检查点抑制剂。

[0823] 实施方案382.根据实施方案381所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自PD-1抑制剂。

[0824] 实施方案383.根据实施方案382所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、兰博利珠单抗、AMP-224、信迪利单抗、特瑞普利单抗、卡瑞利珠单抗、替雷利珠单抗、多塔利单抗(GSK)、PDR001(Novartis)、MGA012(MacroGenics/Incyte)、GLS-010(Arcus/Wuxi)、AGEN2024(Agenus)、西利单抗(Janssen)、ABBV-181(Abbvie)、AMG-404(Amgen)、BI-754091(Boehringer Ingelheim)、CC-90006(Celgene)、JTX-4014(Jounce)、PF-06801591(Pfizer)和杰诺单抗(Apollomics/Genor BioPharma)。

[0825] 实施方案384.根据实施方案383所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗。

[0826] 实施方案385.根据实施方案383所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是纳武单抗。

[0827] 实施方案386.根据实施方案383所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是西米普利单抗。

[0828] 实施方案387.根据实施方案383所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是兰博利珠单抗。

[0829] 实施方案388.根据实施方案383所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是AMP-224。

[0830] 实施方案389.根据实施方案383所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是信迪利单抗。

[0831] 实施方案390.根据实施方案383所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是特瑞普利单抗。

[0832] 实施方案391.根据实施方案383所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是卡瑞利珠单抗。

[0833] 实施方案392.根据实施方案383所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是替雷利珠单抗。

[0834] 实施方案393.根据实施方案381所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自PD-L1抑制剂。

[0835] 实施方案394.根据实施方案393所述的方法,其中所述一种或多种PD-L1抑制剂选自阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、ASC22 (Alphamab/Ascletis)、CX-072 (Cytomx)、CS1001 (Cstone)、柯希利单抗 (Checkpoint Therapeutics)、INCB86550 (Incyte) 和TG-1501 (TG Therapeutics)。

[0836] 实施方案395.根据实施方案394所述的方法,其中所述一种或多种PD-L1抑制剂是阿替利珠单抗。

[0837] 实施方案396.根据实施方案394所述的方法,其中所述一种或多种PD-L1抑制剂是阿维鲁单抗。

[0838] 实施方案397.根据实施方案394所述的方法,其中所述一种或多种PD-L1抑制剂是德瓦鲁单抗。

[0839] 实施方案398.根据实施方案381所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自CTLA-4抑制剂。

[0840] 实施方案399.根据实施方案398所述的方法,其中所述一种或多种CTLA-4抑制剂选自曲美木单抗、伊匹单抗和AGEN-1884 (Agenus)。

[0841] 实施方案400.根据实施方案399所述的方法,其中所述一种或多种CTLA-4抑制剂是曲美木单抗。

[0842] 实施方案401.根据实施方案399所述的方法,其中所述一种或多种CTLA-4抑制剂是伊匹单抗。

[0843] 实施方案402.根据实施方案1至401中任一项所述的方法,其中所述受试者的癌症选自肾细胞癌 (RCC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC)、经典型霍奇金淋巴瘤 (cHL)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤 (PMBCL)、尿路上皮癌、微卫星不稳定癌、微卫星稳定癌、胃癌、宫颈癌、肝细胞癌 (HCC)、梅克尔细胞癌 (MCC)、黑色素瘤、小细胞肺癌 (SCLC)、食管癌、胶质母细胞瘤、间皮瘤、乳腺癌、三阴性乳腺癌、前列腺癌、去势抵抗性前列腺癌、转移性去势抵抗性前列腺癌、或具有DNA损伤反应 (DDR) 缺陷的转移性去势抵抗性前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、中度至低度突变负担的肿瘤、皮肤鳞状细胞癌 (CSCC)、鳞状细胞皮肤癌 (SCSC)、低表达至不表达PD-L1的肿瘤、超出其原发解剖学起源部位的全身性播散至肝脏和CNS的肿瘤以及弥漫性大B细胞淋巴瘤。

[0844] 实施方案403.根据实施方案402所述的方法,其中所述受试者的癌症选自肾细胞癌 (RCC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、尿路上皮癌和黑色素瘤。

[0845] 实施方案404.根据实施方案1至403中任一项所述的方法,其中将所述IL-2缀合物施用至所述有需要的受试者,每周一次、每两周一次、每三周一次、每4周一次、每5周一次、每6周一次、每7周一次或每8周一次。

[0846] 实施方案405.根据实施方案404所述的方法,其中将所述IL-2缀合物施用至所述有需要的受试者,每周一次、每两周一次或每三周一次。

[0847] 实施方案406.根据实施方案405所述的方法,其中将所述IL-2缀合物施用至所述有需要的受试者,每两周一次。

[0848] 实施方案407.根据实施方案405所述的方法,其中将所述IL-2缀合物施用至所述有需要的受试者,每三周一次。

[0849] 实施方案408.根据实施方案1至407中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的血管渗漏综合征。

[0850] 实施方案409.根据实施方案408所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的2级、3级或4级血管渗漏综合征。

[0851] 实施方案410.根据实施方案409所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的2级血管渗漏综合征。

[0852] 实施方案411.根据实施方案409所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的3级血管渗漏综合征。

[0853] 实施方案412.根据实施方案409所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的4级血管渗漏综合征。

[0854] 实施方案413.根据实施方案1至412中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的血管张力丧失。

[0855] 实施方案414.根据实施方案1至413中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的血浆蛋白和流体外渗至血管外空间。

[0856] 实施方案415.根据实施方案1至414中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的低血压和器官灌注减少。

[0857] 实施方案416.根据实施方案1至415中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的嗜中性粒细胞功能受损。

[0858] 实施方案417.根据实施方案1至415中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的趋化作用降低。

[0859] 实施方案418.根据实施方案1至417中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者与所述受试者的播散性感染的风险增加无关。

[0860] 实施方案419.根据实施方案418所述的方法,其中所述播散性感染是脓毒症或细菌性心内膜炎。

[0861] 实施方案420.根据实施方案419所述的方法,其中所述播散性感染是脓毒症。

[0862] 实施方案421.根据实施方案419所述的方法,其中所述播散性感染是细菌性心内膜炎。

[0863] 实施方案422.一种根据实施方案1至421中任一项治疗受试者的癌症的方法,其中在施用所述IL-2缀合物之前,针对任何预先存在的细菌感染治疗所述受试者。

[0864] 实施方案423.根据实施方案422所述的方法,其中在施用所述IL-2缀合物之前,选用苄唑西林、萘夫西林、环丙沙星和万古霉素的抗菌剂治疗所述受试者。

[0865] 实施方案424.根据实施方案1至423中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会加重所述受试者的预先存在的或初始呈现的自身免疫性疾病或炎性障碍。

[0866] 实施方案425.根据实施方案424所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会加重所述受试者的预先存在的或初始呈现的自身免疫性疾病。

[0867] 实施方案426.根据实施方案424所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会加重所述受试者的预先存在的或初始呈现的炎性障碍。

[0868] 实施方案427.根据实施方案424所述的方法,其中所述受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍选自克罗恩病、硬皮病、甲状腺炎、性关节炎、糖尿病、眼球型重症肌无力、新月体性IgA肾小球肾炎、胆囊炎、脑血管炎、史-约综合征和大疱性类天疱疮。

[0869] 实施方案428.根据实施方案427所述的方法,其中所述受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是克罗恩病。

[0870] 实施方案429.根据实施方案427所述的方法,其中所述受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是硬皮病。

[0871] 实施方案430.根据实施方案427所述的方法,其中所述受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是甲状腺炎。

[0872] 实施方案431.根据实施方案427所述的方法,其中所述受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是性关节炎。

[0873] 实施方案432.根据实施方案427所述的方法,其中所述受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是糖尿病。

[0874] 实施方案433.根据实施方案427所述的方法,其中所述受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是眼球型重症肌无力。

[0875] 实施方案434.根据实施方案427所述的方法,其中所述受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是新月体性IgA肾小球肾炎。

[0876] 实施方案435.根据实施方案427所述的方法,其中所述受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是胆囊炎。

[0877] 实施方案436.根据实施方案427所述的方法,其中所述受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是脑血管炎。

[0878] 实施方案437.根据实施方案427所述的方法,其中所述受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是史-约综合征。

[0879] 实施方案438.根据实施方案427所述的方法,其中所述受试者的自身免疫性疾病或炎性障碍是大疱性类天疱疮。

[0880] 实施方案439.根据实施方案1至438中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的精神状态变化、言语困难、皮质盲、肢体或步态共济失调、幻觉、激越、迟钝或昏迷。

[0881] 实施方案440.根据实施方案1至439中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的癫痫发作。

[0882] 实施方案441.根据实施方案1至440中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者在患有已知癫痫症的受试者中不受禁忌。

[0883] 实施方案442.根据实施方案1至441中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的毛细血管渗漏综合征。

[0884] 实施方案443.根据实施方案442所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的2级、3级或4级毛细血管渗漏综合征。

[0885] 实施方案444.根据实施方案443所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的2级毛细血管渗漏综合征。

[0886] 实施方案445.根据实施方案443所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的3级毛细血管渗漏综合征。

[0887] 实施方案446.根据实施方案443所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会引起所述受试者的4级毛细血管渗漏综合征。

[0888] 实施方案447.根据实施方案1至446中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至所述受试者之后引起所述受试者的平均动脉血压下降。

[0889] 实施方案448.根据实施方案1至447中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至所述受试者之后引起所述受试者的低血压。

[0890] 实施方案449.根据实施方案448所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至所述受试者之后引起所述受试者经历收缩压低于90mm Hg或从基线收缩压下降20mm Hg。

[0891] 实施方案450.根据实施方案1至449中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至所述受试者之后引起所述受试者的水肿。

[0892] 实施方案451.根据实施方案1至450中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至所述受试者之后引起所述受试者的肾功能或肝功能受损。

[0893] 实施方案452.根据实施方案1至451中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至所述受试者之后引起所述受试者的嗜酸性粒细胞增多症。

[0894] 实施方案453.根据实施方案452所述的方法,其中将所述有效量的IL-2缀合物施用至所述受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至所述受试者之后引起所述受试者外周血中的嗜酸性粒细胞计数超过500/ μ L。

[0895] 实施方案454.根据实施方案452所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至所述受试者之后引起所述受试者外周血中的嗜酸性粒细胞计数超过500/ μ L至1500/ μ L。

[0896] 实施方案455.根据实施方案452所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至所述受试者之后引起所述受试者外周血中的嗜酸性粒细胞计数超过1500/ μ L至5000/ μ L。

[0897] 实施方案456.根据实施方案452所述的方法,其中将所述有效量的IL-2缀合物施用至所述受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至所述受试者之后引起所述受试者外周血中的嗜酸性粒细胞计数超过5000/ μ L。

[0898] 实施方案457.根据实施方案1至456中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者在正在进行精神药物的现有方案的受试者中不受禁忌。

[0899] 实施方案458.根据实施方案1至457中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者在正在进行肾毒性药物、骨髓毒性药物、心脏毒性药物或肝毒性药物的现有方案的受试者中不受禁忌。

[0900] 实施方案459.根据实施方案458所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者在正在进行氨基糖苷类、细胞毒性化学疗法、多柔比星、甲氨蝶呤或天冬酰胺酶的现有方案的受试者中不受禁忌。

[0901] 实施方案460.根据实施方案1至459中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者在接受含有抗肿瘤剂的组合方案的受试者中不受禁忌。

[0902] 实施方案461.根据实施方案460所述的方法,其中所述抗肿瘤剂选自达卡巴嗪、顺铂、他莫昔芬和干扰素- α 。

[0903] 实施方案462.根据实施方案1至461中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至所述受试者之后引起所述受试者的一种或多种4级不良事件。

[0904] 实施方案463.根据实施方案462所述的方法,其中所述一种或多种4级不良事件选自体温过低;休克;心动过缓;室性期外收缩;心肌缺血;晕厥;出血;房性心律失常;静脉炎;二度房室传导阻滞;心内膜炎;心包积液;外周坏疽;血栓形成;冠状动脉障碍;口炎;恶心和呕吐;肝功能测试异常;胃肠出血;呕血;血性腹泻;胃肠道障碍;肠穿孔;胰腺炎;贫血;白细胞减少;白细胞增多;低钙血症;碱性磷酸酶升高;血尿素氮(BUN)升高;高尿酸血症;非蛋白氮(NPN)升高;呼吸性酸中毒;嗜睡;激越;神经病;偏执狂反应;抽搐;癫痫大发作性抽搐;谵妄;哮喘;肺水肿;通气过度;低氧症;咯血;通气不足;气胸;瞳孔散大;瞳孔障碍;肾功能异常;肾衰;和急性肾小管坏死。

[0905] 实施方案464.根据实施方案1至463中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至一组受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至所述受试者之后在大于1%的所述受试者中引起一种或多种4级不良事件。

[0906] 实施方案465.根据实施方案464所述的方法,其中所述一种或多种4级不良事件选自体温过低;休克;心动过缓;室性期外收缩;心肌缺血;晕厥;出血;房性心律失常;静脉炎;二度房室传导阻滞;心内膜炎;心包积液;外周坏疽;血栓形成;冠状动脉障碍;口炎;恶心和呕吐;肝功能测试异常;胃肠出血;呕血;血性腹泻;胃肠道障碍;肠穿孔;胰腺炎;贫血;白细胞减少;白细胞增多;低钙血症;碱性磷酸酶升高;血尿素氮(BUN)升高;高尿酸血症;非蛋白氮(NPN)升高;呼吸性酸中毒;嗜睡;激越;神经病;偏执狂反应;抽搐;癫痫大发作性抽搐;谵妄;哮喘;肺水肿;通气过度;低氧症;咯血;通气不足;气胸;瞳孔散大;瞳孔障碍;肾功能异常;肾衰;和急性肾小管坏死。

[0907] 实施方案466.根据实施方案1至465中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至一组受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至所述受试者之后在大于

1%的所述受试者中引起一种或多种不良事件,其中所述一种或多种不良事件选自十二指肠溃疡形成;肠坏死;心肌炎;室上性心动过速;继发于视神经炎的永久性或暂时性失明;短暂脑缺血发作;脑膜炎;脑水肿;心包炎;过敏性间质性肾炎;和气管食管瘘。

[0908] 实施方案467.根据实施方案1至466中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至一组受试者不会在将所述IL-2缀合物施用至所述受试者之后在大于1%的所述受试者中引起一种或多种不良事件,其中所述一种或多种不良事件选自恶性高热;心脏停搏;心肌梗死;肺栓塞;脑卒中;肠穿孔;肝或肾衰竭;导致自杀的严重抑郁症;肺水肿;呼吸停止;呼吸衰竭。

[0909] 实施方案468.根据实施方案1至467中任一项所述的方法,其中将所述IL-2缀合物施用至所述受试者在不增加所述受试者的外周血CD4⁺调节性T细胞的数量数的情况下增加所述受试者的外周血CD8⁺ T和NK细胞的数量。

[0910] 实施方案469.根据实施方案1至468中任一项所述的方法,其中将所述IL-2缀合物施用至所述受试者在不增加所述受试者的外周血嗜酸性粒细胞的数量的情况下增加所述受试者的外周血CD8⁺ T和NK细胞的数量。

[0911] 实施方案470.根据实施方案1至469中任一项所述的方法,其中将所述IL-2缀合物施用至所述受试者在不增加所述受试者的瘤内CD4⁺调节性T细胞的数量数的情况下增加所述受试者的瘤内CD8⁺ T和NK细胞的数量。

[0912] 实施方案471.根据实施方案1至470中任一项所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不需要加强监护设施或者心肺或加强监护医学方面的熟练专家的可用性。

[0913] 实施方案472.根据实施方案471所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不需要加强监护设施的可用性。

[0914] 实施方案473.根据实施方案471所述的方法,其中将所述有效量的所述IL-2缀合物施用至所述受试者不需要心肺或加强监护医学方面的熟练专家的可用性。

[0915] 实施方案474.根据实施方案1至473中任一项所述的方法,其中所述癌症呈实体瘤形式。

[0916] 实施方案475.根据实施方案1至473中任一项所述的方法,其中所述癌症呈液体瘤形式。

[0917] 实施方案476.根据实施方案381至475中任一项所述的方法,其中在向所述受试者施用所述一种或多种免疫检查点抑制剂之前,将所述IL-2缀合物施用至所述受试者。

[0918] 实施方案477.根据实施方案381至475中任一项所述的方法,其中在向所述受试者施用所述IL-2缀合物之前,将所述一种或多种免疫检查点抑制剂施用至所述受试者。

[0919] 实施方案478.根据实施方案381至475中任一项所述的方法,其中将所述IL-2缀合物和所述一种或多种免疫检查点抑制剂同时施用至所述受试者。

[0920] 实施方案479.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的氨基酸序列,其中所述IL-2缀合物中的至少一个氨基酸残基被共价键合至PEG基团的半胱氨酸替代。

[0921] 实施方案480.根据实施方案479所述的方法,其中所述PEG基团具有选自5kDa、

10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa和60kDa的分子量。

[0922] 实施方案481.根据实施方案479所述的方法,其中所述PEG基团具有5kDa的分子量。

[0923] 实施方案482.根据实施方案479所述的方法,其中所述PEG基团具有10kDa的分子量。

[0924] 实施方案483.根据实施方案479所述的方法,其中所述PEG基团具有15kDa的分子量。

[0925] 实施方案484.根据实施方案479所述的方法,其中所述PEG基团具有20kDa的分子量。

[0926] 实施方案485.根据实施方案479所述的方法,其中所述PEG基团具有25kDa的分子量。

[0927] 实施方案486.根据实施方案479所述的方法,其中所述PEG基团具有30kDa的分子量。

[0928] 实施方案487.根据实施方案479所述的方法,其中所述PEG基团具有35kDa的分子量。

[0929] 实施方案488.根据实施方案479所述的方法,其中所述PEG基团具有40kDa的分子量。

[0930] 实施方案489.根据实施方案479所述的方法,其中所述PEG基团具有45kDa的分子量。

[0931] 实施方案490.根据实施方案479所述的方法,其中所述PEG基团具有50kDa的分子量。

[0932] 实施方案491.根据实施方案479所述的方法,其中所述PEG基团具有60kDa的分子量。

[0933] 实施方案492.根据实施方案479至491中任一项所述的方法,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且在所述IL-2缀合物中被半胱氨酸替代的所述至少一个氨基酸残基选自K34、T36、R37、T40、F41、K42、F43、Y44、E60、E61、E67、K63、P64、V68、L71和Y106。

[0934] 实施方案493.根据实施方案479至491中任一项所述的方法,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且在所述IL-2缀合物中被半胱氨酸替代的所述至少一个氨基酸残基选自K34、T40、F41、K42、Y44、E60、E61、E67、K63、P64、V68和L71。

[0935] 实施方案494.根据实施方案479至491中任一项所述的方法,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,并且在所述IL-2缀合物中被半胱氨酸替代的所述至少一个氨基酸残基选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72和Y107。

[0936] 实施方案495.根据实施方案479至494中任一项所述的方法,其中所述一种或多种另外的药剂是一种或多种免疫检查点抑制剂,选自PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、PD-L2抑制剂、CTLA-4抑制剂、OX40激动剂和4-1BB激动剂。

[0937] 实施方案496.根据实施方案495所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自PD-1抑制剂。

[0938] 实施方案497.根据实施方案496所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、兰博利珠单抗、AMP-224、信迪利单抗、特瑞普利单抗、卡瑞利珠单抗、替雷利珠单抗、多塔利单抗(GSK)、PDR001(Novartis)、MGA012(Macrogenics/Incyte)、GLS-010(Arcus/Wuxi)、AGEN2024(Agenus)、西利单抗(Janssen)、ABBV-181(Abbvie)、AMG-404(Amgen)、BI-754091(Boehringer Ingelheim)、CC-90006(Celgene)、JTX-4014(Jounce)、PF-06801591(Pfizer)和杰诺单抗(Apollomics/Genor BioPharma)。

[0939] 实施方案498.根据实施方案495所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自PD-L1抑制剂。

[0940] 实施方案499.根据实施方案498所述的方法,其中所述一种或多种PD-L1抑制剂选自阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、ASC22(Alphamab/Ascletis)、CX-072(Cytomx)、CS1001(Cstone)、柯希利单抗(Checkpoint Therapeutics)、INCB86550(Incyte)和TG-1501(TG Therapeutics)。

[0941] 实施方案500.根据实施方案495所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自CTLA-4抑制剂。

[0942] 实施方案501.根据实施方案500所述的方法,其中所述一种或多种CTLA-4抑制剂选自曲美木单抗、伊匹单抗和AGEN-1884(Agenus)。

[0943] 实施方案502.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中至少一个非赖氨酸残基被包含接头和水溶性聚合物的赖氨酸替代。

[0944] 实施方案503.根据实施方案502所述的方法,其中所述水溶性聚合物是PEG基团。

[0945] 实施方案504.根据实施方案502或503所述的方法,其中所述一种或多种另外的药剂是一种或多种免疫检查点抑制剂,选自PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、PD-L2抑制剂、CTLA-4抑制剂、OX40激动剂和4-1BB激动剂。

[0946] 实施方案505.根据实施方案504所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自PD-1抑制剂。

[0947] 实施方案506.根据实施方案505所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、兰博利珠单抗、AMP-224、信迪利单抗、特瑞普利单抗、卡瑞利珠单抗、替雷利珠单抗、多塔利单抗(GSK)、PDR001(Novartis)、MGA012(Macrogenics/Incyte)、GLS-010(Arcus/Wuxi)、AGEN2024(Agenus)、西利单抗(Janssen)、ABBV-181(Abbvie)、AMG-404(Amgen)、BI-754091(Boehringer Ingelheim)、CC-90006(Celgene)、JTX-4014(Jounce)、PF-06801591(Pfizer)和杰诺单抗(Apollomics/Genor BioPharma)。

[0948] 实施方案507.根据实施方案506所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自PD-L1抑制剂。

[0949] 实施方案508.根据实施方案507所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂选自阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、ASC22(Alphamab/Ascletis)、CX-072(Cytomx)、CS1001(Cstone)、柯希利单抗(Checkpoint Therapeutics)、INCB86550(Incyte)和TG-1501(TG

Therapeutics)。

[0950] 实施方案509.根据实施方案508所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自CTLA-4抑制剂。

[0951] 实施方案510.根据实施方案509所述的方法,其中所述一种或多种CTLA-4抑制剂选自曲美木单抗、伊匹单抗和AGEN-1884 (Agenus)。

[0952] 实施方案511.根据实施方案1至510中任一项所述的方法,其中所述IL-2缀合物包含经由不可释放的连接共价键合的PEG基团。

[0953] 实施方案512.根据实施方案11至511中任一项所述的方法,其中所述IL-2缀合物包含不可释放的共价键合的PEG基团。

[0954] 实施方案513.根据实施方案1至512中任一项所述的方法,其中在施用所述IL-2缀合物和所述一种或多种另外的药剂后,所述受试者经历了如通过实体瘤免疫相关疗效评价标准 (iRECIST) 所测量的反应。

[0955] 实施方案514.根据实施方案513所述的方法,其中所述反应是完全反应、部分反应或疾病稳定。

[0956] 实施方案515.根据实施方案1至514中任一项所述的方法,其中通过静脉内、皮下、肌内、脑内、鼻内、动脉内、关节内、皮内、玻璃体内、骨内输注、腹膜内或鞘内施用将所述IL-2缀合物施用至所述受试者。

[0957] 实施方案516.根据实施方案515所述的方法,其中通过静脉内、皮下或肌内施用将所述IL-2缀合物施用至受试者。

[0958] 实施方案517.根据实施方案515所述的方法,其中通过静脉内施用将所述IL-2缀合物施用至受试者。

[0959] 实施方案518.根据实施方案515所述的方法,其中通过皮下施用将所述IL-2缀合物施用至受试者。

[0960] 实施方案519.根据实施方案515所述的方法,其中通过肌内施用将所述IL-2缀合物施用至受试者。

[0961] 实施方案520.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物是具有SEQ ID NO:3的IL-2缀合物,其中所述IL-2缀合物中的非赖氨酸氨基酸被赖氨酸残基替代,并且其中所述赖氨酸残基包含一种或多种水溶性聚合物和共价接头。

[0962] 实施方案521.根据实施方案520所述的方法,其中所述赖氨酸残基位于SEQ ID NO:3的区域K34-Y106中。

[0963] 实施方案522.根据实施方案521所述的方法,其中所述赖氨酸残基位于K34处。

[0964] 实施方案523.根据实施方案521所述的方法,其中所述赖氨酸残基位于F41处。

[0965] 实施方案524.根据实施方案521所述的方法,其中所述赖氨酸残基位于F43处。

[0966] 实施方案525.根据实施方案521所述的方法,其中所述赖氨酸残基位于K42处。

[0967] 实施方案526.根据实施方案521所述的方法,其中所述赖氨酸残基位于E61处。

[0968] 实施方案527.根据实施方案521所述的方法,其中所述赖氨酸残基位于P64处。

[0969] 实施方案528.根据实施方案521所述的方法,其中所述赖氨酸残基位于R37处。

[0970] 实施方案529.根据实施方案521所述的方法,其中所述赖氨酸残基位于T40处。

- [0971] 实施方案530.根据实施方案521所述的方法,其中所述赖氨酸残基位于E67处。
- [0972] 实施方案531.根据实施方案521所述的方法,其中所述赖氨酸残基位于Y44处。
- [0973] 实施方案532.根据实施方案521所述的方法,其中所述赖氨酸残基位于V68处。
- [0974] 实施方案533.根据实施方案521所述的方法,其中所述赖氨酸残基位于L71处。
- [0975] 实施方案534.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b)一种或多种另外的药剂,其中所述IL-2缀合物是白介素-2(IL-2)变体,其中所述IL-2变体的氨基酸序列中的非赖氨酸氨基酸被包含以下的氨基酸替代:(a) 赖氨酸;(b) 共价接头;和(3)和一种或多种水溶性聚合物。
- [0976] 实施方案535.根据实施方案520至534中任一项所述的方法,其中一种或多种水溶性聚合物包括PEG基团。
- [0977] 实施方案536.根据实施方案535所述的方法,其中所述PEG基团是分支或线性PEG基团。
- [0978] 实施方案537.根据实施方案520至536中任一项所述的方法,其中所述一种或多种另外的药剂是一种或多种免疫检查点抑制剂,选自PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、PD-L2抑制剂、CTLA-4抑制剂、OX40激动剂和4-1BB激动剂。
- [0979] 实施方案538.根据实施方案537所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自PD-1抑制剂。
- [0980] 实施方案539.根据实施方案538所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、兰博利珠单抗、AMP-224、信迪利单抗、特瑞普利单抗、卡瑞利珠单抗、替雷利珠单抗、多塔利单抗(GSK)、PDR001(Novartis)、MGA012(MacroGenics/Incyte)、GLS-010(Arcus/Wuxi)、AGEN2024(Agenus)、西利单抗(Janssen)、ABBV-181(Abbvie)、AMG-404(Amgen)、BI-754091(Boehringer Ingelheim)、CC-90006(Celgene)、JTX-4014(Jounce)、PF-06801591(Pfizer)和杰诺单抗(Apollomics/Genor BioPharma)。
- [0981] 实施方案540.根据实施方案539所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自PD-L1抑制剂。
- [0982] 实施方案541.根据实施方案540所述的方法,其中所述PD-L1抑制剂选自阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、ASC22(Alphamab/Ascletis)、CX-072(Cytomx)、CS1001(Cstone)、柯希利单抗(Checkpoint Therapeutics)、INCB86550(Incyte)和TG-1501(TG Therapeutics)。
- [0983] 实施方案542.根据实施方案541所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点抑制剂选自CTLA-4抑制剂。
- [0984] 实施方案543.根据实施方案542所述的方法,其中所述CTLA-4抑制剂选自曲美木单抗、伊匹单抗和AGEN-1884(Agenus)。
- [0985] 实施方案544.根据实施方案381至543中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括向所述受试者施用治疗有效量的一种或多种血管内皮细胞生长因子(VEGF)途径或哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抑制剂。
- [0986] 实施方案545.根据实施方案544所述的方法,其中向所述受试者施用一种或多种VEGF途径抑制剂。

- [0987] 实施方案546.根据实施方案545所述的方法,其中所述一种或多种VEGF途径抑制剂选自血管内皮细胞生长因子受体(VEGFR)酪氨酸激酶抑制剂(TKI)和抗VEGF单克隆抗体。
- [0988] 实施方案547.根据实施方案546所述的方法,其中所述一种或多种VEGF途径抑制剂选自一种或多种VEGFR TKI。
- [0989] 实施方案548.根据实施方案547所述的方法,其中所述一种或多种VEGFR TKI选自卡博替尼、阿昔替尼、帕唑帕尼、舒尼替尼或索拉非尼。
- [0990] 实施方案549.根据实施方案548所述的方法,其中所述一种或多种VEGFR TKI是卡博替尼。
- [0991] 实施方案550.根据实施方案548所述的方法,其中所述一种或多种VEGFR TKI是阿昔替尼。
- [0992] 实施方案551.根据实施方案548所述的方法,其中所述一种或多种VEGFR TKI是帕唑帕尼。
- [0993] 实施方案552.根据实施方案548所述的方法,其中所述一种或多种VEGFR TKI是舒尼替尼。
- [0994] 实施方案553.根据实施方案548所述的方法,其中所述一种或多种VEGFR TKI是索拉非尼。
- [0995] 实施方案554.根据实施方案546所述的方法,其中所述一种或多种VEGF途径抑制剂选自一种或多种抗VEGF单克隆抗体。
- [0996] 实施方案555.根据实施方案554所述的方法,其中所述一种或多种抗VEGF单克隆抗体是贝伐单抗。
- [0997] 实施方案556.根据实施方案544所述的方法,其中所述一种或多种mTOR抑制剂选自雷帕霉素、依维莫司、替西罗莫司、地磷莫司和地氟莫司。
- [0998] 实施方案557.根据实施方案556所述的方法,其中所述一种或多种mTOR抑制剂是雷帕霉素。
- [0999] 实施方案558.根据实施方案556所述的方法,其中所述一种或多种mTOR抑制剂是依维莫司。
- [1000] 实施方案559.根据实施方案556所述的方法,其中所述一种或多种mTOR抑制剂是替西罗莫司。
- [1001] 实施方案560.根据实施方案556所述的方法,其中所述一种或多种mTOR抑制剂是地磷莫司。
- [1002] 实施方案561.根据实施方案556所述的方法,其中所述一种或多种mTOR抑制剂是地氟莫司。
- [1003] 实施方案562.根据实施方案544至561中任一项所述的方法,其中所述受试者的癌症是肾细胞癌(RCC)。
- [1004] 实施方案563.根据实施方案562所述的方法,其中所述一种或多种VEGFR TKI是阿昔替尼或卡博替尼。
- [1005] 实施方案564.根据实施方案562所述的方法,其中所述一种或多种VEGFR TKI是卡博替尼。
- [1006] 实施方案565.根据实施方案381至543中任一项所述的方法,其中所述一种或多种

另外的药剂进一步包括一种或多种化学治疗剂。

[1007] 实施方案566.根据实施方案565所述的方法,其中所述一种或多种化学治疗剂包括一种或多种基于铂的化学治疗剂。

[1008] 实施方案567.根据实施方案565所述的方法,其中所述一种或多种化学治疗剂包括卡铂和培美曲塞。

[1009] 实施方案568.根据实施方案565所述的方法,其中所述一种或多种化学治疗剂包括卡铂和白蛋白结合型紫杉醇。

[1010] 实施方案569.根据实施方案565所述的方法,其中所述一种或多种化学治疗剂包括卡铂和多西紫杉醇。

[1011] 实施方案570.根据实施方案565至569中任一项所述的方法,其中所述受试者的癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)。

[1012] 实施方案571.根据实施方案1至570中任一项所述的方法,其中所述一种或多种另外的药剂是一种或多种化学治疗剂。

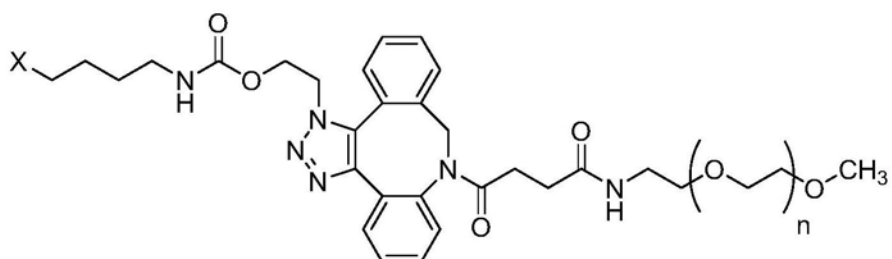
[1013] 实施方案572.根据实施方案571所述的方法,其中所述一种或多种化学治疗剂包括一种或多种基于铂的化学治疗剂。

[1014] 实施方案573.根据实施方案1至572中任一项所述的方法,其中在施用所述IL-2缀合物和所述一种或多种另外的药剂之前,所述受试者测试人乳头瘤病毒(HPV)呈阳性。

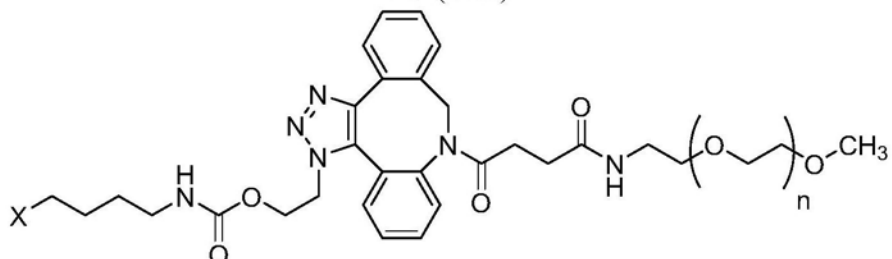
[1015] 实施方案574.根据实施方案572所述的方法,其中所述受试者的癌症是头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)。

[1016] 实施方案575.根据实施方案1至572中任一项所述的方法,所述方法进一步包括所述受试者测试人乳头瘤病毒呈阳性(HPV+),然后施用所述IL-2缀合物和所述一种或多种另外的药剂。

[1017] 实施方案576.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b) 一种或多种PD-1抑制剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中在所述IL-2缀合物中E61或P64处的氨基酸残基被式(VIII)或(IX)或者(VIII)和(IX)的混合物的结构或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物替代:



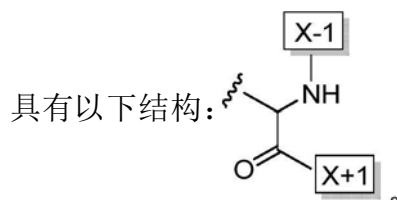
式 (VIII)



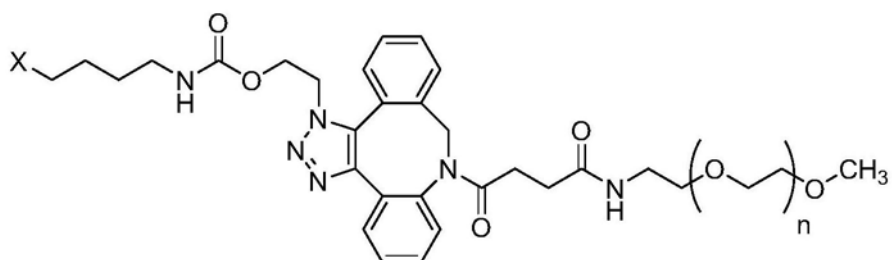
(IX)

其中:

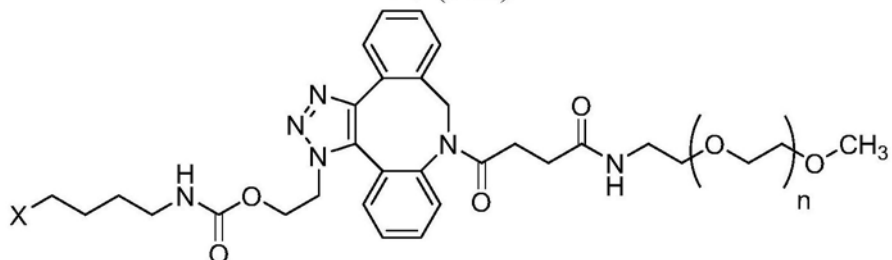
n是使得PEG基团的分子量为从约15,000道尔顿至约60,000道尔顿的整数;并且X



[1018] 实施方案576.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的 (a) IL-2缀合物和 (b) 一种或多种PD-1抑制剂,其中所述IL-2缀合物包含 SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中在所述IL-2缀合物中E61或P64处的氨基酸残基被式 (VIII) 或 (IX) 或者 (VIII) 和 (IX) 的混合物的结构或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物替代:



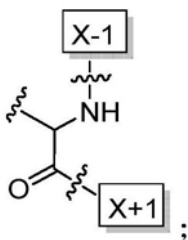
式 (VIII)



(IX)

其中:

n是使得PEG基团的分子量为从约15,000道尔顿至约60,000道尔顿的整数;并且X具有以下结构:



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

[1019] 实施方案577.根据实施方案576或576.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中E61处的氨基酸残基被式(VIII)或(IX)或者(VIII)和(IX)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团的分子量为从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿的整数。

[1020] 实施方案578.根据实施方案577所述的方法,其中n是使得PEG基团的分子量为从约30,000道尔顿的整数。

[1021] 实施方案579.根据实施方案577或578所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗或纳武单抗。

[1022] 实施方案580.根据实施方案579所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗。

[1023] 实施方案581.根据实施方案579所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是纳武单抗。

[1024] 实施方案582.根据实施方案576或576.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中P64处的氨基酸残基被式(VIII)或(IX)或者(VIII)和(IX)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团的分子量为从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿的整数。

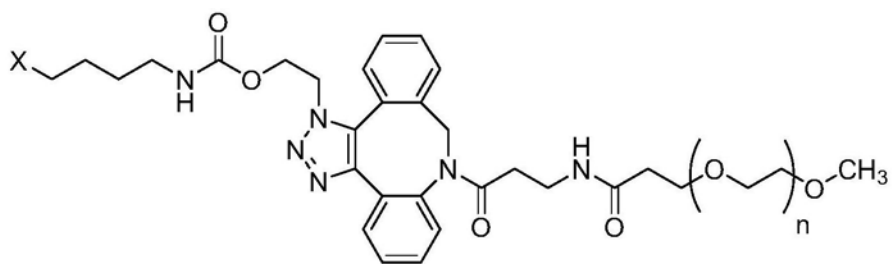
[1025] 实施方案583.根据实施方案582所述的方法,其中n是使得PEG基团的分子量为从约30,000道尔顿的整数。

[1026] 实施方案584.根据实施方案582或583所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗或纳武单抗。

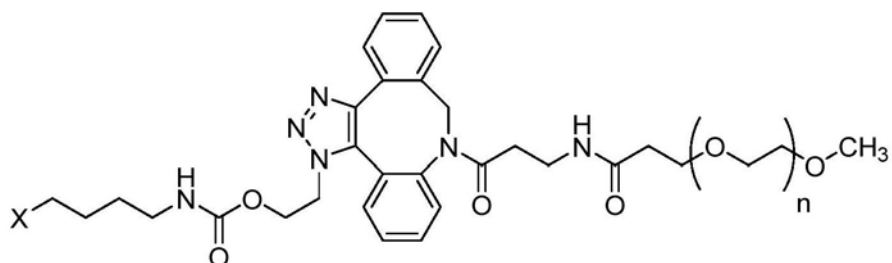
[1027] 实施方案585.根据实施方案584所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗。

[1028] 实施方案586.根据实施方案584所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是纳武单抗。

[1029] 实施方案587.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b) 一种或多种PD-1抑制剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中在所述IL-2缀合物中E61或P64处的氨基酸残基被式(VI)或(VII)或者(VI)和(VII)的混合物的结构或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物替代:



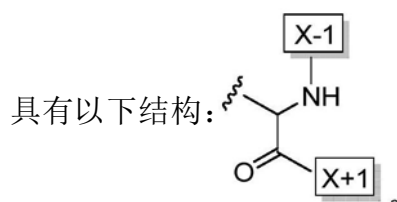
式 (VI)



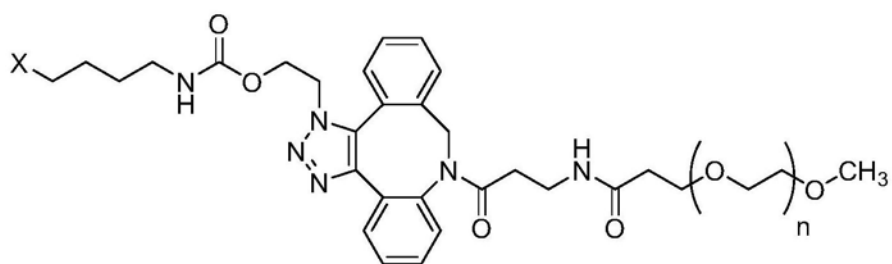
(VII)

其中:

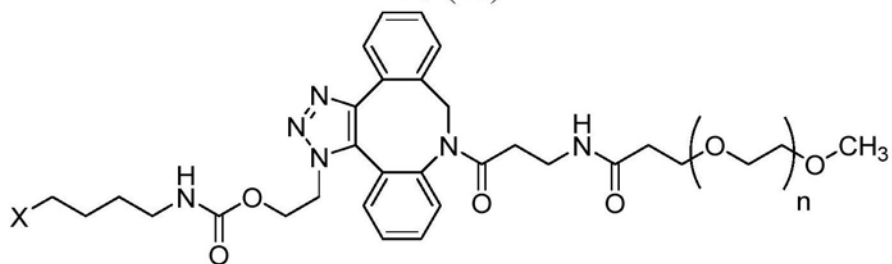
n是使得PEG基团的分子量为从约15,000道尔顿至约60,000道尔顿的整数;并且X



[1030] 实施方案587.1.一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的(a) IL-2缀合物和(b) 一种或多种PD-1抑制剂,其中所述IL-2缀合物包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其中在所述IL-2缀合物中E61或P64处的氨基酸残基被式(VI)或(VII)或者(VI)和(VII)的混合物的结构或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物替代:



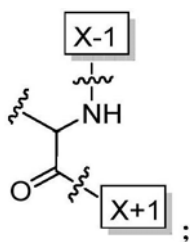
式 (VI)



(VII)

其中:

n是使得PEG基团的分子量为从约15,000道尔顿至约60,000道尔顿的整数;并且X具有以下结构:



X-1指示与前一个氨基酸残基的附接点;并且

X+1指示与下一个氨基酸残基的附接点。

[1031] 实施方案588.根据实施方案587或587.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中E61处的氨基酸残基被式(VI)或(VII)或者(VI)和(VII)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团的分子量为从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿的整数。

[1032] 实施方案589.根据实施方案588所述的方法,其中n是使得PEG基团的分子量为从约30,000道尔顿的整数。

[1033] 实施方案590.根据实施方案588或589所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗或纳武单抗。

[1034] 实施方案591.根据实施方案590所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗。

[1035] 实施方案592.根据实施方案590所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是纳武单抗。

[1036] 实施方案593.根据实施方案587或587.1所述的方法,其中在所述IL-2缀合物中P64处的氨基酸残基被式(VI)或(VII)或者(VI)和(VII)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团的分子量为从约20,000道尔顿至约40,000道尔顿的整数。

[1037] 实施方案594.根据实施方案593所述的方法,其中n是使得PEG基团的分子量为从约30,000道尔顿的整数。

[1038] 实施方案595.根据实施方案593或594所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗或纳武单抗。

[1039] 实施方案596.根据实施方案595所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是派姆单抗。

[1040] 实施方案597.根据实施方案595所述的方法,其中所述一种或多种PD-1抑制剂是纳武单抗。

[1041] 实施方案598.根据实施方案1-597中任一项所述的方法,其中所述IL-2缀合物是药理学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[1042] 实施方案599.一种用于根据实施方案1-598中任一项所述的方法中的IL-2缀合物。

[1043] 实施方案600.IL-2缀合物用于制造根据根据实施方案1-598中任一项所述的方法治疗癌症的药物的用途。

实施例

[1044] 这些实施例仅仅出于说明性目的提供,并且不限制本文提供的权利要求的范围。

[1045] 实施例2至8中公开的化合物中的每一种利用SEQ ID NO:4和[AzK_PEG]部分,其中被取代的氨基酸在IL-2缀合物中的位置是参考在SEQ ID NO:4中的位置。

[1046] 例如,使用类似于实施例2中公开的那些方法的方法来制备表3A和表3B中标记“P65_5kD”的化合物,其中首先制备具有SEQ ID NO:4的蛋白质,其中位置65处的脯氨酸被N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)替代(SEQ ID NO:10)。然后允许含AzK的蛋白质在点击化学条件下与包含具有5kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团的DBCO反应,以提供包含式(II)、式(III)或者式(II)和(III)的混合物的具有SEQ ID NO:20的产物,其中W是具有5kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团。

[1047] 在另一个例子中,通过以下方式制备表3A和表3B中标记“P65_30kD”的化合物,其用于实施例4、实施例5、实施例6和实施例11中(在实施例11中也称为“IL-2_P65[AzK_PEG30kD]”,并且在实施例11和附图中也称为“化合物A”):首先制备具有SEQ ID NO:4的蛋白质,其中位置65处的脯氨酸被N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)替代(SEQ ID NO:10)。然后允许含AzK的蛋白质在点击化学条件下与包含具有30kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团的DBCO反应,以提供包含式(II)、式(III)或者式(II)和(III)的混合物的具有SEQ ID NO:25的产物,其中W是具有30kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团。还可以将所述化合物定义为包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,其中位置65处的脯氨酸(P65)被式(VI)或(VII)或者(VI)和(VII)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团具有约30kDa的分子量的整数。还可以将所述化合物定义为包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,其中位置65处的脯氨酸(P65)被式(X)或(XI)或者(X)和(XI)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团具有约30kDa的分子量的整数。

[1048] 在另一个例子中,通过以下方式制备表3A和表3B中标记“E62_5kD”的化合物:首先制备具有SEQ ID NO:4的蛋白质,其中位置62处的谷氨酸被N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)替代(SEQ ID NO:11)。然后允许含AzK的蛋白质在点击化学条件下与包含具有5kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团的DBCO反应,以提供包含式(II)、式(III)或者式(II)和(III)的混合物的具有SEQ ID NO:21的产物,其中W是具有5kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团。

[1049] 在另一个例子中,通过以下方式制备表3A和表3B中标记“E62_30kD”且还用于实施例4中的化合物:首先制备具有SEQ ID NO:4的蛋白质,其中位置62处的谷氨酸被N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)替代(SEQ ID NO:11)。然后允许含AzK的蛋白质在点击化学条件下与包含具有30kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团的DBCO反应,以提供包含式(II)、式(III)或者式(II)和(III)的混合物的具有SEQ ID NO:26的产物,其中W是具有30kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团。还可以将所述化合物定义为包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,其中位置62处的谷氨酸(E62)被式(VI)或(VII)或者(VI)和(VII)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团具有约30kDa的分子量的整数。还可以将所述化合物定义为包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,其中位置62处的谷氨酸(E62)被式(X)或(XI)或者(X)和(XI)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团具有约30kDa的分子量的整数。

[1050] 在另一个例子中,通过以下方式制备标记“K35_30kD”且用于实施例8中的化合物:首先制备具有SEQ ID NO:4的蛋白质,其中位置35处的赖氨酸被N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)替代(SEQ ID NO:14)。然后允许含AzK的蛋白质在点击化学条件下与包

含具有30kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团的DBCO反应,以提供包含式(II)、式(III)或者式(II)和(III)的混合物的具有SEQ ID NO:29的产物,其中W是具有30kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团。还可以将所述化合物定义为包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,其中位置35处的赖氨酸(K35)被式(VI)或(VII)或者(VI)和(VII)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团具有约30kDa的分子量的整数。还可以将所述化合物定义为包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,其中位置35处的赖氨酸(K35)被式(X)或(XI)或者(X)和(XI)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团具有约30kDa的分子量的整数。

[1051] 实施例9和10利用包含SEQ ID NO:50的化合物“IL-2_P65_[AzK_L1_PEG30kD]-1”,其中位置64处的脯氨酸被AzK_L1_PEG30kD替代,其中将AzK_L1_PEG30kD定义为式(IV)或式(V)或者式(IV)和(V)的混合物的结构和30kDa的线性mPEG链。还将化合物IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1定义为包含SEQ ID NO:3的化合物,其中位置64处的脯氨酸残基(P64)被式(VIII)或(IX)或者(VIII)和(IX)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团的分子量为约30kDa的整数。还将化合物IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1定义为包含SEQ ID NO:3的化合物,其中位置64处的脯氨酸残基(P64)被式(XII)或(XIII)或者(XII)和(XIII)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团的分子量为约30kDa的整数。化合物IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1在实施例12等和附图中也被称为“化合物B”。使用类似于实施例2中公开的那些方法的方法来制备所述化合物,其中首先制备具有SEQ ID NO:3的蛋白质,其中位置64处的脯氨酸被N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)替代(SEQ ID NO:35)。然后允许含AzK的蛋白质在点击化学条件下与包含具有30kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团的DBCO反应。

[1052] 实施例11利用化合物“IL-2_P65[AzK_PEG30kD]”(在本文中也称为“P65_30kD”),其如上所述。

实施例1

[1053] 激酶和细胞因子受体二聚化测定

细胞处理

[1054] 根据标准程序从冷冻器原液扩增PathHunter细胞系。将细胞以20μL总体积接种至白色壁的384孔微量板中,并且在测试前孵育适当时间。

激动剂形式

[1055] 对于激动剂确定,将细胞与样品一起孵育以诱导反应。对样品原液进行中间稀释以产生测定缓冲液中的5X样品。将约5μL的5X样品添加至细胞中并在37℃下孵育6至16小时,根据测定而定。媒介物浓度为1%。

信号检测

[1056] 通过以下方式生成测定信号:单次添加分别用于激动剂和拮抗剂测定的12.5或15μL (50%v/v)的PathHunter检测试剂混合物,然后在室温下孵育一小时。对于一些测定,使用高灵敏度检测试剂(PathHunter Flash试剂盒)检测活性,以改进测定的性能。在这些测定中,将等体积的检测试剂(25或30μL)添加至孔中,然后在室温下孵育一小时。在信号生成后以用于化学发光信号检测的PerkinElmer Envision™仪器读取微量板。

数据分析

[1057] 使用CBIS数据分析套件(ChemInnovation,加利福尼亚州)分析化合物活性。对于

激动剂模式测定,使用下式计算活性百分比:

$\% \text{活性} = 100\% \times (\text{测试样品的平均RLU} - \text{媒介物对照的平均RLU}) / (\text{平均MAX RLU} - \text{媒介物对照的平均RLU})$ 。

[1058] 对于拮抗剂模式测定,使用下式计算抑制百分比:

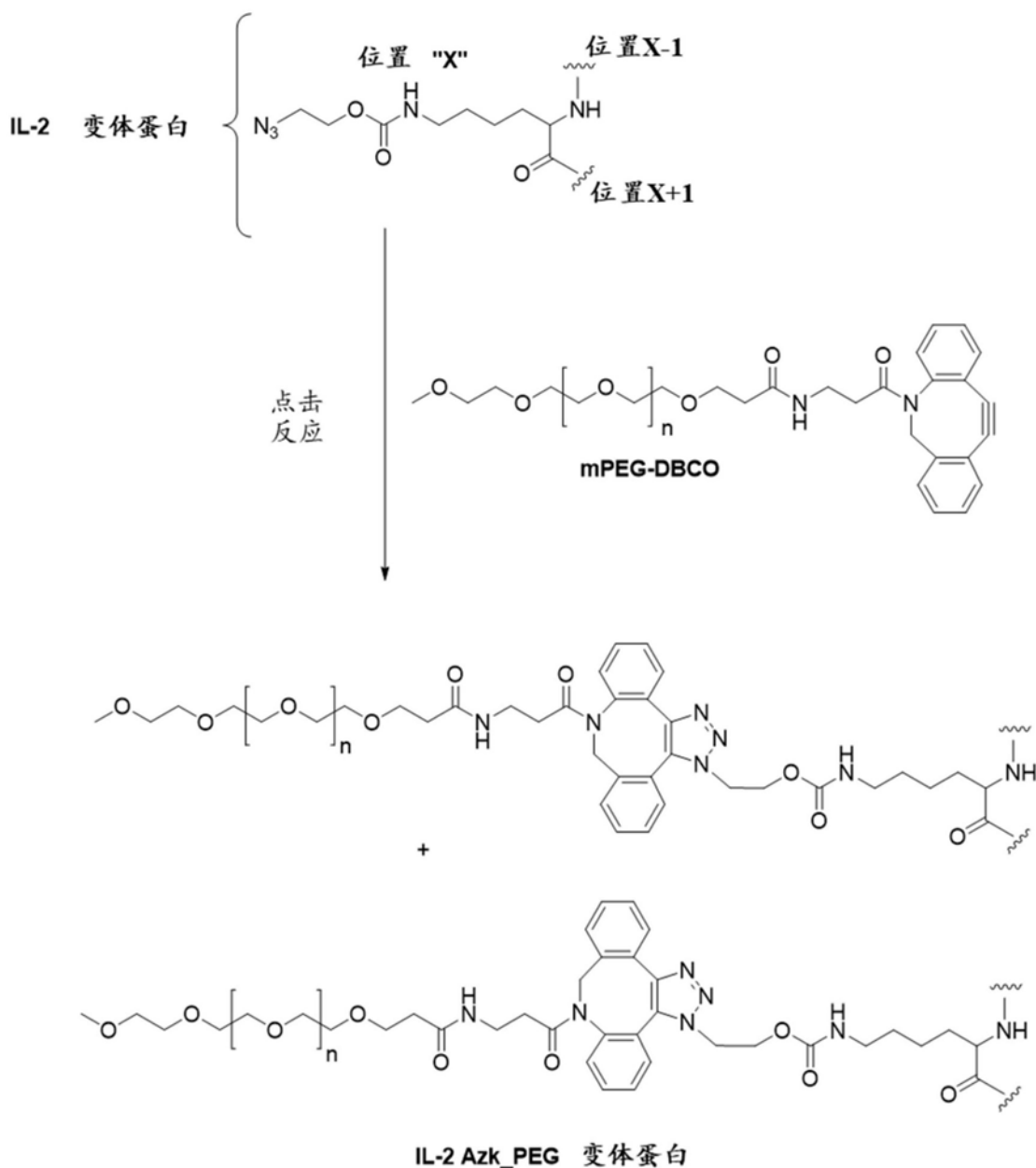
$\% \text{抑制} = 100\% \times (1 - (\text{测试样品的平均RLU} - \text{媒介物对照的平均RLU}) / (\text{EC80对照的平均RLU} - \text{媒介物对照的平均RLU}))$ 。

实施例2

[1059] 用于鉴定没有IL-2R α 接合的聚乙二醇化IL-2化合物的基于细胞的筛选

[1060] 对以下示例性IL-2缀合物进行功能分析:K35、F42、K43、E62和P65。使用本文公开的方法将IL-2缀合物在大肠杆菌中表达为包涵体,其中制备了编码具有所需氨基酸序列的蛋白质的表达质粒,所述大肠杆菌含有(a)包含第一非天然核苷酸和第二非天然核苷酸的非天然碱基对,以在掺入了非天然氨基酸N6-((2-叠氨基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)的所需位置提供密码子,并且在tRNA中提供匹配反密码子;(b)编码源自马氏甲烷八叠球菌Py1并且包含非天然核苷酸以提供匹配反密码子代替其天然序列的tRNA的质粒;(c)编码巴氏甲烷八叠球菌来源的吡咯赖氨酰-tRNA合成酶(Mb Py1RS)的质粒;以及(d)N6-((2-叠氨基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)。编码所需IL-2变体的氨基酸序列的双链寡核苷酸在例如编码具有SEQ ID NO:3的蛋白质的序列的位置34、37、40、41、42、43、44、61、64、68或71处,或者在编码具有SEQ ID NO:4的蛋白质的序列的位置35、38、41、42、43、45、62、65、69或72处含有密码子AXC,其中X是如本文所公开的非天然核苷酸。在一些实施方案中,细胞进一步包含质粒,所述质粒可以是蛋白质表达质粒或另一种质粒,其编码来自马氏甲烷八叠球菌的正交tRNA基因,所述正交tRNA基因包含AXC匹配的反密码子GYT代替其天然序列,其中Y是如本文所公开的并且可以与密码子中的非天然核苷酸相同或不同的非天然核苷酸。X和Y选自如本文所公开的非天然核苷酸dTPT3、dNaM和dCNM0。使用标准程序纯化并再折叠所表达的蛋白质,之后使用DBCO介导的无铜点击化学将含AzK的IL-2产物位点特异性聚乙二醇化,以将稳定的共价mPEG部分附接至AzK(方案1)。

[1061] 方案1.AzK_PEG白介素变体的示例性合成(其中n指示重复PEG单元的数量)。AzK部分与DBCO炔基部分的反应可以提供一种位置异构体产物或位置异构体产物混合物。



[1062] 在Discoverx (加利福尼亚州弗里蒙特) 使用PathHunter IL-2细胞因子受体测定针对功能活性筛选IL-2缀合物。此测定使用表达IL-2受体 β (IL-2R β) 和 γ (IL-2R γ) 亚基的重组人U2OS细胞系, 所述亚基各自与分裂报告酶 β -半乳糖苷酶的一半融合。已经进一步工程化第二细胞系以表达IL-2R α 亚基。用这两种细胞系进行的平行测试允许评估IL-2受体 $\alpha\beta\gamma$ 以及基础 $\beta\gamma$ 复合物的变体激活。对IL-2 $\beta\gamma$ 受体复合物的IL-2激动剂活性刺激受体二聚化和报告 β -半乳糖苷酶重构, 从而产生化学发光信号。以激动剂模式运行所述测定以确定每种测试品的 EC_{50} , 并且对IL2R α 阳性与阴性细胞类型之间的剂量反应曲线谱的比较允许确定IL2R α 对所观察到的活性的贡献。

[1063] 表2示出了在针对10kD (除非另外指出) 聚乙二醇化IL-2缀合物的基于细胞的筛选中IL-2受体激动的 EC_{50} 数据。

表2.

位点	$\beta\gamma$ EC50 (nM)	$\alpha\beta\gamma$ EC50 (nM)	$\beta\gamma/\alpha\beta\gamma$ 比
天然的	1.68	0.074	23
理想的	1.68	1.68	1
K35	6.75	0.15	45
F42	6.09	0.515	12
K43	9.84	0.131	75
E62	3	1.5	2
P65*	23.8	4.44	5
R38	4.16	0.165	25
T41	6.37	0.0489	130
E68	7.70	0.0893	86
Y45*	9.06	0.110	83
V69*	9.99	0.083	121

*指示30kD的聚乙二醇化IL-2缀合物。

[1064] 聚乙二醇化IL-2与人IL-2受体亚基的生物化学相互作用

[1065] 使用Biosensor Tools LLC (犹他州盐湖城) 的表面等离子体共振 (SPR) 测量聚乙二醇化IL-2化合物与人IL-2受体亚基的相互作用的动力学。对于这些研究,在Biacore蛋白A包被的CM4传感器芯片的表面上捕获人IgG1 Fc融合的IL-2 R α (Sino Biological#10165-H02H) 和IL-2 R β (Sino Biological#10696-H02H) 细胞外结构域。使用Biacore 2000SPR仪器用从2 μ M开始的天然IL-2 (野生型IL-2; Thermo#PHC0021)、P65_30kD、P65_5kD、E62_30kD或E62_5kD的两倍稀释系列一式两份地探测这些表面。注射测试样品60秒以允许测量缔合,然后仅注射缓冲液 (洗涤) 30s以测量解离。相对于时间 (s, X轴) 绘制反应单位 (RU, Y轴)。

[1066] 为了评价IL-2受体 α 亚基对IL-2与 β 结合的作用,以相对于 β 约两倍过量捕获 α 。以从2.5 μ M开始的三倍稀释系列向这些表面施加天然IL-2 (野生型IL-2)、P65_30kD、P65_5kD、E62_30kD或E62_5kD。将结合数据拟合至包括批量转换的1:1相互作用模型,并且将所提取的动力学参数归纳于表3A和表3B中。如表3A和表3B中所示,小PEG消除IL2R α 接合,但是对IL2R β 接合的非特异性作用较小。

表3A. IL-2变体与单独IL-2受体亚基表面-IL-2受体 α 表面的相互作用的动力学参数。

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (μ M)
IL-2天然	$4.5 \pm 0.3 \times 10^7$	0.410 ± 0.01	0.009 ± 0.002
P65_30kD	$114 \pm 36 \times 10^7$	0.018 ± 0.008	158 ± 21
P65_5kD	$797 \pm 226 \times 10^7$	0.033 ± 0.004	42 ± 7
E62_30kD	$333 \pm 88 \times 10^7$	0.050 ± 0.01	162 ± 7
E62_5kD	$1010 \pm 41 \times 10^7$	0.035 ± 0.002	34.4 ± 0.3

表3B. IL-2变体与单独IL-2受体亚基表面-IL-2受体 β 表面的相互作用的动力学参数。

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (μ M)

IL-2天然	$1.3 \pm 0.2 \times 10^6$	0.185 ± 0.009	0.145 ± 0.005
P65_30kD	$1.8 \pm 0.2 \times 10^5$	0.370 ± 0.01	2.09 ± 0.09
P65_5kD	$9.0 \pm 0.4 \times 10^5$	0.270 ± 0.01	0.305 ± 0.002
E62_30kD	$1.8 \pm 0.4 \times 10^5$	0.208 ± 0.006	1.14 ± 0.01
E62_5kD	$6.6 \pm 0.8 \times 10^5$	0.281 ± 0.004	0.428 ± 0.00

[1067] 对原代人白细胞减少系统 (LRS) 来源的PBMC样品中的IL-2化合物的离体免疫反应谱分析

[1068] 为了确定IL-2 P65_30kD、K64_30kD、K43_30kD、K35_30kD和F42_30kD的差异性受体特异性如何影响原代免疫细胞亚群的激活,在人LRS来源的外周血单个核细胞(PBMC)样品中使用多色流式细胞术进行淋巴细胞激活的浓度-反应谱分析。这些研究是在PrimityBio LLC(加利福尼亚州弗里蒙特)进行的。用天然IL-2、L-2 P65_30kD、K64_30kD、K43_30kD、K35_30kD和F42_30kD以从30 μ g/mL的最高浓度开始的5倍稀释系列处理新鲜的LRS来源的样品。在45min孵育后,将样品固定并用抗体染色以检测转录因子STAT5的磷酸化形式(pSTAT5)(IL-2受体信号传导复合物的上游接合和激活的标记物)、以及用于跟踪特定T细胞和自然杀伤(NK)细胞亚群中pSTAT5形成的一组表面标记物。用于LRS来源的PBMC样品的流式细胞术研究的染色组包括针对效应T细胞(Teff:CD3+、CD4+、CD8+、CD127+)、NK细胞(CD3-、CD16+)和调节性T细胞(Treg:CD3+、CD4+、CD8-、IL-2R α +、CD127-1)的标记物。

[1069] 针对在浓度-反应模式中不同T和NK细胞子集的激活来分析流式细胞术数据,在用天然IL-2处理后读取pSTAT5积累。由于IL-2 R α 的Treg特异性表达,与CD8 Teff和NK细胞相比,天然IL-2在Treg中展示出增加的针对pSTAT5刺激的效力。与天然化合物相比,聚乙二醇化变体展示出适度降低的对CD8 T细胞和NK细胞群的效力,但是在表达IL-2 R α 的Treg细胞中关于天然IL-2显示出效力的差异性降低。

[1070] 表4提供了在用所指示IL-2变体处理的人LRS样品或CTLL-2增殖中,pSTAT5信号传导的剂量反应EC50(EC50)。

表4.在用所指示IL-2变体处理的人LRS样品或CTLL-2增殖中,pSTAT5信号传导的剂量反应EC50(EC50)。

处理	NK细胞	Treg细胞	CD8+ T细胞	CD8/Treg比	CTLL-2
天然IL-2	5150.5	62.5	25703.5	411.3	846
E62_30kD	12834	37213	66644	1.8	398,012
E62_5kD	5327.5	18146	41552.5	2.3	275,590
E62K	10305	11086	64037	5.8	58,213
P65_30kD	15741	40740.5	113638	2.8	677,198
P65_5kD	1920	6324.5	13769.5	2.2	194,924
K35_30kD	14021	358	63023	176.0	N.D.
F42_30kD	16397	36856	107944	2.9	123,936
K43_30kD	9004	4797	50504	10.5	N.D.

N.D. = 未确定。

[1071] 根据从MFI图生成的剂量反应曲线计算EC50值(pg/mL)。

实施例3

[1072] PEG和残基替代促进无 α 药理学

[1073] 为了确定PEG和残基替代是否影响IL-2E62的无 α 药理学,在人LRS来源的外周血单个核细胞(PBMC)样品中使用多色流式细胞术进行淋巴细胞激活的浓度-反应谱分析。这些研究是在PrimityBio LLC(加利福尼亚州弗里蒙特)进行的。用天然IL-2、E62K或E62_30kD以从30 μ g/mL的最高浓度开始的5倍稀释系列处理新鲜的LRS来源的样品。在45min孵育后,将样品固定并用抗体染色以检测转录因子STAT5的磷酸化形式(pSTAT5)(IL-2受体信号传导复合物的上游接合和激活的标记物)、以及用于跟踪特定T细胞和自然杀伤(NK)细胞亚群中pSTAT5形成的一组表面标记物。用于LRS来源的PBMC样品的流式细胞术研究的染色组包括针对CD4、CD4+记忆中枢、CD4+记忆效应、CD4+记忆T细胞、CD4+幼稚T细胞、CD4+ T细胞、CD8、CD8+记忆中枢、CD8+记忆效应、CD8+记忆T细胞、CD8+幼稚T细胞、CD8+ T细胞、NK细胞和调节性T细胞的标记物。

实施例4

[1074] 在幼稚(E3826-U1704)和携带B16-F10肿瘤的(E3826-U1803)C57BL/6小鼠中的PK/PD研究

[1075] 研究设计归纳于表5和表6中,其中通过参考不包括PEG部分的质量的蛋白质组分的质量来计算剂量。在所指示的点通过心脏穿刺收集末梢血样。研究E3826-U1704包括13个时间点(0.13、0.25、0.5、1、2、4、8、12、24、48、72、96和120h),每个时间点处死3只小鼠;并且研究E3826-U1803包括9个时间点(2、8、12、24、48、72、120、168和240h),每个时间点处死4-7只小鼠。收集血浆和血细胞(两项研究中)以及研究E3826-U1803中的肿瘤用于PK和PD分析。

[1076] 使用合格的人IL-2ELISA测定(Abcam,英国剑桥)来进行血浆样品的生物分析。使用ELISA测定来确定源自血浆的样品中阿地白介素、E62_30kD和P65_30kD以及内标的浓度。在NW Solutions(华盛顿州西雅图)进行PK数据分析。将PK数据导入Phoenix WinNonlin v6.4(Certara/Pharsight,新泽西州普林斯顿)中进行分析。以非分室方法使用IV推注施用模型来分析组平均血浆浓度相对于时间的数据。

表5.PK/PD研究编号E3826-U1704-幼稚C57/BL6小鼠中的对照和测试处理组。

处理	剂量*(mg/Kg)	途径,方案	时间点	N
对照	0	IV,单次剂量	13	3
阿地白介素	0.3	IV,单次剂量	13	3
P65_30kD	0.3	IV,单次剂量	13	3
E62_30kD	0.3	IV,单次剂量	13	3

*剂量是指P65_30kD IL-2多肽的量,其中通过参考不包括PEG部分的质量的蛋白质组分的质量来计算剂量。

表6.PK/PD研究编号E3826-U1803-对照和测试处理组-携带B16F-10黑色素瘤肿瘤的小鼠(其中通过参考不包括PEG部分的质量的蛋白质组分的质量来计算剂量)。

处理	剂量(mg/kg)	途径,方案	时间点	N
无(给药前)	0mg/kg	无	1	6
媒介物对照	0mg/kg	IV,单次剂量	9	3
P65_30kD	1mg/kg	IV,单次剂量	9	4
P65_30kD	3mg/kg	IV,单次剂量	9	4

[1077] 在研究E3826-U1704中,P65_30kD和E62_30kD二者都展现出相对于阿地白介素更优越的PK谱,如表7中所归纳。在阿地白介素的单次IV推注剂量后,在给药后0.03h(给药后的第一个测量时间点)观察到 T_{max} ,并且直至给药后4h,平均血浆浓度是可测量的。在P65_30kD和E62_30kD的单次IV推注给药后,在给药后0.03h观察到 T_{max} ,并且直至给药后120h(最后一个测量时间点),平均血浆浓度是可测量的。在单独研究中,在E62_5kD的IV给药后,在给药后0.133h观察到 T_{max} ,并且直至给药后12h,平均血浆浓度是可测量的。

[1078] 基于 C_{max} 和 AUC_{0-t} 的暴露如下:P65_30kD>E62_30kD>>E62_5kD>阿地白介素。具有较小PEG的E62_5kD的PK谱更接近rIL-2(表7)。基于 C_{max} 和 AUC_{0-t} ,P65_30kD暴露分别是阿地白介素的5.5倍和200倍。另外,与阿地白介素相比,P65_30kD展示出延长23倍的 $t_{1/2}$ (13.3相比于0.57h)以及减少约198倍的CL(6.58相比于1300mL/h/Kg)。对于P65_30kD和E62_30kD二者,分布体积(分别为82.4和92.3mL/Kg)相对于阿地白介素减小约4.2至4.7倍,并且类似于小鼠中的血液体积(85mL/Kg;[Boersen 2013])。这表明,P65_30kD和E62_30kD在全身循环内分布最多。

表7.C57BL/6雌性小鼠中的P65_30kD PK参数。

参数	单位	P65_30kD	E62_30kD	E62_5kD	阿地白介素
T_{max}	h	0.030	0.030	0.133	0.030
C_{max}	ng/mL	4,870	4,230	936	884
AUC_{0-t}	h*ng/mL	45,600	37,100	798	229
R^2		0.992	0.986	0.851	0.900
AUC_{INF}	h*ng/mL	45,600	37,100	807	230
$t_{1/2}$	h	13.300	14.500	2.56	0.573
CL	mL/h/Kg	6.580	8.07	372	1300
V_{ss}	mL/Kg	82.4	92.3	404	390

注意: R^2 是每个浓度与时间曲线中末期的拟合优度参数。

所有参数显示3位有效数字。

实施例5

[1079] 在外周血隔室中的药效学观察

[1080] 使用STAT5磷酸化和细胞增殖的诱导(早期分子标记物Ki-67和细胞计数)作为药效学读数,以评估P65_30kD相对于其药代动力学的药理学谱。在CD8+效应T细胞中,pSTAT5 PD标记物显示出与P65_30kD和阿地白介素二者的PK的良好相关性(表7)。在Treg中,直至72h以及直至24h,在NK和CD8+ T细胞二者中观察到pSTAT5的持续升高。在给药阿地白介素的小鼠中,仅在2h后,pSTAT5诱导返回基线。STAT5磷酸化转换为CD8+效应T细胞和NK细胞的增殖性反应(72-120h),但是对于T reg并非如此。CD8+效应T细胞的表型分析揭示此群体内的CD44+记忆细胞显著扩增。

[1081] 在携带B16-F10肿瘤的(E3826-U1803)C57BL/6小鼠的肿瘤隔室中的药效学观察

[1082] 表8示出了在携带B16-F10肿瘤的小鼠中在3mg/kg单次剂量的P65_30kD后的血浆和肿瘤药物浓度,其中通过参考不包括PEG部分的质量的蛋白质组分的质量来计算剂量。肿瘤半衰期是血浆半衰期的两倍(24.4相比于12.6),表明P65_30kD渗透肿瘤并保留在肿瘤中。曲线的尾端交叉,表明血浆消除快于肿瘤(数据未显示)。对于1和3mg/kg剂量,肿瘤:血

浆AUC比分别为9.7%和8.4%。

表8.携带B16-F10肿瘤的C57BL/6雌性小鼠的P65_30kD血浆和肿瘤PK参数。

参数	P65_30kD (3 mg/kg)	
	血浆	肿瘤
T _{max} (h)	*2.00	8
C _{max} (ng/mL)	40000	1550
t _{1/2} (h)	12.60	24.4
AUC _{0-t} (h*ng/mL)	656,000	55200
R ²	0.974	0.988
AUC _{INF} (h*ng/mL)	656,000	55200

[1083] 在Balb/c小鼠中的MTD研究E3826-U1802

[1084] 在Crown Biosciences, Inc. (加利福尼亚州圣地亚哥) 的幼稚雌性Balb/c小鼠中进行P65_30kD的剂量范围研究。研究设计示于表9中, 其中通过参考不包括PEG部分的质量的蛋白质组分的质量来计算剂量。在8个时间点 (0.25、1、4、12、24、34、48和72h) 经由下颌下静脉抽取血样。收集血浆和血细胞二者用于PK和PD分析。

[1085] 采用可商购的ELISA试剂盒分析所有血浆样品的人IL-2以及小鼠IL-2、TNF-α、IFN γ、IL-5和IL-6细胞因子。

表9. PK/PD和MTD研究编号E3826-U1802-在幼稚Balb/C小鼠中的对照和测试处理组。

处理	剂量 (mg/kg)	途径, 方案	时间点	N
幼稚	0mg/kg		0	3
媒介物对照	0mg/kg	IV, BID x 3	3	3
阿地白介素	0.01mg/kg	IV, BID x 3	3	3
阿地白介素	0.03mg/kg	IV, BID x 3	3	3
阿地白介素	0.1mg/kg	IV, BID x 3	3	3
阿地白介素	1.0mg/kg	IV, BID x 3	3	3
阿地白介素	3.0mg/kg	IV, BID x 3	3	3
阿地白介素	5.0mg/kg	IV, BID x 3	3	3
P65_30kD	0.01mg/kg	IV, 单次剂量	3	3
P65_30kD	0.03mg/kg	IV, 单次剂量	3	3
P65_30kD	0.1mg/kg	IV, 单次剂量	3	3
P65_30kD	1.0mg/kg	IV, 单次剂量	3	3
P65_30kD	3.0mg/kg	IV, 单次剂量	3	3
P65_30kD	5.0mg/kg	IV, 单次剂量	3	3
#P65_30kD	0.3mg/kg	IV, 单次剂量	8	3

*除了72h时间点以外的所有时间点的血液收集都是经由下颌下静脉进行。在72h时间点收集末梢血。

#仅使用0.3mg/kg剂量的P65_30kD进行PK/PD评价。

[1086] 在使用Balb/c小鼠的MTD研究中的毒理学观察

[1087] 与高剂量阿地白介素相关的主要毒性是血管渗漏综合征和相关的细胞因子释放综合征 (CRS)。为了评价此作用在小鼠中的可能性,以范围从0.01-5.0mg/kg剂量的剂量进行P65_30kD的单次剂量IV施用(表9),其中通过参考不包括PEG部分的质量的蛋白质组分的质量来计算剂量。所进行的分析是血液学、组织病理学、器官重量和细胞因子分析。在P65_30kD或阿地白介素二者的情况下,相对于媒介物对照小鼠,对于血液学、组织病理学或体重未观察到异常。关于细胞因子分析,观察到从1mg/kg开始至5mg/kg,阿地白介素升高血浆IL-5水平。在P65_30kD的情况下,仅在5mg/kg剂量下观察到IL-5的适度增加(但与阿地白介素相比较低)。在阿地白介素和P65_30kD二者的情况下,观察到IFN γ 的全身水平的短暂升高。

实施例6

[1088] 食蟹猴中的PK/PD-研究编号:20157276

[1089] 在施用0.3mg/kg的单次静脉内剂量后,在非幼稚食蟹猴中评价P65_30kD的药代动力学和药效学谱,其中通过参考不包括PEG部分的质量的蛋白质组分的质量来计算剂量。所述研究是在Charles River Laboratories, Inc. (内华达州里诺) 进行,并且PK数据分析是在NW Solutions (华盛顿州西雅图) 进行。在给药前以及在15个时间点(给药后0.5、1、2、4、8、12、24、36、48、72、120、144、168、192和240h) 收集血样。收集血浆和血细胞二者用于PK和PD分析。使用所选择的时间点进行PK、PD、细胞群和血液学分析。

[1090] 采用可商购的ELISA试剂盒分析所有血浆样品的人IL-2 (PK读数)。

[1091] 表10示出了食蟹猴中的P65_30kD PK参数。

表10.

			0.3 mg/kg		
			动物2699	动物2705	平均值
ROA	参数	单位	估计值		
IV	T _{max}	h	0.500	0.500	0.500
	C _{max}	ng/mL	11000	11400	11200
	AUC _{0-t}	hr*ng/mL	121000	120000	121000
	t _{1/2}	h	13.4	13.9	13.6
	CL	mL/hr/kg	2.47	2.49	2.48
	V _{ss}	mL/kg	29.0	32.1	30.5

[1092] 在单次IV推注给药后,在给药后0.5h(给药后的第一个测量时间点) 观察到T_{max},并且直至给药后168h(最后一个可测量的),平均血浆浓度是可测量的。P65_30kD的t_{1/2}和AUC分别为13.6h和121000hr*ng/mL。

[1093] 血液学参数-食蟹猴-研究编号:20157276

[1094] 对于血液学参数,评价时间点对应于给药前第-1天以及给药后第1天、第3天、第6天、第8天、第10天、第12天、第14天、第17天、第19天、第21天。

[1095] 实施例7

[1096] 对原代人白细胞减少系统 (LRS) 来源的PBMC样品中的示例性IL-2化合物的离体免疫反应谱分析

[1097] 为了确定示例性IL-2化合物的差异性受体特异性如何影响原代免疫细胞亚群的

激活,在人LRS来源的外周血单个核细胞(PBMC)样品中使用多色流式细胞术进行淋巴细胞激活的浓度-反应谱分析。通过SEQ NO.1的修饰来合成表12的缀合物。这些研究是在PrimityBio LLC(加利福尼亚州弗里蒙特)进行的。用示例性IL-2化合物的稀释系列处理源自人LRS样品的原代淋巴细胞,并且基于每种淋巴细胞细胞类型中的pSTAT5信号传导使用表11中所示的组进行定量。

表11.指示细胞群的关键。

标记物	细胞群
CD3	T细胞
CD4	Th细胞
CD8	T效应细胞
CD45RA	幼稚T细胞
CD56	NK细胞
CD14/19	单核细胞/B细胞
CD25	Treg或有经验的T细胞
CD127	非Treg
CD62L	记忆T与效应记忆T细胞
pSTAT5 (Y694)	激活标记物

[1098] 针对在浓度-反应模式中不同T和NK细胞子集的激活来分析流式细胞术数据,在用示例性IL-2变体K9_30kD处理后读取pSTAT5积累。

[1099] 表12示出了在用所指示IL-2变体处理的人LRS样品或CTLL-2增殖中,pSTAT5信号传导的剂量反应EC50 (EC50)。

表12.在用所指示IL-2变体处理的人LRS样品或CTLL-2增殖中,pSTAT5信号传导的剂量反应EC50 (EC50)。

化合物	NK细胞	CD8+ T细胞	Treg细胞	CD8+/Treg 比	Treg EC50相 比于天然IL-2 的倍数增加	CTL-2增殖
天然IL-2	4586	31024	75	414	1	455.8
K9_30kD	169578	1100679	2217	496	30	504
H16_30kD	2545257	12070108	34976	345	466	80755
L19_30kD	6756768	22436430	93205	241	1243	3510
D20_30kD	2643930	9505217	1129455	8	15059	689939
M23_30kD	143620	539824	1030	524	14	1102
N26_30kD	258531	1188859	2459	483	33	2594
N88_30kD	3298113	11111537	323201	34	4309	66606
E100_30kD	35088	195823	483	405	6	1676
N119_30kD	34010	143380	535	268	11	1215
T123_30kD	33396	152928	269	569	6	255
Q126_30kD	3676807	19722480	29454	670	393	3584
S127_30kD	20210	92190	150	615	3	123
T131_30kD	24207	132922	258	515	3	641
N88R/D109_30kD	2780819	12503386	175805	71	3663	59577
V91K	20537	102255	142	720	3	99.5
N88R	2312847	15025734	11082	1356	148	363

*在每次单独实验中,Treg效力与天然IL-2(野生型IL-2)运行相比的变化。

[1100] 根据从MFI图生成的剂量反应曲线计算EC50值 (pg/ml)。

实施例8

[1101] 在C57BL/6小鼠中的PK研究

[1102] 实验详情归纳于表13中,其中通过参考不包括PEG部分的质量的蛋白质组分的质量来计算剂量。

表13.

组	动物 数量	测试/对照品 (剂量)	途径, 给药方案	一个或多个终点
1	9	天然IL-2 (野生型) (3.0 mg/kg) 浓度: 0.6 mg/mL	IV, 单次剂量, 在第0天的T = 0, 5 mL/kg	在给药后0.08、0.25、 0.5、1、2、4、8、12和24 小时收集血液
2	9	K35_30kD (3.0 mg/kg) 浓度: 0.6 mg/mL	IV, 单次剂量, 在第0天的T = 0, 5 mL/kg	
3	9	K35_30kD (0.3 mg/kg) 浓度: 0.6 mg/mL	IV, 单次剂量, 在第0天的T = 0, 5 mL/kg	
额外的	6	N/A	N/A	空白基质收集(不定时)
总计	33			

[1103] 评价示例性聚乙二醇化IL-2化合物K35_30kD在两个剂量水平下的药代动力学特性。将冻干的测试品在PBS中重构,并且每个剂量组经由静脉内尾静脉注射以0.3和3mg/kg对九只雄性C57BL/6小鼠给药(参见下文收集详情)。在给药后0.08、0.25、0.5、1、2、4、8、12和24小时收集血样。使用来自Abcam的hIL-2ELISA试剂盒(ab100566)进行测试品的检测和

定量,所述试剂盒不与天然小鼠IL-2交叉反应。为了调整天然和聚乙二醇化化合物的试剂盒检测灵敏度的ELISA特异性差异,使用测试品稀释剂缓冲液生成天然IL-2和K35_30kD测试品标准曲线,并且关于相应的标准曲线分析数据。所绘制的数据表示如上所述三个单独样品(生物学重复)的平均值和SEM,并且提取K35_30kD测试品的PK参数并归纳于表14中。

表14.

分析物		单位	剂量	
			0.3 mg/kg	3 mg/kg
			估计值	
IL-2 K35-mPEG30kD	T _{max}	h	0.250	0.250
	C _{max}	ng/mL	6080	57700
	AUC _{0-t}	hr*ng/mL	38500	425000
	R ²		0.994	0.947
	AUC _{1/2extrap}	%	35.3	37.4
	AUC _{0-∞}	h*ng/mL	59600	679000
	t _{1/2}	h	18.2	19.5
	C _{max} /D	kg*ng/mL/mg	20300	19200
	AUC _{0-t} /D	hr*ng/mL	128000	142000

实施例9

[1104] 对与人IL-2Rα和IL-2Rβ的结合的表征

[1105] 进行研究以表征示例性IL-2缀合物IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1与人IL-2Rα和IL-2Rβ的结合。化合物IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1如先前所述并且包含SEQ ID NO:50,其中位置64处的脯氨酸被AzK_L1_PEG30kD替代,其中将AzK_L1_PEG30kD定义为式(IV)或式(V)或者式(IV)和式(V)的混合物的结构和30kDa的线性mPEG链。还将化合物IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1定义为包含SEQ ID NO:3的化合物,其中位置64处的脯氨酸残基(P64)被式(VIII)或式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团的分子量为约30kDa的整数。还将化合物IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1定义为包含SEQ ID NO:3的化合物,其中位置64处的脯氨酸残基(P64)被式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和式(XIII)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团的分子量为约30kDa的整数。

[1106] 使用类似于实施例2中公开的那些方法的方法来制备所述化合物,其中首先制备具有SEQ ID NO:3的蛋白质,其中位置64处的脯氨酸被N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)替代(SEQ ID NO:35)。然后允许含AzK的蛋白质在点击化学条件下与包含具有30kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团的DBC0反应。简而言之,使用以下物质使用本文公开的方法将用于生物缀合的IL-2在大肠杆菌中表达为包涵体:(a)编码以下的表达质粒:(i)具有所需氨基酸序列的蛋白质,所述基因含有第一非天然碱基对在掺入了非天然氨基酸N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)的所需位置提供密码子;和(ii)源自马氏甲烷八叠球菌Py1的tRNA,所述基因包含第二非天然核苷酸以提供匹配反密码子代替其天然序列;(b)编码巴氏甲烷八叠球菌来源的吡咯赖氨酰-tRNA合成酶(Mb Py1RS)的质粒;(c)AzK;以及(d)核苷酸三磷酸转运蛋白PtNTT2的截短型变体,其中全长蛋白质的前65个氨基酸残基缺失。编码IL-2变体的氨基酸序列的双链寡核苷酸含有密码子AXC作为编码具有SEQ ID NO:3的蛋白质的序列的密码子64,其中P64被本文所述的非天然氨基酸替代。编码来自马氏甲烷八叠球菌的正交tRNA基因的质粒包含AXC匹配的反密码子代替其天然序

列,其中Y是如本文所公开的非天然核苷酸。X和Y选自如本文所公开的非天然核苷酸dTPT3和dNaM。使用标准程序从包涵体中提取所表达的蛋白质并将其再折叠,之后使用DBC0介导的无铜点击化学将含AzK的IL-2产物位点特异性聚乙二醇化,以将稳定的共价mPEG部分(具有30kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团)附接至AzK(如上文方案S6中所概述)。

[1107] 测试品样品与IL-2R α 的结合。测试溶液中的测试品样品在IL-2R α 受体表面上的结合。使用Scrubber-2 (Biologic Software Pty Ltd)通过减去来自不含受体的参考表面的信号以及缓冲液注射物的平均值来处理反应数据。将rhIL-2浓度系列的反应总体上拟合至1:1相互作用模型,包括用于质量运输的步骤。结合常数的总结提供于表15中。

表15.

	K _D (nM)	
	IL-2 R α	IL-2 R β
rhIL-2	11 $\pm$ 1	0.7 $\pm$ 1
IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1	n.d.	3.1 $\pm$ 0.3

[1108] 在蛋白质包被的CM4传感器芯片上捕获Fc标记的IL-2R β 。将CM4传感器芯片对接至Biacore 4000光学生物传感器,并且用HBS-P运行缓冲液(HBS-P是添加有0.005%Tween-20的1X HBS-N)将仪器启动三次。使用标准NHS/EDC偶联条件来偶联蛋白A。将IL-2R β -Fc溶解于水中至浓度为0.1mg/ml,然后以1/1000稀释至HBS-P运行缓冲液中。将IL-2R β -Fc注射不同时间长度以产生2种不同密度的受体表面(约750RU和1500RU,数据未显示)。

[1109] 对样品与IL-2R β 的结合的表征。测试溶液中的测试品样品在IL-2R β 受体表面上的结合。使用Scrubber-2 (Biologic Software Pty Ltd)通过减去来自不含受体的参考表面的信号以及缓冲液注射物的平均值来处理反应数据。将一式两份地测试的rhIL-2(4uM最高浓度2倍稀释液)和IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1样品(8uM最高浓度2倍稀释液)的反应总体上拟合至1:1相互作用模型,包括用于质量运输的步骤。结合常数的总结提供于表15中。

[1110] 结果。在Biacore SPR生物传感器系统内的镍带电NTA传感器芯片上以不同密度捕获His标记的IL-2R α 。在蛋白A包被的CM4传感器芯片上以不同密度捕获Fc标记的IL-2R β 。将反应数据拟合至1:1相互作用模型以确定每种相互作用的结合常数。重组人IL-2(rhIL-2)以约11nM的亲合力与IL-2R α 结合,而未能检测到IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1样品与IL-2R α 的结合。在这些测试条件下,rhIL-2以约700nM的亲合力与IL-2R β 结合,并且IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1以约3uM的亲合力与IL-2R β 结合。

实施例10

[1111] 进行研究以确定IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1相比于重组人白介素-2(hIL-2)对转录因子STAT5的磷酸化形式(pSTAT5)信号传导效力人原代免疫细胞类型的效力和差异性细胞类型特异性。化合物IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1如先前所述并且包含SEQ ID NO: 50,其中位置64处的脯氨酸被AzK_L1_PEG30kD替代,其中将AzK_L1_PEG30kD定义为式(IV)或式(V)或者式(IV)和式(V)的混合物的结构和30kDa的线性mPEG链。还将化合物IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1定义为包含SEQ ID NO:3的化合物,其中位置64处的脯氨酸残基(P64)被式(VIII)或式(IX)或者式(VIII)和式(IX)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团的分子量为约30kDa的整数。还将化合物IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1定义为包含SEQ ID NO:3的化合物,其中位置64处的脯氨酸残基(P64)被式(XII)或式(XIII)或者式(XII)和

式(XIII)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团的分子量为约30kDa的整数。使用类似于实施例2中公开的那些方法的方法来制备所述化合物,其中首先制备具有SEQ ID NO:3的蛋白质,其中位置64处的脯氨酸被N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸(AzK)替代(SEQ ID NO:35)。然后允许含AzK的蛋白质在点击化学条件下与包含具有30kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团的DBCO反应。

[1112] 人PBMC样品处理方法。将IL-2(对照,1mg/mL)和IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1(“第1批”:1.27mg/mL;“第2批”:2.29mg/mL)的原液作为在-20℃下冷冻的原液溶液储存。

[1113] 将IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1第1批和第2批化合物稀释于PBS中,并且使用PBS+0.1%BSA稀释IL-2以产生10X原液。10X IL-2原液浓度为5ug/mL,并且GLP-1和GLP-2原液在6-300ug/mL之间,根据实验而定。将10X原液稀释于连续5倍稀释液中,以产生10点剂量滴定液。IL-2的最高剂量为5ug/mL,并且第1批和第2批原液在6-300ug/mL之间,根据实验而定。将10μL的每种原液添加至90μL细胞样品中,以实现对于IL-2而言500ng/mL的最终最高剂量以及对于第1批和第2批中的每一种而言0.6-30ug/mL的最终最高剂量。

[1114] 样品刺激。为了刺激,将上文概述的10μL剂量滴定液添加至预先平衡至37℃的90μL血样中。将样品在37℃下孵育45分钟。在孵育期结束时,裂解红细胞,并且同时固定细胞,如下:

[1115] 将100μL细胞转移至900μL的BD裂解/固定缓冲液(Beckton Dickinson,目录号558049)中并立即涡旋。通过将原液在即将添加前用细胞培养水以1:5稀释来制备BD裂解/固定缓冲液。将样品在室温下孵育10分钟,然后以450x g离心5分钟以使细胞沉淀。用PBS+0.5%BSA洗涤沉淀的细胞,并且将其在-37℃下储存直至分析。

[1116] 染色方案。

步骤1.在室温下使细胞解冻。步骤2.添加Fc封闭剂(TruStain FcX™)。步骤3.在室温下孵育5分钟。步骤4.添加来自表16的以下抗体:

表16.人用抗体组。

	荧光团
CD4	BUV737
CD56	BV711
CD16	BV711
CD8	BUV805
CD27	BV786
CD45RA	BUV395
CD127	FITC
CD25	生物素

[1117] 步骤5.在室温下孵育20分钟。步骤6.用PBS+0.5%BSA将细胞洗涤两次。步骤7.通过添加10体积的甲醇至一体积的细胞中对细胞进行渗透化处理。步骤8.将细胞在4℃下孵育10分钟。步骤9.用PBS洗涤。步骤10.用含有0.5%BSA的PBS洗涤细胞。步骤11.添加Fc封闭剂(TruStain FcX™)。步骤12.添加来自表17的以下渗透化处理后染色组。

表17.染色试剂。

	荧光团

CD3	PE-Cy7
STAT5	Ax647
链霉亲和素	BV421
FOXP3	PE

[1118] 流式细胞术和数据分析。在具有五个激光器 (372nm、405nm、488nm、561nm和640nm) 的Becton Dickinson Fortessa和LSR II仪器上运行样品。仪器配备有20个检测器,包括散射参数。使用Becton Dickinson细胞计数器设定和跟踪珠定期校准仪器。使用96孔高通量采样器以低于8,000个细胞/秒运行含有染色样品的96孔板。

[1119] 将数据以.fcs文件输出至网络驱动器,并且补偿以解释荧光团的溢出,并且注释fcs文件。然后对fcs文件进行门控。首先使用FSC-A相对FSC-H针对单态对细胞进行门控,以排除任何聚集体或双态。在此门内,针对中至高前向散射 (FSC-A) 和侧向散射 (SSC-A) 对细胞进行门控,以排除红细胞、碎片和粒细胞。然后T细胞被门控为CD3⁺、CD56/16阴性群体,第3面板 (panel)。NK细胞被鉴定为CD3阴性、CD56/16高群体,第3面板。然后T细胞被分为CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞。然后Treg细胞被从CD4⁺ T细胞门控为CD25^{hi} x C127^{lo}群体。

[1120] 用于推导EC50值的统计数据和绘图。根据检测磷酸化的通道中的信号计算细胞群、供体和化合物处理中的每一种的中值荧光强度 (MFI)。使用Spotfire分析统计数据。在Spotfire内,针对化合物剂量在对数标度上以及针对MFI读数在线性标度上绘制数据。使用4参数逻辑回归方程来拟合这些数据。将EC50计算为曲线的拐点。

[1121] 结果。针对如上所述的三个单独供体中的每一个,一式三份地稀释并测试人IL-2和IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1样品。所计算的半最大有效浓度 (EC50) 值列于表19中。结果证明,IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1在来自人的淋巴细胞中是IL-2受体信号传导的强效激动剂。与表明IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1特异性接合IL-2R β 亚基而不特异性接合IL2R α 的先前体外结合研究一致,证明与不会组成型地表达高水平IL-2R α 的Teff和NK细胞相比,在对于效力依赖于IL-2R α 接合的Treg细胞中特异性地降低了信号传导效力。

表18.hIL-2和IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1批次针对来自人供体的原代CD8⁺ T细胞、NK细胞和Treg细胞亚群的效力特征。

材料	人细胞EC50 (ng/mL)				
	CD8 ⁺ T	记忆 CD8 ⁺ T	NK	Treg	CD8/Treg 比
人IL-2	12.4 ± 1.29	11.3 ± 1.63	2.88 ± 1.63	0.027 ± 0.005	460
第1批*	224 ± 25.3	240 ± 27.3	54.7 ± 6.55	114 ± 20.3	2.0
第2批*	265 ± 12.4	284 ± 18.3	55.7 ± 8.62	132 ± 24.0	2.0

数据是根据来自三个独立供体的样品的一式三份测试计算的平均值±平均值的标准误差 (SEM)。

*IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1。

实施例11

[1122] 在处理携带CT-26肿瘤的Balb/c小鼠中使用化合物A加检查点抑制剂。通过以下方式根据本文公开的方法制备化合物IL-2_P65[AzK_PEG30kD] (在本文中也称为“P65_30kD”,并且在附图中也称为“化合物A”) : 首先制备具有SEQ ID NO:4的蛋白质,其中位置65处的脯氨酸被N6-((2-叠氮基乙氧基)-羰基)-L-赖氨酸 (AzK) 替代 (SEQ ID NO:10)。然后允许含

AzK的蛋白质在点击化学条件下与包含具有30kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团的DBC0反应,以提供包含式(II)、式(III)或者式(II)和式(III)的混合物的具有SEQ ID NO: 25的产物,其中W是具有30kDa的平均分子量的甲氧基线性PEG基团。还可以将所述化合物定义为包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,其中位置65处的脯氨酸(P65)被式(VI)或式(VII)或者式(VI)和式(VII)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团具有约30kDa的分子量的整数。还可以将所述化合物定义为包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,其中位置65处的脯氨酸(P65)被式(X)或式(XI)或者式(X)和式(XI)的混合物的结构替代,并且其中n是使得PEG基团具有约30kDa的分子量的整数。

[1123] 在Balb/c雌性小鼠中进行化合物A作为单药疗法和与抗PD-1抗体的组合的研究。平均体重为16g至21g的6-8周龄的Balb/c雌性小鼠购自Jackson Laboratories (加利福尼亚州萨克拉门托)用于研究1和2。平均体重为18至22g的7-8周龄的Balb/c雌性小鼠购自HDBiosciences的Taconic Biosciences用于研究3。低温保存的CT-26结肠癌细胞的小瓶购自美国典型培养物保藏中心(American Tissue Type Collection, ATCC; 弗吉尼亚州马纳萨斯)。根据制造商的方案解冻并培养细胞。在肿瘤细胞接种的当天,将细胞在无血清培养基中洗涤,计数,并且以250,000 (研究1和2) 或300,000 (研究3) 个活细胞/0.1mL的浓度重悬于冷无血清培养基中。将CT-26细胞(0.1mL)皮下注射到单独小鼠的侧腹中,并且允许肿瘤生长。

[1124] 对于使用化合物A和抗PD-1抗体的组合的研究1和2,所使用的抗体是抗小鼠PD-1 (BioXcell; RMP1-14),并且对照抗体是IgG1同种型抗体(BioXcell; 目录号BP0089,批号2A3)。对于使用抗PD-1抗体的研究3,所使用的抗体是抗小鼠PD-1 (BioXcell; 目录号BP0146, RMP1-14, 批号695318A1),并且对照抗体是IgG1同种型抗体(BioXcell; 目录号BP0089,批号2A3)。

[1125] 将冻干的化合物A重构成含0.1M乙酸的10mg/mL原液。然后将其用1x磷酸盐缓冲盐水(PBS)进一步稀释到工作浓度。将所述化合物在向动物给药的一小时内重构并稀释,并且保持在冰上直至给药。在使用前将冻干的化合物储存在-80℃下。将媒介物储存在4℃下。

[1126] 使用携带CT-26肿瘤的Balb/c小鼠进行三项单独的药效研究。评价化合物A作为单一药剂的剂量依赖性药效的研究1的设计概述于表19中。评价化合物A与抗PD-1抗体的组合的疗效的研究2和3的设计分别概述于表20和表21中。化合物A的施途径是静脉内的(IV)。经由尾静脉进行小鼠的IV给药。腹腔内(IP)施用抗体。基于在每次给药前立即获得的每只动物的个体体重施用所有药剂。下文描述了有关给药方案的详情。

表19. 研究#1:在携带CT-26肿瘤的小鼠中的对照和测试处理组。

药剂	剂量 (mg/kg)	途径, 方案	小鼠数量
媒介物对照	0	IV, QWx3	10
化合物A	0.3	IV, QWx3	10
化合物A	0.3	IV, Q2Wx2	10
化合物A	1	IV, QWx3	10
化合物A	1	IV, Q2Wx2	10
化合物A	3	IV, QWx3	10
化合物A	3	IV, Q2Wx2	10

IV=静脉内;QWx3=每周一次,总共3剂;Q2Wx2=每2周一次,总共2剂。

表20. 研究#2:在携带CT-26肿瘤的小鼠中的对照和测试处理组。

药剂	剂量 (mg/kg)	途径, 方案	小鼠数量
媒介物对照 + IgG同种型对照	0 + 10	IV, QWx3 + IP, BIWx3	14
化合物A	3	IV, QWx3	14
化合物A	6	IV, QWx3	14
抗PD-1抗体	10	IP, BIWx3	14
化合物A + 抗PD-1抗体	6 + 10	IV, QWx3 + IP, BIWx3	14

BIWx3=每周两次持续3周,总共6剂;IP=腹膜内;IV=静脉内;QWx3=每周一次,总共3剂。

表21. 研究#3:在携带CT-26肿瘤的小鼠中的对照和测试处理组。

药剂	剂量 (mg/kg)	途径, 方案	小鼠数量
媒介物对照 + IgG同种型对照	0 + 10	IV, QWx3 + IP, BIWx3	14
化合物A	1	IV, QWx3	14
化合物A	3	IV, QWx3	14
化合物A	6	IV, QWx3	14
化合物A	9	IV, QWx3	14
抗PD-1抗体	10	IP, BIWx3	14
化合物A + 抗PD-1抗体	1 + 10	IV, QWx3 + IP, BIWx3	14
化合物A + 抗PD-1抗体	3 + 10	IV, QWx3 + IP, BIWx3	14
化合物A + 抗PD-1抗体	6 + 10	IV, QWx3 + IP, BIWx3	14

BIWx3=每周两次持续3周,总共6剂;IP=腹膜内;IV=静脉内;QWx3=每周一次,总共3剂;Q2Wx2=每2周一次,总共2剂。

[1127] 在研究1中,从肿瘤细胞接种后当平均肿瘤体积为约80mm³时的第4天开始,将携带CT-26肿瘤的小鼠用媒介物IV处理,每周一次总共3剂(QWx3);或者用0.3、1或3mg/kg IV的化合物A处理,每周一次总共三剂(QWx3)或每2周一次总共2剂(Q2Wx2)。

[1128] 在研究2中,在肿瘤细胞接种后当平均肿瘤体积为约80mm³时的第5天处理携带CT-26肿瘤的小鼠。给药媒介物IV QWx3+IgG同种型对照IP、或者3或6mg/kg IV的化合物A(按QWx3给药方案)、或10mg/kg IP的抗PD-1抗体、或6mg/kg IV QWx3的化合物A+10mg/kg IP的抗PD-1抗体的组合。在所有情况下抗体的IP给药都是每周两次持续3周,总共6剂(BIWx3)。

[1129] 在研究3中,在肿瘤细胞接种后当平均肿瘤体积为约70mm³时的第7天处理携带CT-26肿瘤的小鼠。给药媒介物IV QWx3+IgG同种型对照IP BIWx3;或者1、3、6或9mg/kg IV的化合物A(按QWx3给药方案),或10mg/kg IP BIWx3的抗PD-1抗体;或者1、3或6mg/kg IV QWx3的化合物A+10mg/kg IP BIWx3的抗PD-1抗体的组合。

[1130] 所有三项研究的总结示于表22中。每天观察动物的临床体征。根据IACUC指南,当肿瘤的体积生长超过2000mm³,或者观察到动物具有持续恶化的状况或显示出严重痛苦和/

或疼痛的明显迹象时,对它们人道地实施安乐死。

[1131] 监测每只小鼠的存活100天,在此时研究2和3中的存活的无肿瘤动物被包括在研究的再激发继续中,持续两个周期,间隔2个月。具体地,经由在相对的下侧腹接种相同类型的肿瘤细胞(CT-26)对无肿瘤的动物进行再激发。对照动物是在相对的下侧腹同时接种相同数量的CT-26肿瘤细胞的年龄匹配的幼稚小鼠。

[1132] 每3至4天使用数显卡尺测量来监测肿瘤生长直至研究结束。将肿瘤体积计算为宽度²x长度/2,其中宽度是最小的尺寸,并且长度是最大的尺寸。在研究报告中呈现了原始肿瘤体积数据。

[1133] 绘制每组随时间的平均肿瘤体积数据与平均值的标准误差(SEM)条。另外,绘制在动物处死前最后一天的个体肿瘤体积数据以及平均值和SEM条以检查数据的分布。

[1134] 使用GraphPad Prism v.7.0进行动物处死前最后一天的肿瘤体积数据的统计分析。使用单因素方差分析来分析数据的显著性。使用图基检验程序(双侧)进行成对比较。报告每次单独比较的p值。

[1135] 将相比于对照组每个处理组中的肿瘤生长抑制百分比(%TGI)计算为:

$$[(\text{对照}-\text{对照基线})-(\text{处理}-\text{处理基线})]/(\text{对照}-\text{对照基线}) \times 100\%$$

[1136] 记录每只小鼠的存活,并且生成卡普兰-迈耶图以显示按处理组的存活,并且通过对数秩(Mantel-Cox)检验评估显著性。在研究#1、#2和#3中,在处理开始后监测存活100天;并且在研究#2和#3中的存活的无肿瘤小鼠中监测存活两个再激发周期。使用GraphPad Prism版本7.0进行分析。

表22.在用化合物A作为单药疗法和与抗小鼠PD-1抗体的组合的小鼠中的肿瘤生长抑制。

	化合物A剂量 [抗体剂量 ^a] (mg/kg)	% TGI (相对于媒介物对照)			
		研究#1		研究#2	研究#3
		QWx3	Q2Wx2	QWx3	QWx3
化合物A 单药疗法	0.3	19	20	-	-
	1	31	27	-	30
	3	51*	45*	56	59***
	6	-	-	36*	86***
	9	-	-	-	85***
	抗体[10]	-	-	44 [#]	44 [#]
组合疗法 ^b	6 + [10]	-	-	75**	84**

^a以BIW给药持续3周(总共6剂);^b未显示1和3mg/kg化合物A组合组的数据。
在第15天(研究1)和第17天(研究2和3)计算%TGI。
结果是平均值±SEM。

[1137] QWx3=每周一次,总共3剂;Q2Wx2=每2周一次,总共2剂;TGI=肿瘤生长抑制。*p<0.05,相比于媒介物对照;**p<0.05,相比于单药疗法(化合物A或抗体);***p<0.001,相比于媒介物或抗体同种型对照;[#]p<0.01,相比于抗体同种型对照。

[1138] 在研究1中,在携带皮下建立的CT-26结肠肿瘤的雌性Ba1b/c小鼠中评价化合物A作为单一药剂的剂量依赖性功效。根据由IACUC阐明的人道终点,在当对照组中的几个肿瘤的体积达到超过2000mm³时的处理开始后第15天研究正式结束。图1示出了以QWx3给药化合物A处理的组随时间的平均肿瘤体积。图2示出了以QWx3给药化合物A处理的每只动物的处

理后第15天的肿瘤体积。图3示出了以Q2Wx2给药化合物A处理的组随时间的平均肿瘤体积。图4示出了以Q2Wx2给药化合物A的每只动物的处理后第15天的肿瘤体积。

[1139] 按QWx3给药方案,化合物A展示出剂量依赖性单一药剂抗肿瘤活性,导致0.3、1和3mg/kg剂量组与媒介物对照相比的%TGI分别为31%、19%和52%。类似地,按Q2Wx2给药方案,化合物A展示出剂量依赖性单一药剂抗肿瘤活性,导致0.3、1和3mg/kg剂量组与媒介物对照相比的%TGI分别为20%、27%和45%。然而,按两种给药方案,只有3mg/kg剂量与媒介物对照相比是统计上显著的($p < 0.05$)。两种给药方案展示出相当的抗肿瘤活性。因此,对于在此小鼠模型中的后续研究,选择QWx3给药方案。

[1140] 在图1、图3、图5和图8中,黑色箭头表示化合物A给药的天数。图1和图3中的数据是以QWx3给药化合物A和以Q2Wx2给药化合物A的平均肿瘤生长曲线;黑色箭头表示化合物A给药的天数。图2和图4中的数据表示在以QWx3和Q2Wx2给药化合物A处理后第15天的个体肿瘤体积和平均肿瘤体积 $\pm$ 平均值的标准误差(SEM)(10只小鼠/组)。数据表示个体肿瘤体积;还示出了与媒介物对照相比的平均值 $\pm$ SEM和%TGI。

[1141] 图3中的数据表示在以Q2Wx2给药化合物A的动物中的平均肿瘤体积 $\pm$ 平均值的标准误差(SEM)(10只小鼠/组)。图4中的数据表示在以Q2Wx2给药化合物A处理后第15天的个体和平均肿瘤体积数据。 $*p < 0.05$,相比于媒介物对照,第15天。

[1142] 在携带CT-26结肠肿瘤的小鼠中进行了两项单独的研究(研究2和3),以评估作为单一药剂和与鼠抗PD-1检查点抑制剂抗体的组合的化合物A。在研究之间化合物A的剂量范围有重叠,研究3具有更宽的剂量范围。在两项研究中,以QWx3施用化合物A,并且以BIWx3施用相同剂量水平的抗体。

[1143] 在研究2中,在携带皮下建立的CT-26结肠肿瘤的雌性Balb/c小鼠中评价化合物A作为单一药剂在3和6mg/kg(QWx3)下的抗肿瘤活性。另外,评价在IV给药化合物A(6mg/kg)(QWx3)和抗PD-1抗体(10mg/kg IP)(BIWx3)的情况下的组合抗肿瘤活性。在处理开始后第15天计算%TGI,因为媒介物对照组中的几个肿瘤的体积达到超过2000mm³。然而,以每周一次或两次的频率跟踪处理组中展示出完全肿瘤消退的动物的肿瘤测量。

[1144] 化合物A展示出单一药剂抗肿瘤活性,导致3和6mg/kg剂量组与媒介物对照相比的%TGI分别为56.3%和35.6%。在组合研究中,从肿瘤细胞接种后当平均肿瘤体积为约80mm³时的5天开始,将携带CT-26肿瘤的小鼠用化合物A 6mg/kg QWx3 IV处理或用抗PD-1抗体BIWx3 IP处理,或者以相同的给药方案用组合处理。用媒介物、作为单一药剂的6mg/kg化合物A、作为单一药剂的抗PD-1抗体以及6mg/kg化合物A和抗PD-1抗体的组合处理小鼠的平均肿瘤生长曲线示于图5中。图5中的数据表示平均肿瘤体积 $\pm$ SEM(14只小鼠/组)。上面的箭头表示化合物A给药的天数,并且下面的箭头表示抗PD-1抗体给药的天数。与单独的化合物A或抗PD-1抗体相比,组合抗肿瘤活性显著增强($p < 0.05$)。%TGI数据示于图6中,并且与用媒介物、单独的化合物A或单独的抗PD-1抗体处理的组相比,在用化合物A和抗PD-1抗体的组合处理的组中在处理第15天显示出显著的抗肿瘤作用(单独的化合物组为35.6%;单独的抗PD-1抗体组为44.1%;并且施用化合物A和抗PD-1抗体的组合的组为74.6%)。数据表示个体肿瘤体积;还示出了与媒介物对照相比的平均值 $\pm$ SEM和%TGI。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$,并且 $***p < 0.01$;相比于媒介物对照。 $^{\dagger}p < 0.05$,相比于抗PD-1抗体。 $\#p < 0.05$,相比于化合物A。各组的中值存活时间示于图7中,并且对照、化合物A、抗PD-1抗体和

化合物A+抗PD-1抗体组分别为17、27、27.5和38天。组合组的中值存活时间显著长于化合物A ($p<0.05$) 和抗PD-1抗体 ($p<0.05$) 单一药剂处理组二者。在处理98天,化合物A和抗PD-1抗体剂量组中的每一个中14只动物中只有1只(7%)无肿瘤地存活,而组合组中14只动物中有4只(29%)无肿瘤地存活。图7中的数据表示处理组的卡普兰-迈耶存活曲线。 $*p<0.05$,相比于媒介物对照。 $^{\dagger}p<0.05$,相比于抗PD-1抗体。 $\#p<0.05$,相比于化合物A。

[1145] 在研究3中,与按相同IV QWx3给药方案的研究2相比,在携带SC CT-26结肠肿瘤的雌性Balb/c中在更宽的剂量范围(1、3、6和9mg/kg)下评价化合物A的单一药剂抗肿瘤活性。图8中的数据表示当化合物A以1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg和9mg/kg作为单一药剂给药时的平均肿瘤生长曲线。数据表示平均肿瘤体积 $\pm$ SEM(14只小鼠/组;除了9mg/kg化合物A为12只小鼠/组)。黑色箭头表示化合物A给药的天数。以1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg和9mg/kg单独给药的化合物A也展示出剂量依赖性抗肿瘤活性,导致1、3、6和9mg/kg剂量组与媒介物对照相比的%TGI分别为29.8%、58.8%、86.2%和84.8%(图9)。在处理开始后第15天计算%TGI,因为媒介物对照组中的几个肿瘤达到超过2000mm³。然而,以每周一次或两次的频率跟踪处理组中展示出完全肿瘤消退的动物的肿瘤测量。图9中的数据表示处理后第15天的个体肿瘤体积。数据表示个体肿瘤体积;还示出了与媒介物对照相比的平均值 $\pm$ SEM和%TGI。 $***p<0.01$,相比于媒介物对照。最低剂量(1mg/kg)没有显示出统计上显著的抗肿瘤活性,而其他3个剂量组与媒介物处理组相比是统计上显著的($p<0.001$)。数据还表明,两个高剂量组(6mg/kg和9mg/kg)的%TGI是类似的,表明在6mg/kg剂量下达到最大抗肿瘤活性。在9mg/kg剂量组中,发现14只动物中有2只在由于处理引起的体重减轻 $>15\%$ 后死亡。

[1146] 在研究的组合阶段,将1、3或6mg/kg(QWx3)的化合物A与10mg/kg IP(BIWx3)的抗PD-1抗体一起给药。从肿瘤细胞接种后当平均肿瘤体积为约70mm³时的7天开始,将携带CT-26肿瘤的小鼠用化合物A1、3、6或9mg/kg QWx3 IV处理或用抗PD-1抗体BIWx3 IP处理,或者以相同的给药方案用组合处理。注意,对于9mg/kg化合物A单一药剂组,发现两只动物在体重减轻 $>15\%$ 后死亡,并且不包括在分析中。在1mg/kg化合物A+抗PD-1抗体的组合的情况下,基于存活数据没有观察到加性抗肿瘤活性。在处理98天后化合物A天数,抗PD-1抗体组中14只动物中有1只(7%)存活,而3mg/kg单一药剂组中0只动物存活。然而,在3mg/kg化合物A+抗PD-1抗体组中,14只动物中有2只(14%)存活直至化合物A天数。如图10所示,6mg/kg化合物A+抗PD-1抗体的组合导致与单独的每种单一药剂相比延长的存活。媒介物对照、化合物A(6mg/kg)、抗PD-1抗体(10mg/kg)和化合物A+抗PD-1抗体组(6mg/kg化合物A和10mg/kg抗PD-1抗体)的中值存活时间分别为21、35、24.5和49天。组合组的中值存活时间显著长于化合物A和抗PD-1抗体单一药剂处理组二者($p<0.05$)。具体地,在处理98天后化合物A天数,6mg/kg化合物A组中0只动物存活,而抗PD-1抗体组中14只动物中只有1只(7%)无肿瘤地存活。然而,在组合组中,14只动物中有5只动物(36%)无肿瘤地存活($p<0.05$)。图10中的数据表示处理组的卡普兰-迈耶存活曲线。 $*p<0.05$,相比于媒介物对照。 $^{\dagger}p<0.05$,相比于抗PD-1抗体。 $\#p<0.05$,相比于化合物A。

实施例12

[1147] 全血细胞因子释放测定

[1148] 将来自6个健康供体的人全血样品与单独的IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1(化合物B)或IL-2或者与PEM(“Pembro”或派姆单抗)或NIVO(纳武单抗)的系列滴定液一起孵育

24h。使用Meso Scale Discovery (MSD) U-plex试剂盒针对六种分析物 (IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、TNF- α) 测量在处理后将全血释放到上清液中的细胞因子。

方案。

[1149] 肝素管中的来自6个健康供体的血液获自The Scripps Research Institute (TSRI;加利福尼亚州圣地亚哥) 献血服务中心。在收集当天测试样品;供体1-3在一天,并且供体4-6在另一天。

[1150] 将人全血与各种浓度的IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1和90 μ g/mL派姆单抗或127 μ g/mL纳武单抗(临床剂量的预期C_{max}值)一起孵育。

[1151] 首先用RPMI 1640培养基将全血稀释2倍。将体积为180 μ L的预稀释全血接种到96孔组织培养板上。然后,将20 μ L的10x最终测试浓度的化合物添加至测定板中。测试条件包括IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1 (4.5 μ g/mL、1.5 μ g/mL、0.8 μ g/mL、0.45 μ g/mL和0.2 μ g/mL) 或IL-2 (0.8 μ g/mL、0.45 μ g/mL、0.2 μ g/mL、0.1 μ g/mL和0.03 μ g/mL) 的系列滴定液以及IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1或IL-2加90 μ g/mL PEM或127 μ g/mL NIVO的系列滴定液。另外,包括阳性和阴性对照以显示测定的检测和规格:将100 μ g/mL预包被的Ultra LEAF小鼠抗人CD3用作测定的阳性对照。50 μ g/mL预包被的Ultra LEAF小鼠IgG1, κ 是上述抗人CD3的同种型对照。仅IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1配制缓冲液是测定的阴性对照。无处理也用作测定的阴性对照。

[1152] 在将一种或多种化合物添加至孔中后,将血液在37 $^{\circ}$ C下孵育。在将样品离心后,在处理24h收集上清液,并且在分析前将其储存在-80 $^{\circ}$ C下。用MSD U-plex试剂盒定量从测定中释放的人细胞因子 (IFN- γ 、TNF- α 、IL-8、IL-6、IL-5、IL-4)。测定的最低检测限列于下表中。根据MSD软件Discovery workbench报告每个板的检测限。每个板具有略微不同的检测限。

材料

表23.所使用的材料和来源。

材料	供应商	目录号	配方	原液
IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1 先导 (Pilot) 2 #0590-164	Cytovance	N/A	配制缓冲液	2.18 mg/mL

配制缓冲液：10 mM组氨酸 (pH 6.0)、5%山梨醇、0.01%聚山梨醇酯80	Cytovance	N/A	N/A	N/A
IL-2	R&D Systems	202-IL-500	0.1 M乙酸	1 mg/mL
Biolegend Ultra-LEAF™纯化的抗人CD3 (UCHT1)	Biolegend	300438	PBS	1 mg/mL
Biolegend Ultra-LEAF™纯化的小鼠 IgG1, κ 同种型对照 (MOPC-21)	Biolegend	400166	PBS	1 mg/mL
派姆单抗 (PEM)	Selleckchem	A200502	PBS	9.97 mg/mL
Ultra-LEAF™纯化的人IgG4同种型对照重组抗体	Biolegend	403702	PBS	1 mg/mL
U-plex 生物标记物组 1 (人 IFN-γ、TNF-α、IL-10、IL-6、IL-4、IL-5)	Meso Scale Discovery (MSD)	K15067L-2	N/A	N/A
Gibco™ RPMI 1640培养基, HEPES	Gibco™	22400089		
Falcon™聚苯乙烯微量板, 96孔, TC处理的	Corning	353072		

结果。

[1153] 在24h处理时, IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1和IL-2诱导了IFN-γ的剂量依赖性诱导, 但是没有诱导在测定中测试的其他5种细胞因子 (IL4、IL5、IL8、TNFα、IL6) 的显著释放。与Pem或Nivo组合, IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1和IL-2 (R&D) 二者都没有导致在研究中测试的细胞因子谱 (IFN-γ、IL-4、IL-5、IL-8、TNF-α、IL-6) 的显著变化。个体供体的数据列于表24-表32中。单个供体的代表性图示于图11A-图11B中。

表24. IFN- γ 和IL-6水平的控制条件。

处理	浓度 ug/ml	IFN- γ						IL-6					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
化合物B配 制缓冲液	n/a	43.91	8.77	7.75	9.31	268.77	13.03	2.77	0.68	1.31	0.49	5.60	0.73
无处理 (培养基)	n/a	21.58	5.12	8.35	7.03	288.70	11.78	0.93	0.31	0.99	2.23	4.53	1.28
IgG4同种型 对照	50	33.42	29.17	7.86	12.79	262.93	10.33	4.73	0.47	1.50	0.56	8.54	21.30
小鼠IgG1, κ	100	21.75	BDL	7.19	6.44	94.74	132.02	1.64	0.88	0.89	0.71	4.27	1.85
PEM	90	52.78	9.62	8.80	11.71	301.71	10.08	1.09	0.39	0.92	0.65	8.95	1.06
NIVO	127	29.77	9.34	6.61	7.56	256.75	9.51	1.28	0.48	1.09	0.59	3.29	0.62
包被的抗 CD3	100	13095.85	110278.12	2890.41	12415.49	46221.98	137695.00	279.20	106.57	20.18	66.79	452.34	1414.77

BDL = 低于检测限。

表25. IL-5和IL-8水平的控制条件。

处理	浓度 ug/ml	IL-8						TNF- α					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
化合物B配 制缓冲液	n/a	48.07	8.77	39.07	39.28	143.62	30.69	4.17	0.68	1.2	1	5.82	1.04
无处理 (培养基)	n/a	20.56	8.77	7.84	27.93	78.91	23.45	3.03	0.68	1.24	1.11	5.61	1.25

IgG4同种型对照	50	37.11	12.77	9.58	24.88	91.61	BDL	2.66	1.33	1.82	0.75	6.58	0.91
小鼠IgG1,κ	100	20.37	7.42	7.92	22.37	57.12	24.8	1.42	0.27	0.14	0.69	3.44	BDL
PEM	90	22.01	8.48	11.36	23.29	95.5	28.32	2.33	0.68	1.67	0.97	5.88	1.43
NIVO	127	20.59	7.68	7.95	22.61	67.38	19.68	2.35	0.44	1.33	1.21	4.89	BDL
包被的抗CD3	100	5211.87	1780.7	1346.96	4031.78	5306.3	10117.33	475.92	2519.34	136.1	894.5	1187.77	3780.63

BDL = 低于检测限。

表26. TNF-α和IL-4水平的控制条件。

处理	浓度 ug/ml	IL-5						IL-4					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
化合物B配制缓冲液	n/a	0.71	0.06	0.59	BDL	BDL	BDL	0.05	0.06	0.08	0.09	BDL	BDL
无处理(培养基)	n/a	0.81	0.14	0.87	BDL	BDL	BDL	0.11	0.06	0.11	0.05	BDL	BDL
IgG4同种型对照	50	0.26	0.23	0.64	BDL	0.77	BDL	0.05	0.12	BDL	0.12	BDL	BDL
小鼠IgG1,κ	100	0.66	0.09	0.56	BDL	BDL	BDL	0.04	0.14	0.16	BDL	BDL	0.09
PEM	90	1.03	0.72	0.79	BDL	BDL	BDL	0.10	0.03	0.03	0.09	BDL	BDL
NIVO	127	2.65	1.50	0.91	BDL	BDL	BDL	0.11	0.11	0.05	0.10	BDL	BDL
包被的抗CD3	100	34.49	308.57	7.64	31.81	137.92	656.77	11.33	47.81	1.33	11.65	18.59	82.57

BDL = 低于检测限。

表27. 用IL-2处理对IFN-γ和IL-6水平的影响。

处理	浓度 μg/ml	IFN-γ						IL-6					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
IL-2	0.8	115.31	290.42	314.96	81.72	61.31	850.98	22.76	17.26	10.13	19.67	17.12	51.15
IL-2	0.45	105.72	352.81	331.98	85.34	58.16	433.00	18.47	11.07	7.20	12.82	18.02	65.04
IL-2	0.2	104.20	228.19	278.17	104.40	51.97	437.67	15.93	5.48	4.12	6.96	12.56	49.09
IL-2	0.1	95.61	135.05	224.27	68.31	47.44	387.76	13.48	2.66	2.73	4.02	10.94	28.98
IL-2	0.03	64.49	62.13	81.74	45.09	39.50	170.85	7.89	1.07	1.35	2.31	9.18	16.60
IL-2 + Pembro	0.8	138.79	274.43	318.86	117.65	51.99	437.11	27.72	17.63	10.91	22.39	32.49	50.58
IL-2 + Pembro	0.45	107.58	247.26	354.82	111.66	55.99	430.47	23.19	11.71	7.45	31.52	15.11	55.85
IL-2 + Pembro	0.2	112.00	231.40	283.69	76.41	64.28	244.58	20.84	6.54	4.93	7.65	14.72	29.07
IL-2 + Pembro	0.1	99.87	151.13	241.42	106.24	50.17	274.30	16.91	3.10	3.44	13.06	13.48	28.87
IL-2 + Pembro	0.03	76.19	44.44	87.79	40.85	38.04	131.98	11.01	1.46	1.47	2.10	9.98	15.04
IL-2 + Nivo	0.8	112.83	245.07	396.28	67.50	53.02	344.33	24.21	17.31	12.10	19.46	16.29	50.22

IL-2 + Nivo	0.45	98.79	262.60	335.91	66.15	47.95	457.22	17.85	13.65	7.85	11.72	13.01	40.96
IL-2 + Nivo	0.2	101.09	204.58	260.76	59.56	46.18	238.28	17.54	6.37	4.23	6.38	13.08	30.47
IL-2 + Nivo	0.1	100.69	423.63	230.39	92.71	37.74	206.75	2.71	3.10	3.98	9.98	9.74	20.84
IL-2 + Nivo	0.03	72.59	40.13	76.36	nd	38.22	49.74	8.23	1.22	1.44	29.61	8.51	14.21

通过其比配制缓冲液值归一化每个供体（例如，D1-D6）的数据。nd = 未确定。

表28. 用IL-2处理对IL-8和IFN-α水平的影响。

处理	浓度 μg/ml	IL-8						TNF-α					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
IL-2	0.8	5.88	6.00	4.53	2.28	5.80	25.94	5.97	14.38	13.84	4.88	16.45	24.31
IL-2	0.45	4.67	5.98	4.98	2.02	5.32	36.29	5.04	14.83	13.27	4.48	16.22	37.41
IL-2	0.2	4.34	5.42	4.01	1.88	4.89	27.24	5.10	12.68	11.74	4.18	15.14	26.06
IL-2	0.1	3.80	5.00	3.76	1.60	4.44	17.45	4.60	11.07	10.68	3.16	12.89	16.94
IL-2	0.03	2.70	2.50	1.42	1.38	3.95	11.11	3.52	3.88	4.45	2.55	10.86	12.96
IL-2 + Pembro	0.8	7.00	6.95	4.83	2.97	7.84	24.43	6.02	17.35	13.48	6.42	16.66	23.88
IL-2 + Pembro	0.45	5.77	6.41	4.43	3.71	5.86	27.94	5.46	17.44	12.60	6.33	15.51	25.44
IL-2 + Pembro	0.2	5.37	6.73	3.59	2.24	6.01	15.52	5.20	15.55	11.03	3.54	15.96	17.18
IL-2 + Pembro	0.1	5.39	4.85	3.08	2.73	5.47	18.57	4.85	11.49	10.45	5.06	13.80	16.99
IL-2 + Pembro	0.03	3.60	2.28	1.52	1.65	4.72	8.60	4.24	4.94	4.19	2.82	11.29	8.91

IL-2 + Nivo	0.8	6.66	6.26	4.31	2.02	6.22	26.11	5.71	17.11	13.39	4.52	14.18	26.91
IL-2 + Nivo	0.45	5.06	6.42	4.04	1.80	5.28	22.75	5.35	15.39	12.10	4.61	13.60	22.81
IL-2 + Nivo	0.2	4.09	4.96	3.16	1.49	4.82	19.00	4.97	11.83	9.17	3.23	12.57	17.17
IL-2 + Nivo	0.1	3.80	4.31	2.97	3.04	5.09	12.19	4.33	10.74	7.90	5.14	11.43	11.44
IL-2 + Nivo	0.03	2.28	1.88	1.03	2.86	3.65	8.55	3.35	4.04	3.60	5.41	10.15	9.42

通过其比配制缓冲液值归一化每个供体（例如，D1-D6）的数据。

表 29. 用IL-2处理对IL-5和IL-4水平的影响。

处理	浓度 µg/ml	IL-5						IL-4					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
IL-2	0.8	9.45	6.04	4.34	0.71	10.86	22.27	0.25	0.21	0.21	0.13	0.85	1.02
IL-2	0.45	10.57	11.00	5.85	BDL	15.40	22.08	0.14	0.34	0.32	0.08	0.68	0.89
IL-2	0.2	14.53	8.79	3.46	0.93	12.29	28.22	0.30	0.42	0.28	0.10	0.77	1.05
IL-2	0.1	5.24	6.79	3.85	0.26	9.57	23.02	0.21	0.32	0.14	0.09	0.75	0.83
IL-2	0.03	7.56	3.73	1.35	0.66	22.70	13.05	0.27	0.18	0.15	0.14	0.74	0.52
IL-2 + Pembro	0.8	5.62	8.14	4.45	1.55	14.17	24.07	0.24	0.35	0.33	0.28	0.78	1.15
IL-2 + Pembro	0.45	4.54	7.16	3.00	0.93	9.82	21.83	0.16	0.39	0.27	0.26	0.70	1.20
IL-2 + Pembro	0.2	8.95	11.58	6.50	0.56	12.53	15.88	0.31	0.31	0.47	0.12	0.82	0.76
IL-2 + Pembro	0.1	7.42	7.03	1.90	BDL	8.53	23.41	0.21	0.27	0.36	0.12	0.64	0.76
IL-2 + Pembro	0.03	5.87	2.86	2.05	0.42	14.25	8.53	0.17	BDL	0.13	0.08	0.82	0.51
IL-2 + Nivo	0.8	7.16	7.98	4.18	1.38	20.46	20.83	0.22	0.25	0.44	0.14	1.00	1.21
IL-2 + Nivo	0.45	7.14	7.05	4.22	BDL	11.55	18.52	0.21	0.31	0.28	0.17	0.54	0.88

IL-2 + Nivo	0.2	7.32	7.45	4.18	1.97	12.97	20.73	0.21	0.34	0.30	0.25	0.74	0.75
IL-2 + Nivo	0.1	8.67	5.37	3.43	3.04	10.46	16.09	0.26	0.21	0.18	0.14	0.61	0.62
IL-2 + Nivo	0.03	3.77	2.02	1.37	BDL	11.82	12.10	0.17	BDL	0.11	0.19	0.74	0.63

BDL = 低于检测限。

表30. 用化合物B (IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1) 处理对IFN-γ和IL-6水平的影响。

处理	浓度 (μg/ml)	IFN-γ						IL-6					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
化合物B	4.5	213.24	135.44	233.77	75.99	36.04	611.22	39.77	0.56	2.49	4.94	10.61	38.95
化合物B	1.5	93.02	96.56	195.89	49.83	31	122.98	11.82	0.84	1.82	1.87	8.33	16.01
化合物B	0.8	66.82	53.46	119.28	44.78	26.93	92.69	9.38	0.43	1.45	1.71	7.56	11.61
化合物B	0.45	49.07	35.17	85.18	33.58	21.99	74.08	7.87	0.74	1.06	1.29	6.06	3.41
化合物B	0.2	32.02	12.82	32.15	27.63	14.39	21.95	4.50	BDL	0.91	1.11	3.84	1.09
化合物B + Pembro	4.5	102.42	164.69	263.89	68.16	38.09	275.34	15.12	1.79	3.26	3.03	10.86	36.39
化合物B + Pembro	1.5	80.56	82.28	161.63	49.21	35.01	98.36	11.90	1.29	1.96	3.01	11.07	9.88
化合物B + Pembro	0.8	74.09	43.39	130.28	38.2	29.55	62.73	12.28	0.82	1.71	1.31	9.23	6.49
化合物B + Pembro	0.45	46.77	27.81	86.44	31.51	19.78	37.93	7.53	0.46	1.17	1.52	6.70	1.78
化合物B + Pembro	0.2	29.43	8.62	25.97	20.27	14.52	17.75	5.59	BDL	0.74	0.93	5.04	0.86

化合物B + Nivo	4.5	91.59	126.64	269.98	59.66	38.57	901.52	11.56	1.33	4.23	2.83	9.24	34.57
化合物B + Nivo	1.5	82.94	71.26	185.79	50.31	30.37	210.47	10.75	1.04	1.97	1.40	7.14	11.44
化合物B + Nivo	0.8	59.41	67.83	124.17	30.37	24.23	41.88	7.60	7.56	1.56	0.87	6.38	2.36
化合物B + Nivo	0.45	51.93	21.19	84.35	26.44	18.76	30.17	7.73	0.48	1.17	1.33	4.39	2.01
化合物B + Nivo	0.2	32.55	7	25.07	16.26	12.1	18.32	4.57	BDL	0.71	1.06	2.59	0.84

“化合物B”是IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1。通过其比配制缓冲液值归一化每个供体（例如，D1-D6）的数据。BDL = 低于检测限。

表31. 用化合物B (IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1) 处理对IL-8和TNF-α水平的影响。

处理	浓度 (µg/ml)	IL-8						TNF-α					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
化合物B	4.5	7.67	4.09	2.99	2.18	4.24	20.12	6.23	11.39	10.42	4.96	12.33	26.03
化合物B	1.5	2.83	3.87	3.09	1.66	3.64	11.46	4.43	8.33	8.80	3.30	10.85	13.94
化合物B	0.8	3.08	2.86	2.20	1.36	3.30	6.84	4.16	6.48	6.68	2.92	9.94	8.02
化合物B	0.45	2.21	2.61	1.43	1.42	2.69	3.50	3.56	5.28	4.56	3.12	8.20	5.30
化合物B	0.2	1.48	1.60	0.71	1.27	2.22	1.30	2.64	3.10	2.84	2.24	6.23	2.00
化合物B + Pembro	4.5	4.19	4.64	2.61	2.13	4.65	21.72	5.10	11.12	8.91	4.49	12.42	20.50

化合物B + Pembro	1.5	4.10	3.46	2.79	2.66	4.45	15.57	4.87	8.68	8.24	3.80	12.07	15.39
化合物B + Pembro	0.8	3.36	2.80	2.10	1.53	4.13	5.51	4.41	6.88	6.21	3.15	10.56	6.04
化合物B + Pembro	0.45	2.35	2.19	1.58	1.69	3.21	2.09	3.51	4.09	4.89	2.52	8.33	3.46
化合物B + Pembro	0.2	1.66	1.41	0.62	1.20	2.46	1.23	2.97	2.59	2.41	2.69	6.18	2.09
化合物B + Nivo	4.5	3.97	4.16	3.22	1.63	4.05	16.97	5.36	9.71	9.57	3.83	12.26	21.81
化合物B + Nivo	1.5	2.86	2.62	2.16	1.42	3.70	6.78	4.84	6.45	7.11	3.15	10.53	9.76
化合物B + Nivo	0.8	2.97	2.55	1.97	1.19	3.56	1.99	3.95	5.33	5.87	2.87	8.88	3.17
化合物B + Nivo	0.45	2.15	1.72	1.19	1.10	2.53	2.05	3.66	3.88	3.94	2.86	7.22	3.38
化合物B + Nivo	0.2	1.45	1.30	0.59	0.91	1.86	0.90	2.67	2.35	2.21	1.88	4.85	2.31

“化合物B”是IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1。通过其比配制缓冲液归一化每个供体（例如，D1-D6）的数据。

表32. 用化合物B（IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1）处理对IL-5和IL-4水平的影响。

处理	浓度 (µg/ml)	IL-5						IL-4					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6

化合物B	4.5	6.39	6.87	1.39	0.91	8.54	31.80	0.18	0.12	0.18	0.21	0.44	1.07
化合物B	1.5	3.73	5.22	1.57	1.02	8.15	12.23	0.20	0.13	0.16	0.14	0.60	0.43
化合物B	0.8	8.67	2.03	1.51	BDL	3.16	4.73	0.20	BDL	BDL	0.06	0.20	0.25
化合物B	0.45	3.63	1.17	1.03	BDL	1.26	5.18	0.08	0.14	0.10	0.11	0.29	0.25
化合物B	0.2	0.66	BDL	BDL	BDL	0.31	0.27	0.10	0.08	0.12	0.07	0.04	BDL
化合物B + Pembro	4.5	7.22	8.02	2.77	0.74	9.13	27.48	0.26	0.30	0.20	0.14	0.59	1.10
化合物B + Pembro	1.5	3.91	4.10	1.36	BDL	7.45	5.54	0.21	0.13	0.16	0.09	0.59	0.41
化合物B + Pembro	0.8	4.74	6.45	0.92	BDL	5.71	2.69	0.18	0.10	0.11	0.11	0.48	0.15
化合物B + Pembro	0.45	2.54	0.59	0.82	BDL	2.69	BDL	0.17	0.08	BDL	0.07	0.30	0.08
化合物B + Pembro	0.2	0.84	BDL	0.71	BDL	0.33	0.35	0.14	BDL	BDL	0.09	0.03	BDL
化合物B + Nivo	4.5	4.76	5.65	3.54	0.20	9.21	20.27	0.23	0.27	0.24	0.15	0.74	1.00
化合物B + Nivo	1.5	3.66	2.11	1.41	0.36	9.57	5.42	0.20	0.09	0.17	0.16	0.69	0.30
化合物B + Nivo	0.8	3.20	BDL	0.90	BDL	3.96	1.10	0.21	BDL	0.14	0.09	0.34	0.07
化合物B + Nivo	0.45	5.11	BDL	1.03	0.11	2.08	1.06	0.16	BDL	0.13	0.08	0.20	0.07
化合物B + Nivo	0.2	2.83	0.60	0.73	BDL	1.97	BDL	0.10	0.14	BDL	0.05	0.07	BDL

“化合物B”是IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1。BDL = 低于检测限。

实施例13

[1154] 同种异体人混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定

[1155] 使用同种异体人混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定来评价化合物B (IL-2_P65[AzK_L1_PEG30kD]-1) 作为单一药剂和与检查点抑制剂 (纳武单抗或派姆单抗) 的组合的增强TCR激活的能力, 作为对呈递特异性抗原或新抗原的肿瘤细胞的细胞溶解反应的模型。

表33. 材料。

材料	供应商	目录号	配方	原液浓度
化合物B (IL-2_P65[AzK_L1_PEG3 0kD]-1)	Synthorx	批号0590-187	配制缓冲液 (参见下文)	2 mg/mL
配制缓冲液: 10 mM组氨酸 (pH 6.0)、5%山梨醇、 0.01%聚山梨醇酯80	Cytovance	N/A	N/A	N/A
纳武单抗 (nivo)	Selleckchem	A2002	PBS	5 mg/mL
纳武单抗	Bristol-Meyers Squibb	NDC 0003-3772-11	N/A	10mg/mL
派姆单抗	Merck & Co.	NDC 0006-3026-01	N/A	25mg/mL
Ultra-LEAF™纯化的人 IgG4同种型对照重组抗体	Biolegend	403702	PBS	1 mg/mL
EasySep人CD4+ T细胞分离 试剂盒	Stemcell	17952	N/A	N/A
EasySep人单核细胞分离试 剂盒	Stemcell	19359	N/A	N/A
人IFN-γ ELISA试剂盒	Abcam	Ab46025	N/A	N/A

表34. 材料, 续。

成分	供应商	目录号	原液浓度	工作浓度
MonoDC转分化培养基				
BioWhittaker X-VIVO15无 血清造血培养基	Lonza	04418Q	N/A	N/A
FBS	Corning	35011CV	100%	5%
青霉素-链霉素	Fisher Scientific	15140122	100%	1%
MEM非必需氨基酸溶液	Gibco	11140-050	100x	1x
丙酮酸钠	Gibco	11360-070	100 mM	1 mM
HEPES	Gibco	15630080	1 M	10 mM
重组人IL-4蛋白 (/CF)	R&D	204-IL-050	1.5e+6 IU/mL	1500 IU/mL
重组人GM-CSF蛋白 (/CF)	R&D	215-GM-050	1.5e+6 IU/mL	1500 IU/mL
MLR共培养基				
RPMI 1640培养基, HEPES	Gibco	22400089	N/A	N/A
FBS	Corning	35011CV	100%	5%
青霉素-链霉素	Fisher Scientific	15140122	100%	1%
MEM非必需氨基酸溶液	Gibco	11140-050	100x	1x
丙酮酸钠	Gibco	11360-070	100 mM	1 mM
HEPES	Gibco	15630080	1 M	10 mM
2-巯基乙醇	Gibco	21985023	50 mM	50 μM

[1156] 对于每次测定运行, 使用来自两个正常的健康供体的外周血单个核细胞 (PBMC)。通过将使用单核细胞负选择试剂盒 (Stemcell) 从PBMC中分离的单核细胞在体外培养7天 (涉及添加1,500IU/mL的IL-4和1,500IU/mL的GM-CSF) 来产生MonoDC。在第3天和第5天更换

培养基。在第7天收集MonoDC。在那一天,用负选择试剂盒(Stemcell)从不同供体中分离CD4+ T细胞。在一定浓度范围的单独的化合物B (0.005-100 μ g/mL) 或者与5、50或500ng/mL的纳武单抗、派姆单抗或同种型IgG对照一起的存在下,将CD4+ T细胞 (1x10⁵) 和同种异体 monoDC (1x10⁴) 在96孔微量滴定板中共培养。对于每种处理条件,每次运行都设置3个重复。在共培养5天后,采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (Abcam; 目录号Ab46025) 分析培养上清液中的IFN- γ 分泌。来自化合物B和派姆单抗的组合的IFN- γ 水平示于图12中。来自化合物B和纳武单抗的组合的IFN- γ 水平示于图13和图14中。使用临床级纳武单抗来生成图13所示的数据,并且使用研究级纳武单抗 (Selleckchem) 来生成图14所示的数据。结果证明,用作单一药剂的化合物B、纳武单抗和派姆单抗以浓度依赖性方式诱导了IFN- γ 的释放。出人意料地, (a) 化合物B和纳武单抗以及 (b) 化合物B和派姆单抗的组合在MLR测定中展示出协同效应。图12、图13和图14所示的数据表示来自一个供体对的3个重复的平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。

实施例14

[1157] 化合物B在CD8+ T、NK和Treg细胞中诱导Ki67的表达,但是在外周血中和CT-26肿瘤内仅扩增CD8+ T和NK细胞,而不扩增Treg细胞

[1158] 为了评价化合物B的药代动力学 (PK) 和药效学 (PD) 特性,为Balb/c雌性小鼠 (6-8周龄,平均体重为16至22g, Jackson Laboratories或Taconic Biosciences) 在侧腹区皮下接种CT-26肿瘤细胞 (ATCC)。通过测量肿瘤,每周监测三次肿瘤生长。当肿瘤体积达到大约150mm³时,将小鼠随机分到对照和处理组中。在向携带CT-26肿瘤的小鼠IV施用3mg/kg的单次剂量的化合物B后,在给药后第0天 (2h、8h和12h)、第1天 (每个时间点N=3只小鼠)、第2天、第3天、第5天、第7天、第10天和第12天 (每个时间点N=4只小鼠) 收集末梢血和肿瘤样品。使用ELISA测定针对化合物B分析血浆和肿瘤样品。

药代动力学分析

[1159] 将肿瘤分成两半,将一半称重并在液氮中冷冻下来以进行肿瘤PK分析。将冷冻的肿瘤样品用裂解缓冲液 (在10mL 1x PBS中的1片蛋白酶抑制剂 (SIGMA, 目录号4693159001)) 均质化。将每0.1g组织与0.4mL裂解缓冲液混合。向每个组织收集管中添加5mm不锈钢珠 (Qiagen, 目录号69989), 之后在20Hz下用组织裂解器II (Qiagen) 均质化20s。在均质化后,使肿瘤裂解物旋下,并且收集上清液用于化合物B PK分析。

[1160] 化合物B的肿瘤暴露大约为血浆暴露的4% (血浆和肿瘤的AUC_{0-t} 分别为429,000和15,900h $\cdot$ ng/mL), 如图15所示。肿瘤t_{1/2}几乎是血浆t_{1/2}的两倍 (在肿瘤和血浆中分别为19.9h和9.8h), 表明化合物B分布到肿瘤中,并且相对于血液隔室在那里保留更长时间。

药效学分析

[1161] 流式细胞术。对于全血免疫细胞表型分析,在末梢收集后立即将血液样品裂解并固定。简而言之,根据制造商的方案,用20体积的预热的1x裂解/固定缓冲液 (BD phosflowTM, 目录号558049) 处理血样。在抗体染色前,用Fc封闭剂 (TruStain fc-X抗CD16/32, BioLegend) 封闭细胞悬浮液。在封闭后,首先将细胞用以下细胞表面标记物染色: Ax488抗小鼠CD3 (17A2)、Bv786抗小鼠CD4 (RM4-5)、Bv711抗小鼠CD8a (53-6.7)、Bv421抗小鼠CD49b (DX5)、生物素抗小鼠CD25 (REA568)、Bv605抗小鼠CD335 (29A1.4)。然后用4 $^{\circ}$ C预冷的甲醇 (Fisher Chemical, A412-4) 对细胞进行渗透化处理,并且用PE抗小鼠FoxP3 (FJK-

16s)、PerCP eFluor710抗Ki67和Ax647抗Pstat5 (Py694) 以及用PEcy7抗CD44 (IM7) 和BUV395链霉亲和素 (针对生物素) 内部染色。利用BD LSRFortessa读取样品,通过FlowJo软件进行分析。

[1162] CD8细胞被鉴定为CD3+CD8a⁺。Treg细胞被鉴定为CD3+CD4+CD25+FoxP3⁺。自然杀伤细胞被门控为CD3-CD335+CD49b⁺。记忆CD8细胞被评估为CD3+CD8+CD44^{hi}。

[1163] 肿瘤FACS。通过以下方式制备小鼠肿瘤样品的单细胞悬浮液:将肿瘤切成小块,并且根据制造商的方案,用MACS小鼠肿瘤解离试剂盒 (Miltenyi, 130-096-730) 消化。通过eFluor 780可固定活力染料 (eBioscience, 65-0865-14) 鉴定活细胞。用抗小鼠CD16/32抗体 (TruStain FcX, BioLegend, 目录号101319) 封闭细胞悬浮液,然后进行细胞表面标记物染色。然后用FoxP3/转录因子固定/渗透化处理试剂 (eBioscience, 目录号00-5521-00) 对细胞进行固定和渗透化处理,然后针对细胞内标记物染色。用于表面抗原的抗体是PEcy7抗小鼠CD45 (30-F11)、BUV395抗小鼠CD3e (17A2)、BV510抗小鼠CD4 (GK1.5)、PE-eF610 CD8a (53-6.7)、BV605抗小鼠CD335 (29A1.4)、AF700抗小鼠CD25 (PC61)、APC抗小鼠CD49b (DX5)。用于细胞内抗原的抗体是PE抗FoxP3 (FJK-16s) 和AF488抗Ki67 (11F6)。CD8细胞群被鉴定为CD3+CD8⁺,而NK细胞群被定义为CD3-CD335+CD49b⁺。Treg细胞被门控为CD3+CD4+CD25+FoxP3⁺。用BD LSRFortessa获得事件,并且通过FlowJo软件进行分析。

[1164] 结果。在细胞亚群 (CD8⁺ T、NK和Treg细胞) 中分析血液和肿瘤样品的PD读数,包括细胞内磷酸化STAT5 (pSTAT5,受体占用和早期信号传导的标记物)、Ki67 (细胞增殖标记物) 以及CD8⁺ T、NK和Treg细胞计数。仅在血液中测量各种细胞类型上的pSTAT5。

[1165] 给药3mg/kg化合物B的携带CT-26肿瘤的小鼠在外周血的CD8⁺ T、CD8⁺记忆T、NK和Treg细胞群中显示出pSTAT5的持续诱导。外周血CD8⁺ T细胞 (图16A) 和CD8⁺记忆T细胞 (图16B) 中pSTAT5+细胞的百分比在给药后2h达到峰值,并且保持升高至大约48h,并且到72h返回基线。在NK细胞 (图16C) 的情况下,pSTAT5+细胞在给药后逐渐增加,在48h达到峰值,并且到120h返回基线。Treg细胞中pSTAT5+的诱导 (图16D) 遵循与CD8⁺ T细胞类似的模式。

[1166] 在pSTAT5诱导后,化合物B在所有三个细胞群 (CD8⁺ T、NK和Treg细胞) 中从第1天至第7天诱导了Ki67的显著激活到相同的程度 ($p < 0.05$),之后到第10天返回媒介物对照水平 (图17A-图17F)。如图17A和图17B所示,化合物B对Ki67的激活转换为CD8⁺ T细胞从第3天至第12天的显著增殖反应 ($p < 0.05$,相比于对照)。CD8⁺ T细胞的表型分析揭示了在相同的时间过程中在此群体内CD44+记忆细胞的显著增殖。与CD8⁺ T细胞相比,化合物B在给药后3天诱导了最大的NK细胞增殖,并且在第5天保持升高 ($p < 0.05$,相比于对照),之后到第7天返回媒介物处理的对照水平 (图17C和图17D)。与CD8⁺ T和NK细胞二者相比,化合物B在给药后第3天仅引起Treg细胞的非常短暂且水平大大降低 (与CD8⁺ T和NK细胞的15%-25%相比,仅有2.5%) 的扩增 (图17E和图17F)。CD8⁺ T细胞的增殖和CD4+Treg细胞亚群没有显著增殖导致CD8⁺ T/Treg比逐渐增加,对于3mg/kg剂量组,在第7天达到峰值 (图17G)。

[1167] 肿瘤样品的分析揭示,在用化合物B处理后7天,CD8⁺ T细胞和NK细胞二者在肿瘤内都显著扩增 ($p < 0.05$,相比于对照),并且持续升高直至第10天 (图18A-图18B)。然而,响应于化合物B,肿瘤内的Treg细胞群没有随时间显示出相对于媒介物的显著扩增 (图18C)。CD8⁺ T细胞的增殖和CD4+Treg细胞亚群没有增殖导致CD8⁺ T/Treg比逐渐增加,对于3mg/kg剂量组,在第7天达到峰值 (图18D)。

[1168] 总结。在携带CT-26肿瘤的小鼠中,3mg/kg的化合物B在所有免疫细胞类型(包括CD8⁺ T、CD8⁺记忆、NK和Treg)中都诱导了外周血pSTAT5激活,表明了IL-2R β / γ 受体复合物的接合。另外,化合物B在此剂量下在所有这些细胞类型中都诱导了增殖标记物Ki-67,但是仅在CD8⁺ T和NK细胞中观察到增殖。这导致在外周血中在此剂量下的CD8/Treg比为大约20。尽管化合物B的肿瘤暴露大约为血浆暴露的4%,但它在肿瘤中保留的时间长两倍,导致足以显示肿瘤生长抑制的CD8⁺ T/Treg比。在6和9mg/kg的较高剂量下,观察到导致肿瘤消退的更大的肿瘤生长抑制。

实施例15

[1169] 化合物B增加小鼠CT-26肿瘤中的瘤内T细胞分数和TCR多样性

[1170] 使用携带CT-26肿瘤的小鼠检查化合物B作为单一药剂和与抗PD-1抗体的组合对T细胞库的影响。为Balb/c雌性小鼠(6-8周龄,平均体重为16至22g, Jackson Laboratories或Taconic Biosciences)在侧腹区皮下接种CT-26肿瘤细胞(ATCC),并且通过测量肿瘤,每周监测三次肿瘤生长。当肿瘤达到大约180mm³时,将小鼠(每组N=4)随机分到以下组中:对照(化合物B媒介物+同种型对照),化合物B(6mg/kg单次IV剂量,在第0天),小鼠抗PD-1抗体(10mg/kg,在第0天和第3天两剂,IP)或化合物B+抗PD-1抗体的组合。在给药前以及给药后第5天、第8天、第12天和第16天收集血液和肿瘤样品,并且将其储存在-80°C下直至分析。分析样品的瘤内T细胞分数和TCR多样性(Adaptive Biotechnologies,华盛顿州西雅图)。经由immunoSEQTM对浸润T细胞进行TCR测序。

[1171] 到第8天,与媒介物或单独的抗PD-1抗体组相比,用单独的6mg/kg化合物B或与小鼠抗PD-1抗体的组合处理的CT-26肿瘤显示出显著更低的TCR库克隆性,如通过事后邓恩检验所确定的($p=0.005$)。通过测量克隆频率分布的形状,通过库内单克隆或寡克隆优势的程度来定量克隆性。通过降采样至最小数量的模板来确定克隆多样性。与克隆性一致,在第5天和第8天,TCR多样性显示出相反的趋势,并且在用化合物B或化合物+抗PD-1抗体的组合处理的组中更高($p<0.05$) (图19)。在第12天或第16天,在T细胞库度量方面在化合物B或抗PD-1抗体组合处理的情况下没有观察到显著差异。

[1172] 如图20所示,TCR测序还证明,化合物B单独地或与抗PD-1抗体组合地升高肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)分数($p<0.05$)。第8天外周血样品的分析揭示,与媒介物对照相比,化合物B还显著降低了($p=0.001$) T细胞克隆性,与在肿瘤中的观察结果一致(图21)。

实施例16

[1173] 化合物B重编程CT-26肿瘤微环境以用于高T_{eff}活性、IFN- γ 诱导和检查点配体表达

[1174] 还经由mRNAseq (Ominiseq,纽约州布法罗)对来自实施例15中的上述研究的CT-26肿瘤样品进行谱分析,并且通过GeneCentric (Research Triangle Park,北卡罗来纳州)进行分析,以鉴定淋巴细胞浸润和激活的细胞和分子标签。数据呈现为来自用对照(媒介物)、化合物B(6mg/kg)、小鼠抗PD-1(10mg/kg)或化合物B和小鼠抗PD-1的组合处理后第8天CT26肿瘤样品的表达热图(每组N=10只小鼠)。示出了所有标签和单独基因,其K-W p 值 <0.05 (PD-L1除外, $p=0.23$)。化合物B和抗PD1处理诱导的免疫激活呈现为基于使用基因的以中值为中心的log2表达值生成的值的组成不同免疫标签和单独基因的热图。还产生了显示单独免疫激活标签或单独基因表达水平的箱形图。在这些箱形图内,进行第8天和第12天对照

和处理组之间的成对比较,并且显示了当威尔科克森秩和检验 p 值 <0.05 时的 p 值。使用R程序版本3.5.3生成热图和箱形图。箱形图示出了下四分位数、中值和上四分位数表达数据。箱须图示出了表达数据的完整分布。图22中提供的命名法对应于人直系同源基因。

[1175] 图22的热图的顶行表明,在单次剂量的化合物B后8天,CT26肿瘤被激活的CD8⁺效应和记忆T细胞以及CD56^{dim}(细胞溶解表型)NK细胞浸润。通过与抗PD-1抗体的组合进一步增强了这些细胞群。以平均值为中心的log2表达水平(图23)表明,相对于给药前水平,化合物B显著($p<0.05$)升高了这些肿瘤中的激活的和记忆CD8⁺ T细胞,而与给药前水平或对照相比,化合物B和抗PD-1抗体的组合显著增加了CD56^{dim}NK细胞($p<0.01$)。如图22所示,化合物B诱导了IL-2反应和T细胞激活的多种标记物,包括三条IL-2受体链CD28、4-1BB和CD40。另外,化合物B处理导致检查点抑制受体PD-1和CTLA4以及PD-1配体PD-L1和PD-L2的表达升高。化合物B还诱导了报告关于IFN- γ 释放和IFN- γ 信号传导途径激活的基因(图24A)。

[1176] 为了在携带CT-26肿瘤的小鼠中构建对化合物B的标签反应,在处理第8天,对媒介物对照与化合物B处理的动物之间的ID差异表达基因($FDR<0.01$)进行监督分析。使用显著性分析,在第8天化合物B处理的小鼠与第8天媒介物对照样品之间基因表达谱形成对比。使用假发现率($FDR=0.01$)调整多重比较。按FDR调整的 p 值为基因排序,相应的倍数变化列于表35中。倍数变化大于一指示基因表达在化合物B处理的组中更高;倍数变化小于一指示基因表达在对照组中更高。

表35.用以鉴定新基因标记物以开发化合物B预测反应标签(PRS)的表达变化的监督分析。

基因	原始p值	p值	倍数	基因	原始p值	p值	倍数
F10	1.12E-6	0.000	3.2	NR4A3	9.24E-6	0.011	2.5
<u>IL2RA</u>	<u>1.12E-6</u>	<u>0.008</u>	<u>3.8</u>	BCL2L14	9.24E-6	0.011	6.1
CDH1	2.24E-6	0.008	3.0	DCSTAMP	9.24E-6	0.011	4.1
<u>GZMK</u>	<u>2.24E-6</u>	<u>0.009</u>	<u>4.0</u>	<u>CTLA4</u>	<u>1.20E-5</u>	<u>0.012</u>	<u>3.7</u>
SEPT3	5.88E-6	0.009	5.3	ARHGEF37	1.20E-5	0.012	3.0
F7	5.88E-6	0.011	5.4	STRIP2	1.57E-5	0.015	4.6
PDCD1LG2	5.88E-6	0.011	4.6	FAM169A	2.24E-5	0.015	1.7
ASGR2	5.88E-6	0.011	4.6	<u>CCL22</u>	<u>2.41E-5</u>	<u>0.015</u>	<u>3.8</u>
RAMP3	5.88E-6	0.011	3.1	MEX3B	2.55E-5	0.015	1.6
IL12B	5.88E-6	0.011	6.5	HR	2.58E-5	0.015	4.3
FLT3	8.12E-6	0.011	3.9	TACR1	2.69E-5	0.015	2.7
<u>CCL17</u>	<u>8.96E-6</u>	<u>0.011</u>	<u>7.3</u>				

[1177] 对于原型化合物B PRS,使用43个最差异表达的基因中的四十二个。从原型PRS中排除基因GT (ROSA) 26,因为此基因在小鼠中被用作敲入基因座。进行原型化合物B调用,并且在对照、化合物B和抗PD1处理组之间进行比较。进行第8天和第12天对照和处理组之间的PRS成对比较,并且将其呈现为箱形图(图24A)。示出了由成对威尔科克森秩和检验(p 值 $<$

0.05) 生成的p值。使用R程序版本3.5.3生成箱形图,其示出了下四分位数、中值和上四分位数表达数据。箱须图示出了中值 $\pm$ 1.5倍四分位距(IQR),或当min/max落在1.5倍IQR内时的最小/最大表达数据。

[1178] 在第8天,相对于对照,化合物B上调了四十二个基因。使用表35中所示的二十三个人直系同源物来构建反应的原型标签。如表35中带下划线的文本所示,检测到具有已知的IL-2相关生物学的几个基因。相对于媒介物处理的小鼠,在化合物B单一药剂和与小鼠抗PD-1抗体的组合的情况下观察到显著的标签调用(图24B)。

实施例17

[1179] 化合物B促进持续的记忆T细胞反应的建立,在通过再注射CT-26细胞激发的存活动物中阻止CT-26肿瘤生长

[1180] 在实施例15中,在第100天7只小鼠保持无肿瘤,并且包括来自3mg/kg的化合物B、6mg/kg的化合物B和抗PD-1抗体组的各1只动物以及来自6mg/kg的化合物B+抗PD-1抗体的组合组的4只动物。在第121天(研究#2),为这7只小鼠和7只幼稚对照小鼠同时接种相同数量的CT-26肿瘤细胞。如图25所示,先前用化合物B、抗PD-1抗体或组合处理的7只小鼠都没有出现肿瘤,而所有对照动物都生长了肿瘤,表明响应于初始处理建立了持久的记忆T细胞群。两个月后,在第181天,为从第一次再激发中存活的7只经处理的无肿瘤动物以及7只对照小鼠再次接种CT-26肿瘤细胞。再一次地,7只经处理的无肿瘤动物没有出现肿瘤,而肿瘤在对照动物中生长(图25)。7只无肿瘤动物存活到当研究终止时的第202天。

[1181] 在进一步的研究(研究#3)中,用存活动物重复再激发实验。通过皮下接种CT-26肿瘤细胞对在第102天具有完全肿瘤消退的总共9只存活的无肿瘤小鼠(来自9mg/kg的化合物B和抗PD-1抗体组各1只动物,来自3mg/kg的化合物B+抗PD-1抗体的组合组的2只动物,以及来自6mg/kg的化合物B+抗PD-1抗体的组合组的5只动物)进行再激发。还同时为另外10只幼稚对照小鼠接种。如图26所示,9只动物都没有出现肿瘤,表明响应于初始处理建立了持久的记忆T细胞群。相比之下,所有10只对照动物都出现肿瘤。两个月后,在第163天,在从第一次再激发中存活的相同的9只动物中进行第二次再激发;另外9只幼稚动物作为对照。与第一次再激发的情况一样,9只存活动物没有出现肿瘤,确认了初始处理后记忆T细胞反应的耐久性,而肿瘤在对照动物中生长(图26)。9只无肿瘤动物存活到当研究终止时的第184天。

[1182] 为了确定化合物B促进持续的T细胞记忆反应的能力,在第二次再激发后60天,从来自研究#2的7只存活小鼠收集血样。血样的记忆细胞表达的FACS分析揭示,化合物B促进针对CT-26肿瘤的持久的免疫记忆的建立,观察为外周血记忆T细胞(CD3⁺) (包括记忆CD8⁺T细胞)的总增加(图27A-图27B)。

[1183] 总结。化合物B 6mg/kg处理的肿瘤中TIL的分析揭示了T细胞库和激活的CD8⁺T细胞(包括效应记忆细胞)和NK细胞以及诱导检查点配体的IFN γ 标签的增加。免疫检查点疗法已经被广泛使用,并且在越来越多的癌症(包括转移性黑色素瘤和肾细胞癌)中显示出功效(Hodi F.S.等人,N.Engl.J.Med. (2010) 363 (8):711-723;Topalian S.L.等人,N.Engl.J.Med. (2012) 366 (26):2443-2454;Wolchok J.D.等人,N.Engl.J.Med. (2013) 369 (2):122-133;Sharma P.等人Cell (2015) 161 (2):205-214;Alsaab H.O.等人,Frontiers in Pharmacology (2017) 8:561,1-15;Pardoll D.M.Nat.Rev.Cancer (2016) 12 (4):252-264)。然而,完全反应率仍然很低。检查点抑制剂释放出在功能障碍细胞毒性T淋巴细胞上

的机会并且启动它们,而诸如IL-2等细胞因子疗法可以激活和增殖它们。另外,基于IL-2的疗法可以扩增和激活Fc+淋巴细胞,如NK细胞。因此,检查点抑制剂与IL-2的组合相互补充,介导对免疫反应的作用以改善抗肿瘤反应。在目前的研究中,由于激活的细胞毒性CD8+ T和NK细胞的多样性和克隆性二者都增强,与每种单一药剂相比,化合物B和抗PD-1的组合处理导致存活优势。此外,用化合物B或组合处理的无肿瘤小鼠具有持续的记忆T细胞群。这导致在两次用相同的肿瘤细胞再激发后在存活小鼠中排斥肿瘤细胞,间隔2个月,第一次再激发在最后的化合物B、抗PD-1抗体或组合处理后100天。

[1184] 虽然在本文已经显示和描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员而言应明显的是,此类实施方案仅通过举例的方式来提供。在不背离本发明的情况下,本领域技术人员现在应想到许多改变、变化和替换。应当理解的是,本文所述的本发明的实施方案的各种替代方案都可以用于实践本发明。以下权利要求旨在限定本发明的范围,并且由此覆盖这些权利要求及其等同物范围内的方法和结构。将本文引用的所有专利和科学文献的公开内容都通过引用以其整体明确地并入本文。

序列表

- <110> 新索思股份有限公司
 <120> 采用IL-2缀合物的免疫肿瘤学组合疗法
 <130> 01183-0073-00PCT
 <150> US 62/887,400
 <151> 2019-08-15
 <150> US 62/903,187
 <151> 2019-09-20
 <150> US 62/962,668
 <151> 2020-01-17
 <160> 98
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> IL-2 (智人(homo sapiens)) (成熟形式)
 <400> 1

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
			20					25					30		
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys
		35					40					45			
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys
		50				55					60				
Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
65					70					75					80
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
			85						90					95	
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
			100					105					110		
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile
			115					120					125		
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr											
			130												

<210> 2

<211> 153

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> 尚未归类的特征

<223> IL-2 (智人(homo sapiens)) (前体)

<400> 2

```

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1           5           10           15
Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
           20           25           30
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
           35           40           45
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
           50           55           60
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65           70           75           80
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
           85           90           95
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
           100          105          110
Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
           115          120          125
Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
           130          135          140
Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145          150

```

<210> 3

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:阿地白介素

<400> 3

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1           5           10           15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
           20           25           30

```


Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr
 130
 <210> 4
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_C125S
 <400> 4
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 5
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的:IL-2_P65X
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (65) .. (65)
<223> Xaa是任何非天然氨基酸
<400> 5

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
			20					25						30	
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys
		35					40					45			
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys
	50					55					60				
Xaa	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
65				70					75					80	
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
			85						90					95	
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
			100					105					110		
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile
		115					120						125		
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr											
			130												

<210> 6
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的:IL-2_E62X
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (62) .. (62)
<223> Xaa是任何非天然氨基酸

<400> 6

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Xaa Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 7

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_F42X

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (42) .. (42)

<223> Xaa是任何非天然氨基酸

<400> 7

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Xaa Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65	70	75	80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu			
	85	90	95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala			
	100	105	110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile			
	115	120	125
Ile Ser Thr Leu Thr			
130			

<210> 8

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_K43X

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (43) .. (43)

<223> Xaa是任何非天然氨基酸

<400> 8

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His			
1	5	10	15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys			
	20	25	30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Xaa Phe Tyr Met Pro Lys			
	35	40	45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys			
	50	55	60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu			
65	70	75	80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu			
	85	90	95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala			
	100	105	110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile			
	115	120	125
Ile Ser Thr Leu Thr			
130			

<210> 9

<211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_K35X
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (35) .. (35)
 <223> Xaa是任何非天然氨基酸
 <400> 9
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Xaa Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 <210> 10
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_P65[AzK]
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (65) .. (65)
 <223> Xaa是[AzK]
 <400> 10

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Xaa Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 11

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_E62[AzK]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (62) .. (62)

<223> Xaa是[AzK]

<400> 11

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Xaa Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 12

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_F42[AzK]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (42) .. (42)

<223> Xaa是[AzK]

<400> 12

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Xaa Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 13

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_K43[AzK]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (43) .. (43)

<223> Xaa是[AzK]

<400> 13

```
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1          5          10          15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
          20          25          30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Xaa Phe Tyr Met Pro Lys
          35          40          45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
          50          55          60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65          70          75          80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
          85          90          95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
          100          105          110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
          115          120          125
Ile Ser Thr Leu Thr
          130
```

<210> 14

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_K35[AzK]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (35) .. (35)

<223> Xaa是[AzK]

<400> 14

```
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
```


1	5	10	15
Leu Leu Leu Asp	Leu Gln Met Ile	Leu Asn Gly Ile	Asn Asn Tyr Lys
20	25	30	
Asn Pro Xaa Leu Thr Arg Met	Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met	Pro Lys	
35	40	45	
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His	Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys		
50	55	60	
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu			
65	70	75	80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu			
85	90	95	
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala			
100	105	110	
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile			
115	120	125	
Ile Ser Thr Leu Thr			
130			

<210> 15

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_P65[AzK_PEG]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (65) .. (65)

<223> Xaa是[AzK_PEG]

<400> 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Xaa Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

				85					90					95					
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala				
				100				105						110					
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile				
				115				120						125					
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr															
				130															
<210>	16																		
<211>	133																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	合成的:IL-2_E62[AzK_PEG]																		
<220>																			
<221>	尚未归类的特征																		
<222>	(62) .. (62)																		
<223>	Xaa是[AzK_PEG]																		
<400>	16																		
Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His				
1				5				10						15					
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys				
				20				25						30					
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys				
				35				40						45					
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Xaa	Leu	Lys				
				50				55						60					
Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu				
65					70					75					80				
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu				
				85				90						95					
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala				
				100				105						110					
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile				
				115				120						125					
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr															
				130															
<210>	17																		
<211>	133																		
<212>	PRT																		

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_F42[AzK_PEG]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (42) .. (42)

<223> Xaa是[AzK_PEG]

<400> 17

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
			20					25					30		
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Xaa	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys
		35					40					45			
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys
		50				55					60				
Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
65				70					75					80	
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
			85					90					95		
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
			100					105					110		
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile
		115					120						125		
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr											
			130												

<210> 18

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_K43[AzK_PEG]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (43) .. (43)

<223> Xaa是[AzK_PEG]

<400> 18

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

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Xaa Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 19

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_K35[AzK_PEG]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (35) .. (35)

<223> Xaa是[AzK_PEG]

<400> 19

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Xaa Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 <210> 20
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_P65[AzK_PEG5kD]
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (65) .. (65)
 <223> Xaa是[AzK_PEG5kD]
 <400> 20
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Xaa Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 <210> 21
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_E62[AzK_PEG5kD]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (62) .. (62)

<223> Xaa是[AzK_PEG5kD]

<400> 21

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Xaa Leu Lys
 50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 22

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_F42[AzK_PEG5kD]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (42) .. (42)

<223> Xaa是[AzK_PEG5kD]

<400> 22

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

			100						105					110		
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile	
		115					120					125				
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr												
	130															
<210>	24															
<211>	133															
<212>	PRT															
<213>	人工序列															
<220>																
<223>	合成的:IL-2_K35[AzK_PEG5kD]															
<220>																
<221>	尚未归类的特征															
<222>	(35) .. (35)															
<223>	Xaa是[AzK_PEG5kD]															
<400>	24															
Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	
1				5					10					15		
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	
			20					25					30			
Asn	Pro	Xaa	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	
	35						40					45				
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	
	50					55					60					
Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	
65					70				75					80		
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	
			85					90					95			
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	
			100					105					110			
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile	
	115						120						125			
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr												
	130															
<210>	25															
<211>	133															
<212>	PRT															
<213>	人工序列															
<220>																

<223> 合成的:IL-2_P65[AzK_PEG30kD]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (65) .. (65)

<223> Xaa是[AzK_PEG30kD]

<400> 25

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
			20					25					30		
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys
		35					40					45			
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys
		50				55					60				
Xaa	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
65				70					75					80	
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
			85					90					95		
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
			100					105					110		
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile
		115					120						125		
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr											
			130												

<210> 26

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_E62[AzK_PEG30kD]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (62) .. (62)

<223> Xaa是[AzK_PEG30kD]

<400> 26

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
			20					25					30		

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Xaa Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 27

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_F42[AzK_PEG30kD]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (42) .. (42)

<223> Xaa是[AzK_PEG30kD]

<400> 27

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Xaa Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 28
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的:IL-2_K43[AzK_PEG30kD]
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (43) .. (43)
<223> Xaa是[AzK_PEG30kD]
<400> 28
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Xaa Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 29
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的:IL-2_K35[AzK_PEG30kD]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (35) .. (35)

<223> Xaa是[AzK_PEG30kD]

<400> 29

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
			20					25					30		
Asn	Pro	Xaa	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys
		35					40					45			
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys
	50					55					60				
Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
65				70					75					80	
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
			85					90					95		
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
			100					105					110		
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile
		115					120						125		
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr											
			130												

<210> 30

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_P65X-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (64) .. (64)

<223> Xaa是任何非天然氨基酸

<400> 30

Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu
1				5					10					15	
Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn
			20					25					30		
Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys

35	40	45
Ala Thr Glu Leu Lys His	Leu Gln Cys Leu Glu Glu	Glu Leu Lys Xaa
50	55	60
Leu Glu Glu Val Leu Asn	Leu Ala Gln Ser Lys	Asn Phe His Leu Arg
65	70	75
Pro Arg Asp Leu Ile Ser	Asn Ile Asn Val Ile	Val Leu Glu Leu Lys
85	90	95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe	Met Cys Glu Tyr Ala	Asp Glu Thr Ala Thr
100	105	110
Ile Val Glu Phe Leu Asn	Arg Trp Ile Thr Phe	Ser Gln Ser Ile Ile
115	120	125
Ser Thr Leu Thr		
130		
<210>	31	
<211>	132	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的:IL-2_E62X-1	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(61) .. (61)	
<223>	Xaa是任何非天然氨基酸	
<400>	31	
Pro Thr Ser Ser Ser Thr	Lys Lys Thr Gln Leu Gln	Leu Glu His Leu
1	5	10
Leu Leu Asp Leu Gln Met	Ile Leu Asn Gly Ile	Asn Asn Tyr Lys Asn
20	25	30
Pro Lys Leu Thr Arg Met	Leu Thr Phe Lys Phe	Tyr Met Pro Lys Lys
35	40	45
Ala Thr Glu Leu Lys His	Leu Gln Cys Leu Glu Glu	Xaa Leu Lys Pro
50	55	60
Leu Glu Glu Val Leu Asn	Leu Ala Gln Ser Lys	Asn Phe His Leu Arg
65	70	75
Pro Arg Asp Leu Ile Ser	Asn Ile Asn Val Ile	Val Leu Glu Leu Lys
85	90	95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe	Met Cys Glu Tyr Ala	Asp Glu Thr Ala Thr
100	105	110
Ile Val Glu Phe Leu Asn	Arg Trp Ile Thr Phe	Ser Gln Ser Ile Ile

115	120	125
Ser Thr Leu Thr		
130		
<210> 32		
<211> 132		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的:IL-2_F42X-1		
<220>		
<221> 尚未归类的特征		
<222> (41) .. (41)		
<223> Xaa是任何非天然氨基酸		
<400> 32		
Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu		
1 5 10 15		
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn		
20 25 30		
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Xaa Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys		
35 40 45		
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro		
50 55 60		
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg		
65 70 75 80		
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys		
85 90 95		
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr		
100 105 110		
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile		
115 120 125		
Ser Thr Leu Thr		
130		
<210> 33		
<211> 132		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的:IL-2_K43X-1		
<220>		

<221> 尚未归类的特征

<222> (42) .. (42)

<223> Xaa是任何非天然氨基酸

<400> 33

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1           5           10           15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
          20           25           30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Xaa Phe Tyr Met Pro Lys Lys
          35           40           45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
          50           55           60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65           70           75           80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
          85           90           95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
          100          105          110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
          115          120          125
Ser Thr Leu Thr
          130

```

<210> 34

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_K35X-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa是任何非天然氨基酸

<400> 34

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1           5           10           15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
          20           25           30
Pro Xaa Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
          35           40           45

```

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
50 55 60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65 70 75 80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
85 90 95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
100 105 110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
115 120 125
Ser Thr Leu Thr
130

<210> 35

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_P65[AzK]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (64) .. (64)

<223> Xaa是[AzK]

<400> 35

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
20 25 30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
35 40 45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Xaa
50 55 60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65 70 75 80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
85 90 95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
100 105 110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
115 120 125

Ser Thr Leu Thr

130

<210> 36

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_E62[AzK]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (61) .. (61)

<223> Xaa是[AzK]

<400> 36

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Xaa Leu Lys Pro

50 55 60

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

65 70 75 80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

85 90 95

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr

100 105 110

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

115 120 125

Ser Thr Leu Thr

130

<210> 37

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_F42[AzK]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (41) .. (41)

<223> Xaa是[AzK]

<400> 37

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1           5           10           15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
           20           25           30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Xaa Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
           35           40           45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
           50           55           60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65           70           75           80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
           85           90           95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
           100          105          110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
           115          120          125
Ser Thr Leu Thr
           130

```

<210> 38

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_K43[AzK]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (42) .. (42)

<223> Xaa是[AzK]

<400> 38

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1           5           10           15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
           20           25           30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Xaa Phe Tyr Met Pro Lys Lys
           35           40           45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

```

50	55	60
Leu Glu Glu Val	Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg	
65	70	75
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys		80
	85	90
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr		95
	100	105
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile		110
	115	120
Ser Thr Leu Thr		125
130		
<210>	39	
<211>	132	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的:IL-2_K35[AzK]-1	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(34) .. (34)	
<223>	Xaa是[AzK]	
<400>	39	
Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu		
1	5	10
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn		15
	20	25
Pro Xaa Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys		30
	35	40
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro		45
	50	55
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg		60
65	70	75
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys		80
	85	90
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr		95
	100	105
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile		110
	115	120
Ser Thr Leu Thr		125

130
 <210> 40
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_P65[AzK_L1_PEG]-1
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (64) .. (64)
 <223> Xaa是[AzK_L1_PEG]
 <400> 40
 Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Xaa
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr

130
 <210> 41
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_E62[AzK_L1_PEG]-1
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (61) .. (61)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG]

<400> 41

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1           5           10           15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
          20           25           30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
          35           40           45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Xaa Leu Lys Pro
          50           55           60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65           70           75           80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
          85           90           95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
          100          105          110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
          115          120          125
Ser Thr Leu Thr
          130

```

<210> 42

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_F42[AzK_ L1_PEG]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (41) .. (41)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG]

<400> 42

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1           5           10           15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
          20           25           30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Xaa Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
          35           40           45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
          50           55           60

```


<210> 44

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_K35[AzK_ L1_PEG]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG]

<400> 44

```
Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1          5          10          15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
          20          25          30
Pro Xaa Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
          35          40          45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
          50          55          60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65          70          75          80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
          85          90          95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
          100          105          110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
          115          120          125
Ser Thr Leu Thr
          130
```

<210> 45

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_P65[AzK_ L1_PEG5kD]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (64) .. (64)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG5kD]

<400> 45

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Xaa
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 46

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_E62[AzK_ L1_PEG5kD]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (61) .. (61)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG5kD]

<400> 46

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Xaa Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

65	70	75	80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys			
	85	90	95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr			
	100	105	110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile			
	115	120	125
Ser Thr Leu Thr			
130			
<210> 47			
<211> 132			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的:IL-2_F42[AzK_ L1_PEG5kD] -1			
<220>			
<221> 尚未归类的特征			
<222> (41) .. (41)			
<223> Xaa是[AzK_L1_PEG5kD]			
<400> 47			
Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu			
1	5	10	15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn			
	20	25	30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Xaa Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys			
	35	40	45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro			
	50	55	60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg			
65	70	75	80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys			
	85	90	95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr			
	100	105	110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile			
	115	120	125
Ser Thr Leu Thr			
130			
<210> 48			

<211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_K43[AzK_ L1_PEG5kD]-1
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (42) .. (42)
 <223> Xaa是[AzK_L1_PEG5kD]
 <400> 48
 Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Xaa Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr
 130
 <210> 49
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_K35[AzK_ L1_PEG5kD]-1
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (34) .. (34)
 <223> Xaa是[AzK_L1_PEG5kD]
 <400> 49

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Xaa Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 50

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_P65[AzK_ L1_PEG30kD]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (64) .. (64)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG30kD]

<400> 50

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Xaa
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 51

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_E62[AzK_ L1_PEG30kD]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (61) .. (61)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG30kD]

<400> 51

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Xaa Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 52

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_F42[AzK_ L1_PEG30kD]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (41) .. (41)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG30kD]

<400> 52

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1          5          10          15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
          20          25          30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Xaa Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
          35          40          45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
          50          55          60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65          70          75          80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
          85          90          95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
          100          105          110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
          115          120          125
Ser Thr Leu Thr
          130

```

<210> 53

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_K43[AzK_ L1_PEG30kD]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (42) .. (42)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG30kD]

<400> 53

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

```

1	5	10	15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn			
20	25	30	
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Xaa Phe Tyr Met Pro Lys Lys			
35	40	45	
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro			
50	55	60	
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg			
65	70	75	80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys			
85	90	95	
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr			
100	105	110	
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile			
115	120	125	
Ser Thr Leu Thr			
130			
<210>	54		
<211>	132		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的:IL-2_K35[AzK_ L1_PEG30kD]-1		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<222>	(34) .. (34)		
<223>	Xaa是[AzK_L1_PEG30kD]		
<400>	54		
Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu			
1	5	10	15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn			
20	25	30	
Pro Xaa Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys			
35	40	45	
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro			
50	55	60	
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg			
65	70	75	80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys			

				85					90					95			
Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr		
				100				105						110			
Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile	Ile		
				115				120						125			
Ser	Thr	Leu	Thr														
				130													
<210>	55																
<211>	133																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	合成的:IL-2_P65[AzK_L1_PEG]-2																
<220>																	
<221>	尚未归类的特征																
<222>	(65) .. (65)																
<223>	Xaa是[AzK_L1_PEG]																
<400>	55																
Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His		
1				5				10					15				
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys		
				20				25					30				
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys		
				35				40					45				
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys		
				50				55					60				
Xaa	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu		
65				70				75					80				
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu		
				85				90					95				
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala		
				100				105					110				
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile		
				115				120					125				
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr													
				130													
<210>	56																
<211>	133																
<212>	PRT																

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_E62[AzK_ L1_PEG]-2

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (62) .. (62)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG]

<400> 56

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1				5				10					15		
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
			20				25					30			
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys
		35				40					45				
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Xaa	Leu	Lys
		50				55					60				
Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
65				70				75					80		
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
			85					90					95		
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
			100					105					110		
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile
		115					120						125		
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr											
			130												

<210> 57

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_F42[AzK_ L1_PEG]-2

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (42) .. (42)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG]

<400> 57

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

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Xaa Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 58

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_K43[AzK_L1_PEG]-2

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (43) .. (43)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG]

<400> 58

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Xaa Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 <210> 59
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_K35[AzK_ L1_PEG]-2
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (35) .. (35)
 <223> Xaa是[AzK_L1_PEG]
 <400> 59
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Xaa Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 <210> 60
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_P65[AzK_ L1_PEG5kD]-2

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (65) .. (65)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG5kD]

<400> 60

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
			20					25						30	
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys
		35					40					45			
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys
		50				55						60			
Xaa	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
65					70					75					80
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
			85						90						95
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
			100						105					110	
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile
			115					120						125	
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr											
			130												

<210> 61

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_E62[AzK_ L1_PEG5kD]-2

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (62) .. (62)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG5kD]

<400> 61

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys

<210> 62
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的:IL-2_F42[AzK_ L1_PEG5kD]-2
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (42) .. (42)
<223> Xaa是[AzK_L1_PEG5kD]
<400> 62

			100					105					110			
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile	
		115					120					125				
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr												
	130															
<210>	63															
<211>	133															
<212>	PRT															
<213>	人工序列															
<220>																
<223>	合成的:IL-2_K43[AzK_ L1_PEG5kD] -2															
<220>																
<221>	尚未归类的特征															
<222>	(43) .. (43)															
<223>	Xaa是[AzK_L1_PEG5kD]															
<400>	63															
Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	
1				5					10					15		
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	
			20					25					30			
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Xaa	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	
		35					40					45				
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	
	50					55					60					
Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	
65					70				75					80		
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	
			85					90					95			
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	
			100					105					110			
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile	
		115					120						125			
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr												
	130															
<210>	64															
<211>	133															
<212>	PRT															
<213>	人工序列															
<220>																

<223> 合成的:IL-2_K35[AzK_ L1_PEG5kD]-2

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (35) .. (35)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG5kD]

<400> 64

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1				5				10					15		
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
			20					25					30		
Asn	Pro	Xaa	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys
		35					40						45		
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys
		50				55						60			
Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
65					70					75					80
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
				85					90					95	
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
			100					105					110		
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile
		115					120						125		
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr											
			130												

<210> 65

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_P65[AzK_ L1_PEG30kD]-2

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (65) .. (65)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG30kD]

<400> 65

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1				5				10					15		
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
			20					25					30		

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Xaa Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 66

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_E62[AzK_ L1_PEG30kD]-2

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (62) .. (62)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG30kD]

<400> 66

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Xaa Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 67

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_F42[AzK_ L1_PEG30kD] -2

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (42) .. (42)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG30kD]

<400> 67

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 68

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_K43[AzK_ L1_PEG30kD] -2

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (43) .. (43)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG30kD]

<400> 68

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Xaa Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
 115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 69

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_K35[AzK_L1_PEG30kD]-2

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (35) .. (35)

<223> Xaa是[AzK_L1_PEG30kD]

<400> 69

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
Asn Pro Xaa Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35	40	45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His	Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys	
50	55	60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu		
65	70	75
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu		
85	90	95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala		
100	105	110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile		
115	120	125
Ile Ser Thr Leu Thr		
130		
<210>	70	
<211>	132	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的:IL-2_P65[AzK_PEG]-1	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(64) .. (64)	
<223>	Xaa是[AzK_PEG]	
<400>	70	
Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu		
1	5	10
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn		
20	25	30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys		
35	40	45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Xaa		
50	55	60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg		
65	70	75
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys		
85	90	95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr		
100	105	110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile		

115	120	125
Ser Thr Leu Thr		
130		
<210> 71		
<211> 132		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的:IL-2_E62[AzK_ PEG]-1		
<220>		
<221> 尚未归类的特征		
<222> (61) .. (61)		
<223> Xaa是[AzK_PEG]		
<400> 71		
Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu		
1 5 10 15		
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn		
20 25 30		
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys		
35 40 45		
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Xaa Leu Lys Pro		
50 55 60		
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg		
65 70 75 80		
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys		
85 90 95		
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr		
100 105 110		
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile		
115 120 125		
Ser Thr Leu Thr		
130		
<210> 72		
<211> 132		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成的:IL-2_F42[AzK_ PEG]-1		
<220>		

<221> 尚未归类的特征

<222> (41) .. (41)

<223> Xaa是[AzK_PEG]

<400> 72

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1          5          10          15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
          20          25          30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Xaa Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
          35          40          45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
          50          55          60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65          70          75          80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
          85          90          95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
          100         105         110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
          115         120         125
Ser Thr Leu Thr
          130

```

<210> 73

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_K43[AzK_PEG]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (42) .. (42)

<223> Xaa是[AzK_PEG]

<400> 73

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1          5          10          15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
          20          25          30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Xaa Phe Tyr Met Pro Lys Lys
          35          40          45

```

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 74

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_K35[AzK_ PEG]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (34) .. (34)

<223> Xaa是[AzK_PEG]

<400> 74

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Xaa Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
 115 120 125

Ser Thr Leu Thr

130

<210> 75

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_P65[AzK_PEG5kD]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (64) .. (64)

<223> Xaa是[AzK_PEG5kD]

<400> 75

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Xaa

50 55 60

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

65 70 75 80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

85 90 95

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr

100 105 110

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

115 120 125

Ser Thr Leu Thr

130

<210> 76

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_E62[AzK_PEG5kD]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (61) .. (61)

<223> Xaa是[AzK_PEG5kD]

<400> 76

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1          5          10          15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
          20          25          30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
          35          40          45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Xaa Leu Lys Pro
          50          55          60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65          70          75          80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
          85          90          95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
          100          105          110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
          115          120          125
Ser Thr Leu Thr
          130

```

<210> 77

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_F42[AzK_PEG5kD]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (41) .. (41)

<223> Xaa是[AzK_PEG5kD]

<400> 77

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1          5          10          15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
          20          25          30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Xaa Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
          35          40          45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

```

50	55	60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg		
65	70	75
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys		80
	85	90
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr		95
	100	105
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile		110
	115	120
Ser Thr Leu Thr		125
130		
<210>	78	
<211>	132	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的:IL-2_K43[AzK_PEG5kD] -1	
<220>		
<221>	尚未归类的特征	
<222>	(42) .. (42)	
<223>	Xaa是[AzK_PEG5kD]	
<400>	78	
Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu		
1	5	10
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn		15
	20	25
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Xaa Phe Tyr Met Pro Lys Lys		30
	35	40
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro		45
	50	55
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg		60
65	70	75
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys		80
	85	90
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr		95
	100	105
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile		110
	115	120
Ser Thr Leu Thr		125

130
 <210> 79
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_K35[AzK_PEG5kD]-1
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (34) .. (34)
 <223> Xaa是[AzK_PEG5kD]
 <400> 79
 Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Xaa Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr

130
 <210> 80
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_P65[AzK_PEG30kD]-1
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (64) .. (64)

<223> Xaa是[AzK_PEG30kD]

<400> 80

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1           5           10           15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
          20           25           30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
          35           40           45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Xaa
          50           55           60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65           70           75           80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
          85           90           95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
          100          105          110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
          115          120          125
Ser Thr Leu Thr
          130

```

<210> 81

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_E62[AzK_PEG30kD]-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (61) .. (61)

<223> Xaa是[AzK_PEG30kD]

<400> 81

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1           5           10           15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
          20           25           30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
          35           40           45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Xaa Leu Lys Pro
          50           55           60

```

Ser Thr Leu Thr
130

<210> 83
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_K43[AzK_PEG30kD]-1
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (42) .. (42)
 <223> Xaa是[AzK_PEG30kD]
 <400> 83
 Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Xaa Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 84
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_K35[AzK_PEG30kD]-1
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (34) .. (34)
 <223> Xaa是[AzK_PEG30kD]

<400> 84

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Xaa Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 85

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_F44X

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (44) .. (44)

<223> Xaa是任何非天然氨基酸

<400> 85

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Xaa Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65	70	75	80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu			
	85	90	95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala			
	100	105	110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile			
	115	120	125
Ile Ser Thr Leu Thr			
130			
<210> 86			
<211> 132			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的:IL-2_F44X-1			
<220>			
<221> 尚未归类的特征			
<222> (43) .. (43)			
<223> Xaa是任何非天然氨基酸			
<400> 86			
Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu			
1	5	10	15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn			
	20	25	30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Xaa Tyr Met Pro Lys Lys			
	35	40	45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro			
	50	55	60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg			
65	70	75	80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys			
	85	90	95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr			
	100	105	110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile			
	115	120	125
Ser Thr Leu Thr			
130			
<210> 87			

<211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_R38X
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (38) .. (38)
 <223> Xaa是任何非天然氨基酸
 <400> 87

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
			20					25					30		
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Xaa	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys
		35					40					45			
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys
	50					55					60				
Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
65				70					75					80	
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
			85					90					95		
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
			100					105					110		
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile
		115					120					125			
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr											
			130												

<210> 88
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_R38X-1
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (37) .. (37)
 <223> Xaa是任何非天然氨基酸
 <400> 88

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Lys Leu Thr Xaa Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 89

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_T41X

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (41) .. (41)

<223> Xaa是任何非天然氨基酸

<400> 89

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Xaa Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 90

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_T41X-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (40) .. (40)

<223> Xaa是任何非天然氨基酸

<400> 90

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Xaa Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 91

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_E68X

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (68) .. (68)

<223> Xaa是任何非天然氨基酸

<400> 91

```

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1           5           10           15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
           20           25           30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
           35           40           45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
           50           55           60
Pro Leu Glu Xaa Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65           70           75           80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
           85           90           95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
           100          105          110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
           115          120          125
Ile Ser Thr Leu Thr
           130

```

<210> 92

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_E68X-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (67) .. (67)

<223> Xaa是任何非天然氨基酸

<400> 92

```

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

```

1	5	10	15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn			
20	25	30	
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys			
35	40	45	
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro			
50	55	60	
Leu Glu Xaa Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg			
65	70	75	80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys			
85	90	95	
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr			
100	105	110	
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile			
115	120	125	
Ser Thr Leu Thr			
130			
<210>	93		
<211>	133		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的:IL-2_Y45X		
<220>			
<221>	尚未归类的特征		
<222>	(45) .. (45)		
<223>	Xaa是任何非天然氨基酸		
<400>	93		
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His			
1	5	10	15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys			
20	25	30	
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Xaa Met Pro Lys			
35	40	45	
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys			
50	55	60	
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu			
65	70	75	80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu			

				85					90					95			
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala		
			100					105					110				
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile		
		115				120						125					
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr													
	130																
<210>	94																
<211>	132																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	合成的:IL-2_Y45X-1																
<220>																	
<221>	尚未归类的特征																
<222>	(44) .. (44)																
<223>	Xaa是任何非天然氨基酸																
<400>	94																
Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu		
1				5				10					15				
Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys	Asn		
			20					25					30				
Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Xaa	Met	Pro	Lys	Lys		
		35				40						45					
Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Pro		
	50					55						60					
Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg		
65				70				75						80			
Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Lys		
			85					90					95				
Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	Thr		
			100					105					110				
Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	Ile		
		115				120						125					
Ser	Thr	Leu	Thr														
	130																
<210>	95																
<211>	133																
<212>	PRT																

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_V69X

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (69) .. (69)

<223> Xaa是任何非天然氨基酸

<400> 95

Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His
1				5				10					15		
Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
			20				25					30			
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys
		35				40					45				
Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys
	50					55				60					
Pro	Leu	Glu	Glu	Xaa	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu
65				70				75					80		
Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu
			85					90					95		
Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
			100					105					110		
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile
		115					120					125			
Ile	Ser	Thr	Leu	Thr											
			130												

<210> 96

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_V69X-1

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (68) .. (68)

<223> Xaa是任何非天然氨基酸

<400> 96

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

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Xaa Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile
 115 120 125

Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 97

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的:IL-2_L72X

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (72) .. (72)

<223> Xaa是任何非天然氨基酸

<400> 97

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Xaa Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 <210> 98
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的:IL-2_L72X-1
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (71) .. (71)
 <223> Xaa是任何非天然氨基酸
 <400> 98
 Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Xaa Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr
 130

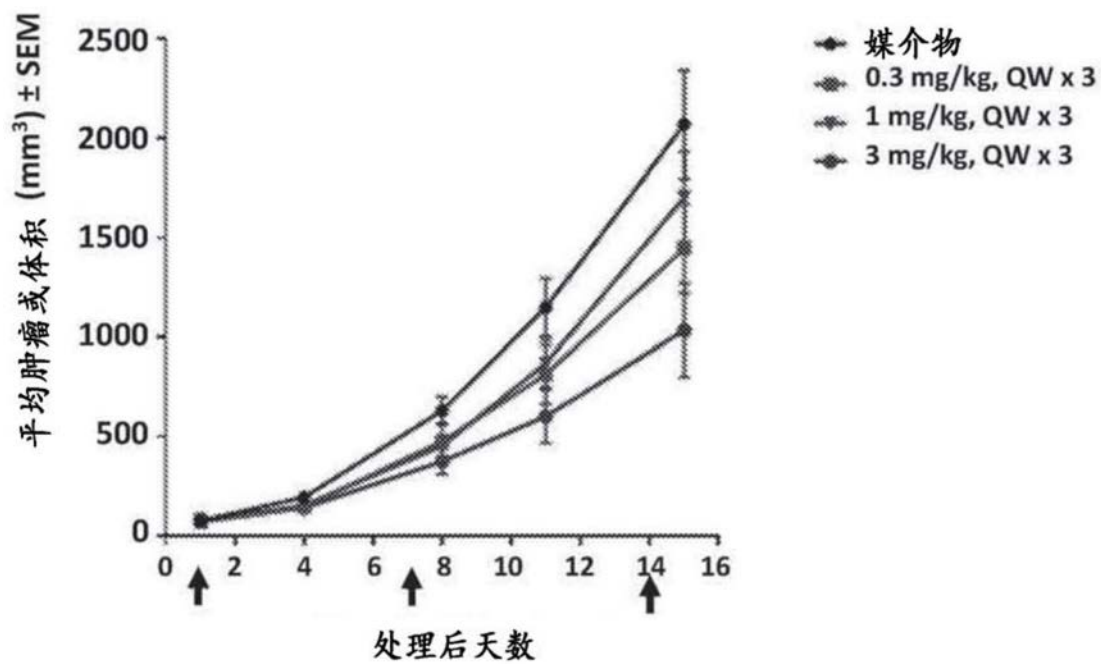


图1

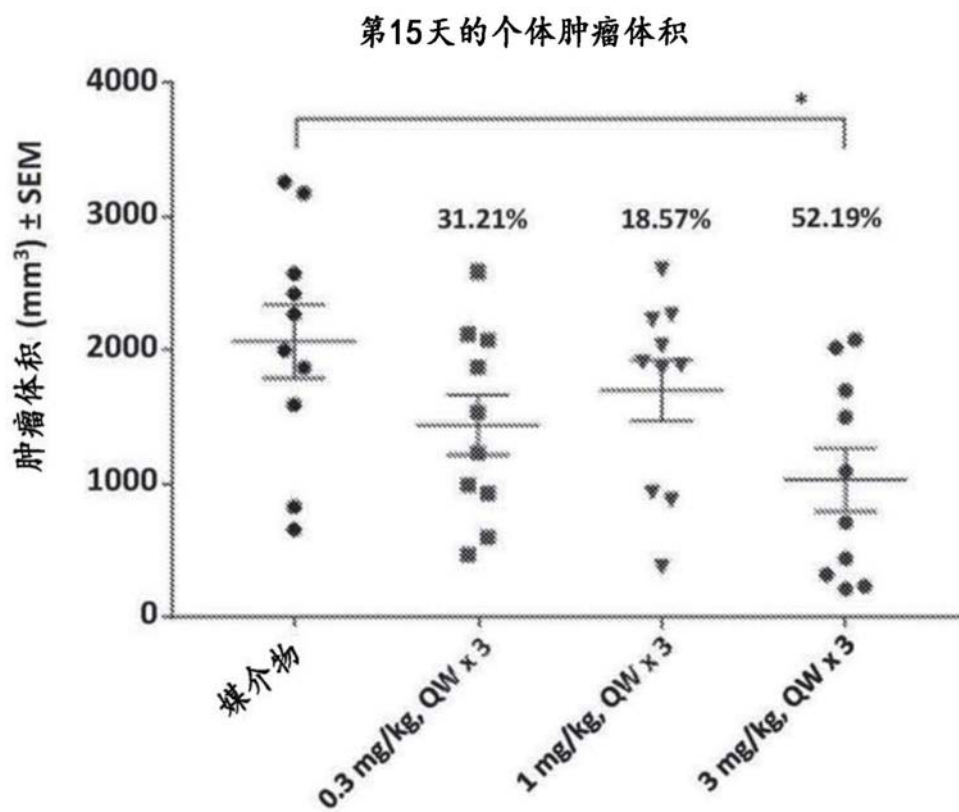


图2

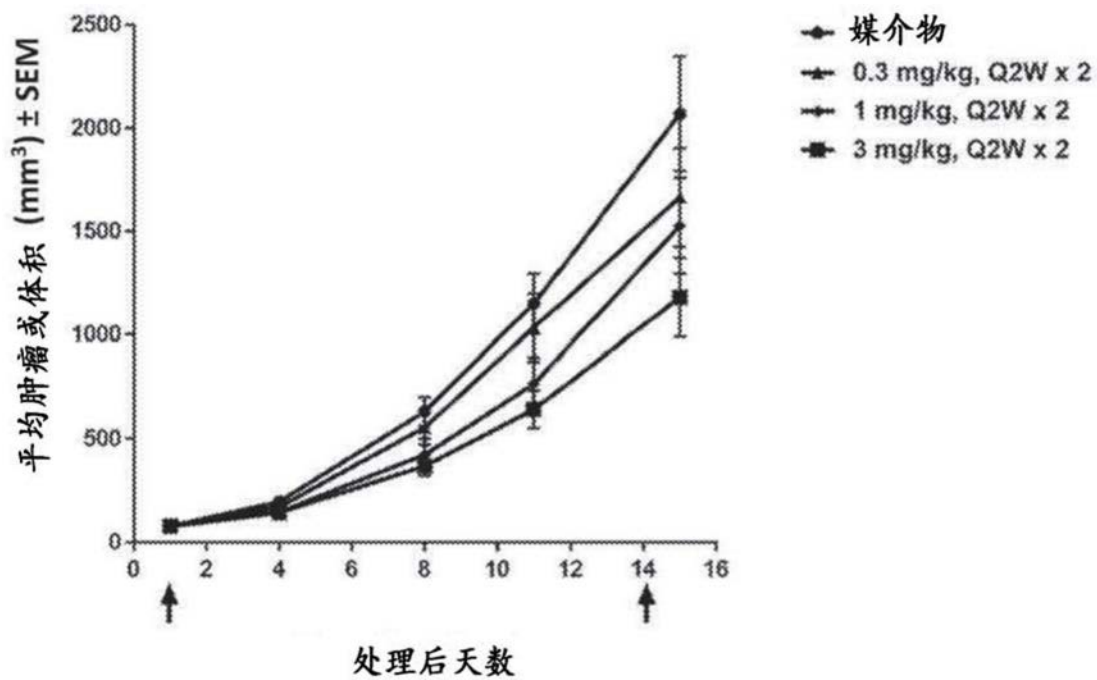


图3

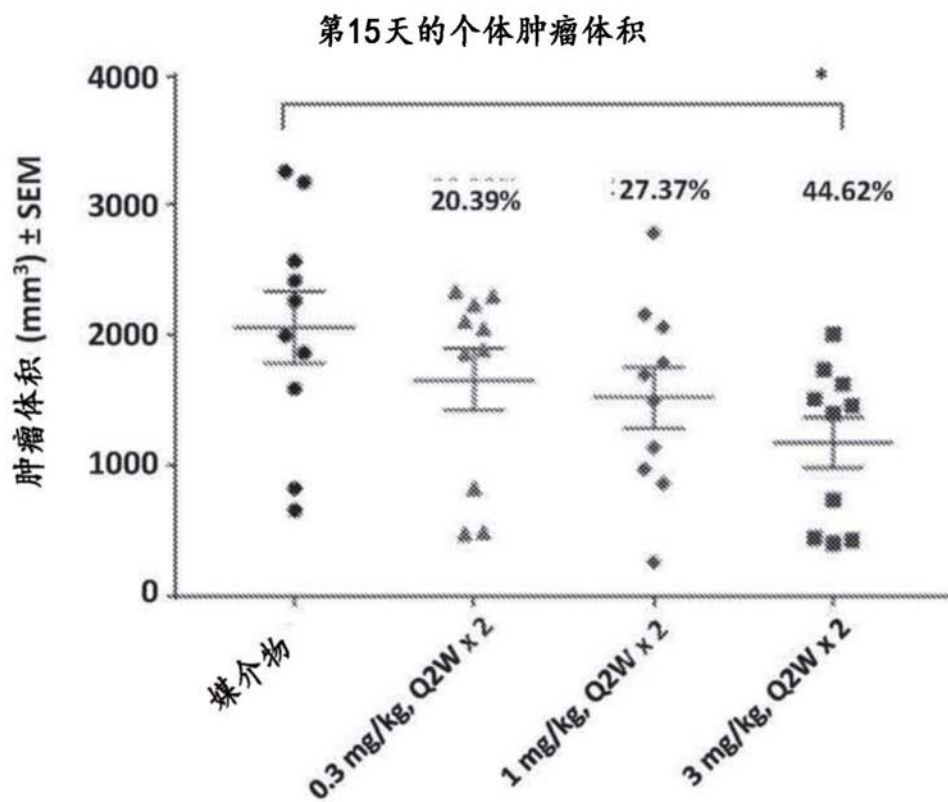


图4

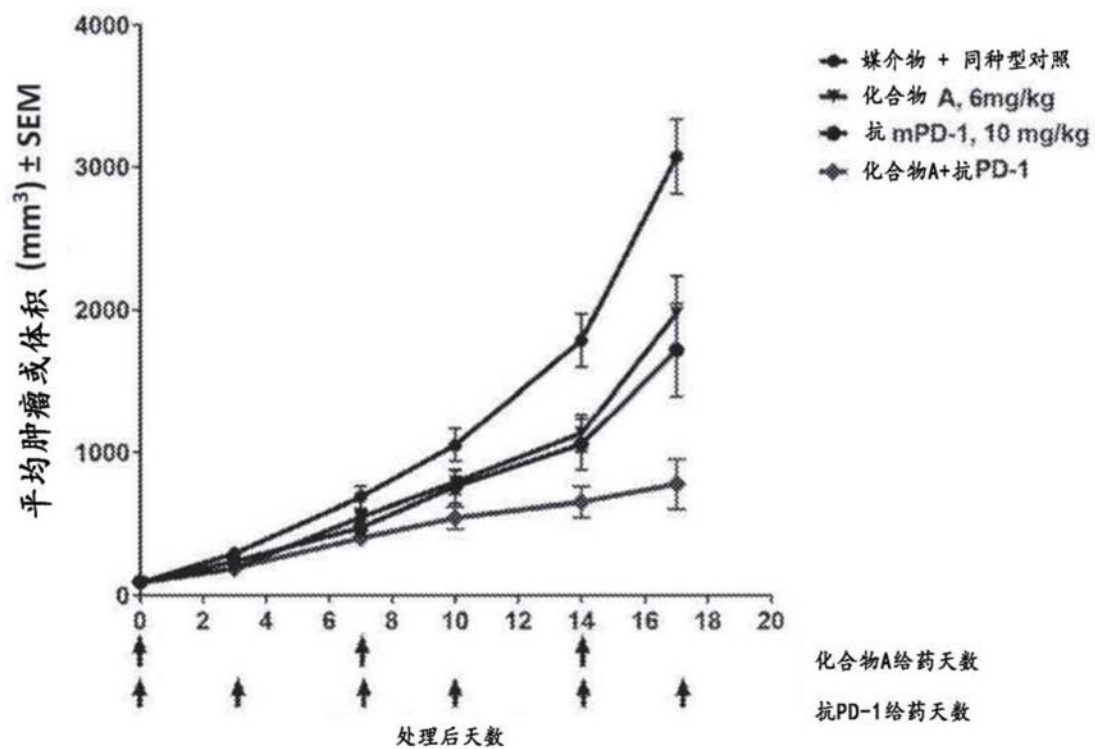


图5

第17天的个体肿瘤体积

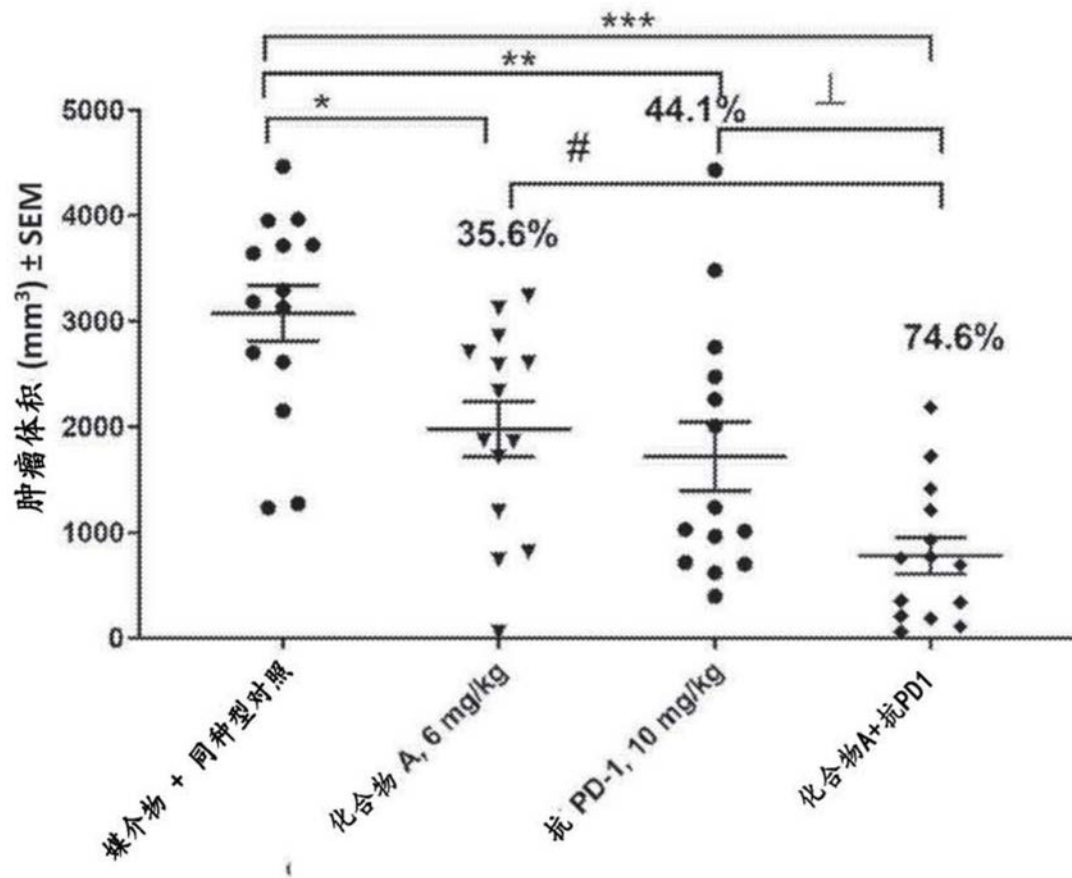


图6

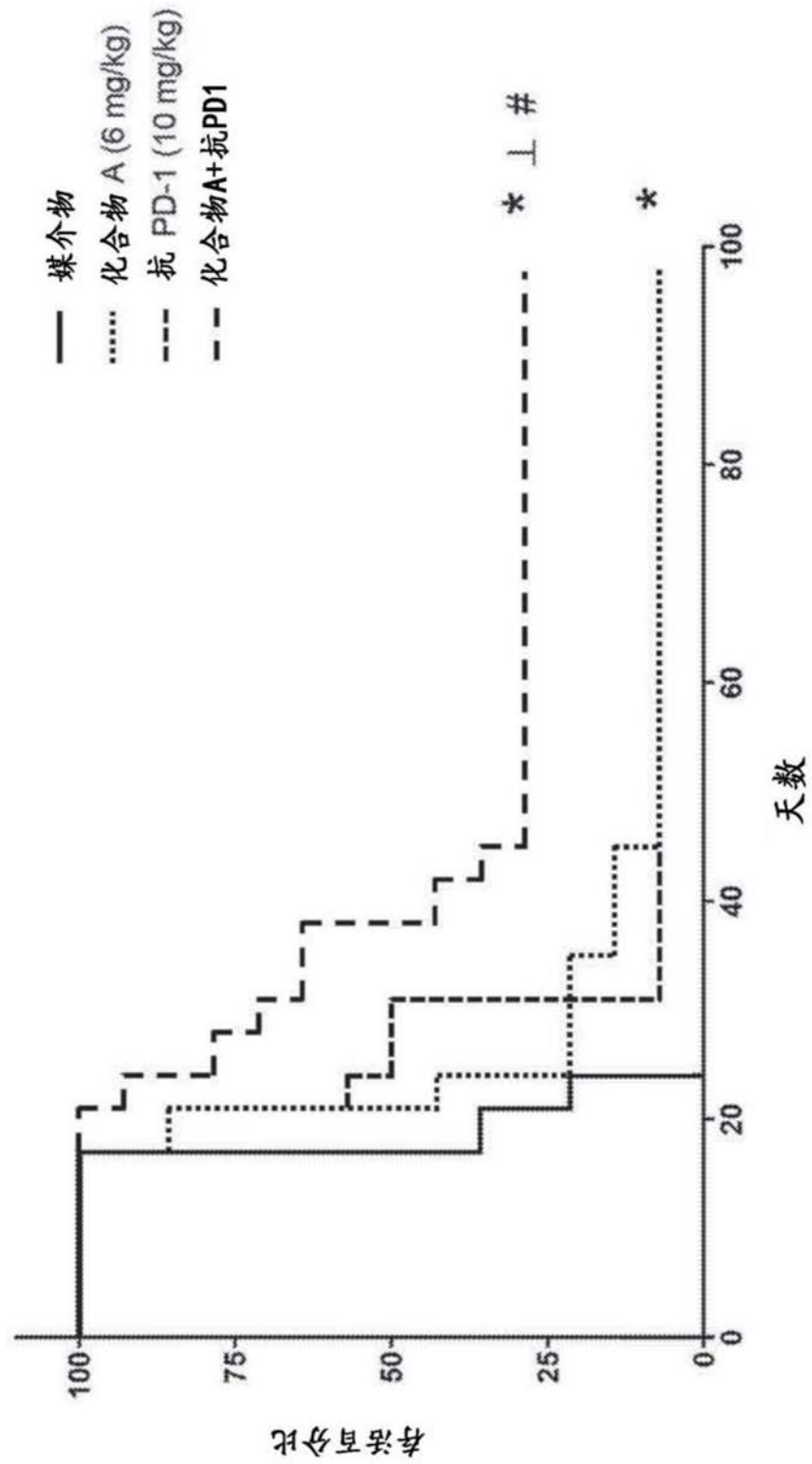


图7

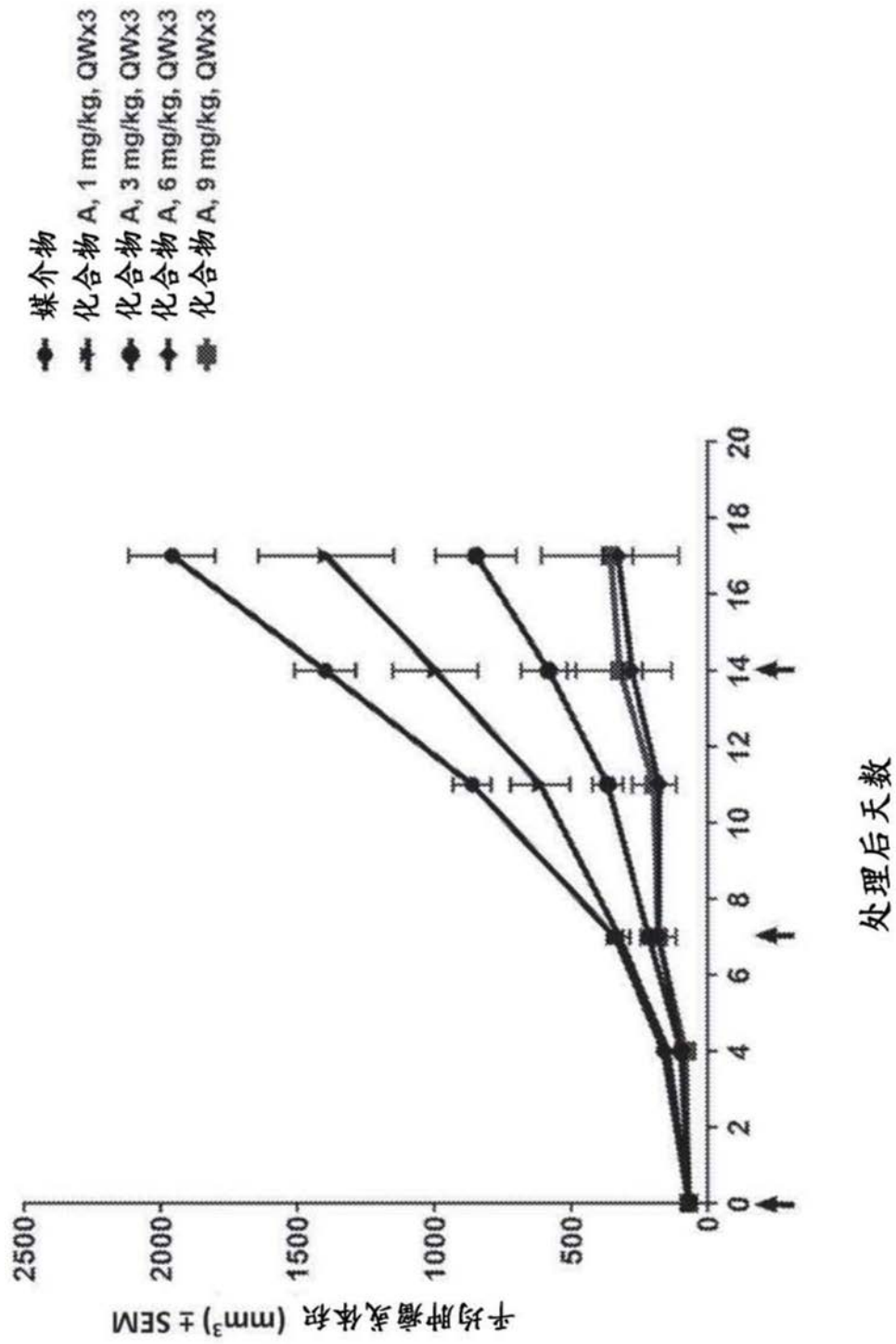


图8

第15天的个体肿瘤体积

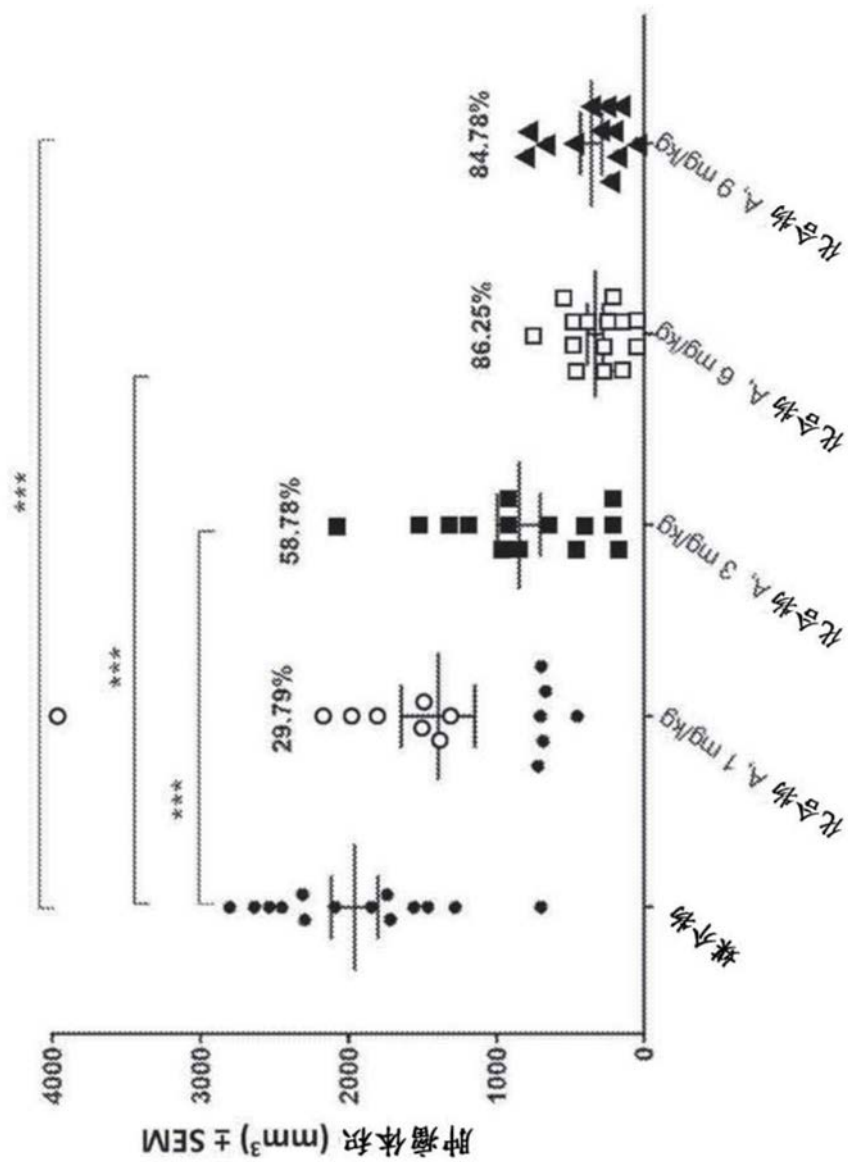


图9

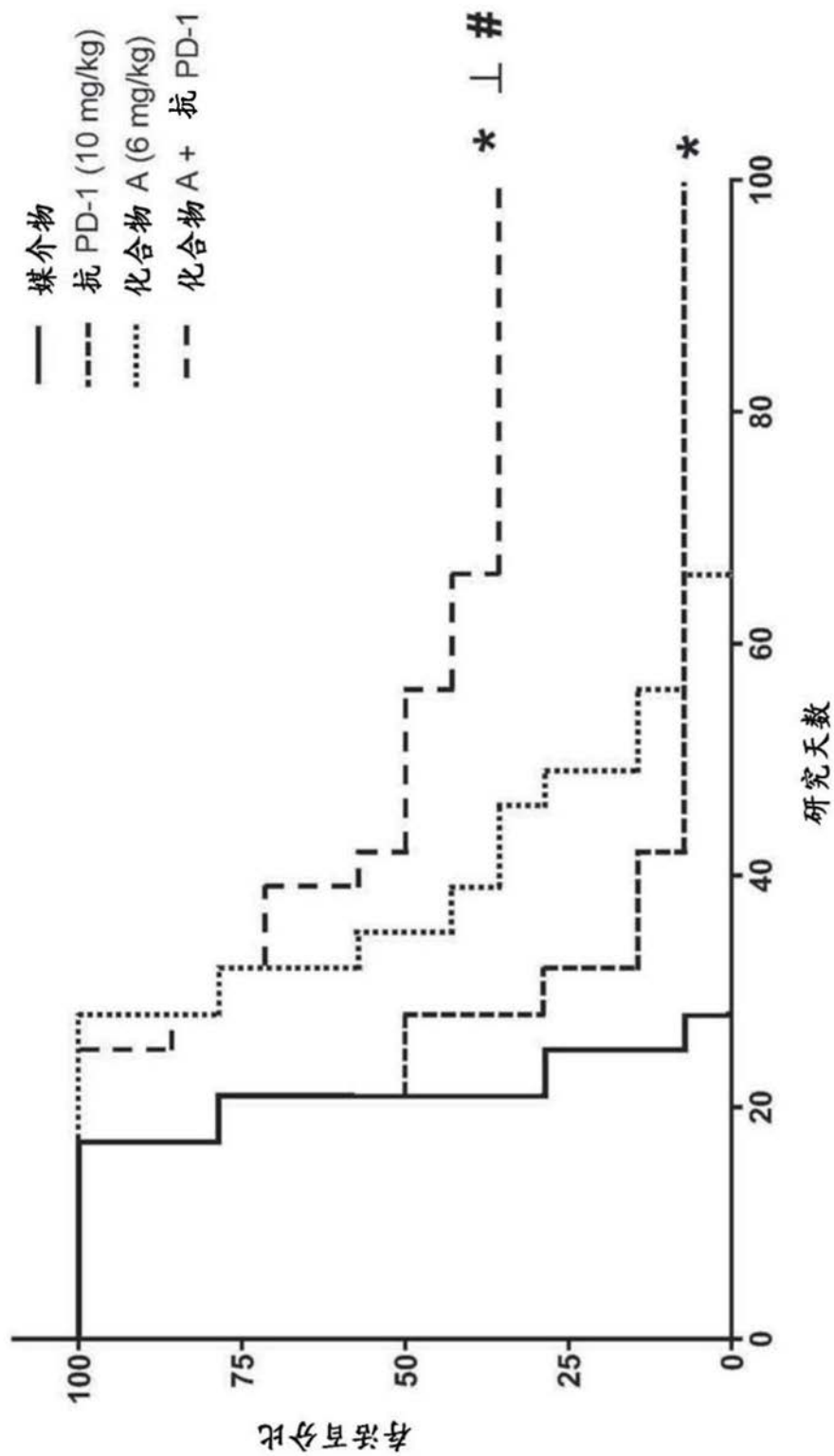


图10

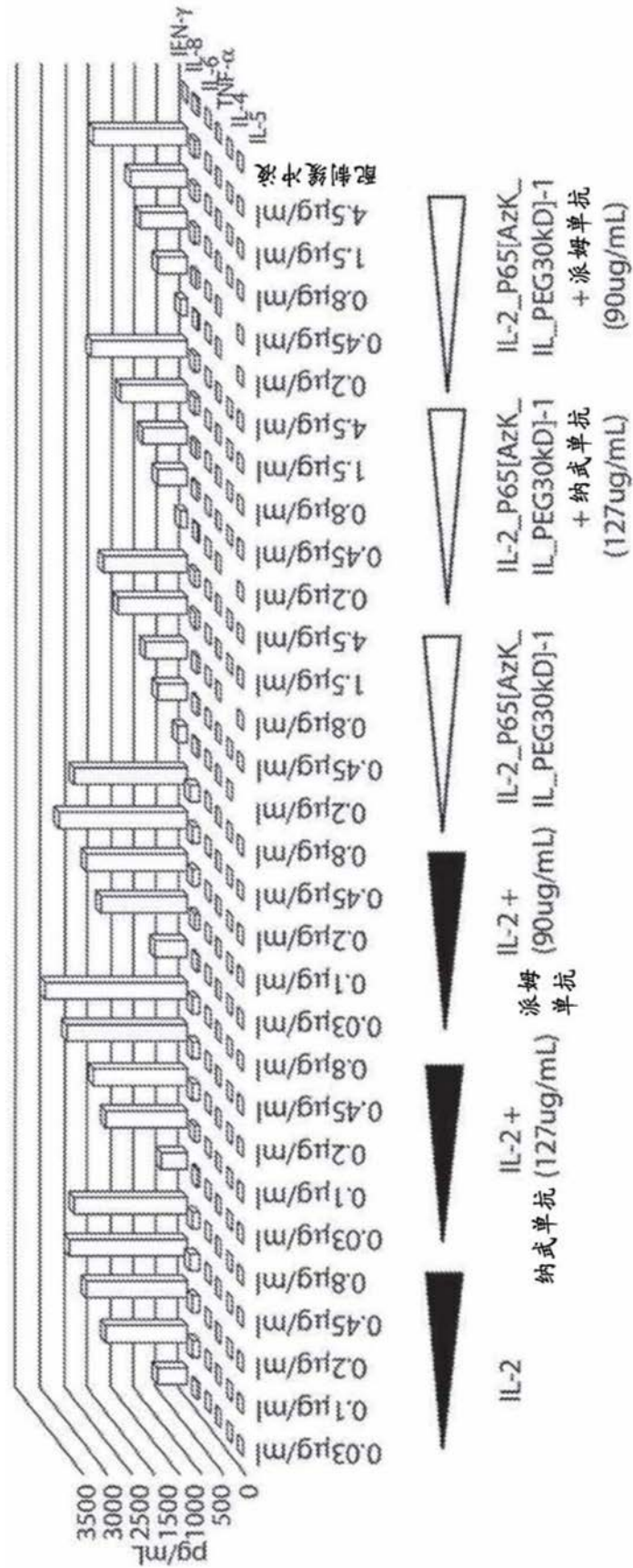


图11A

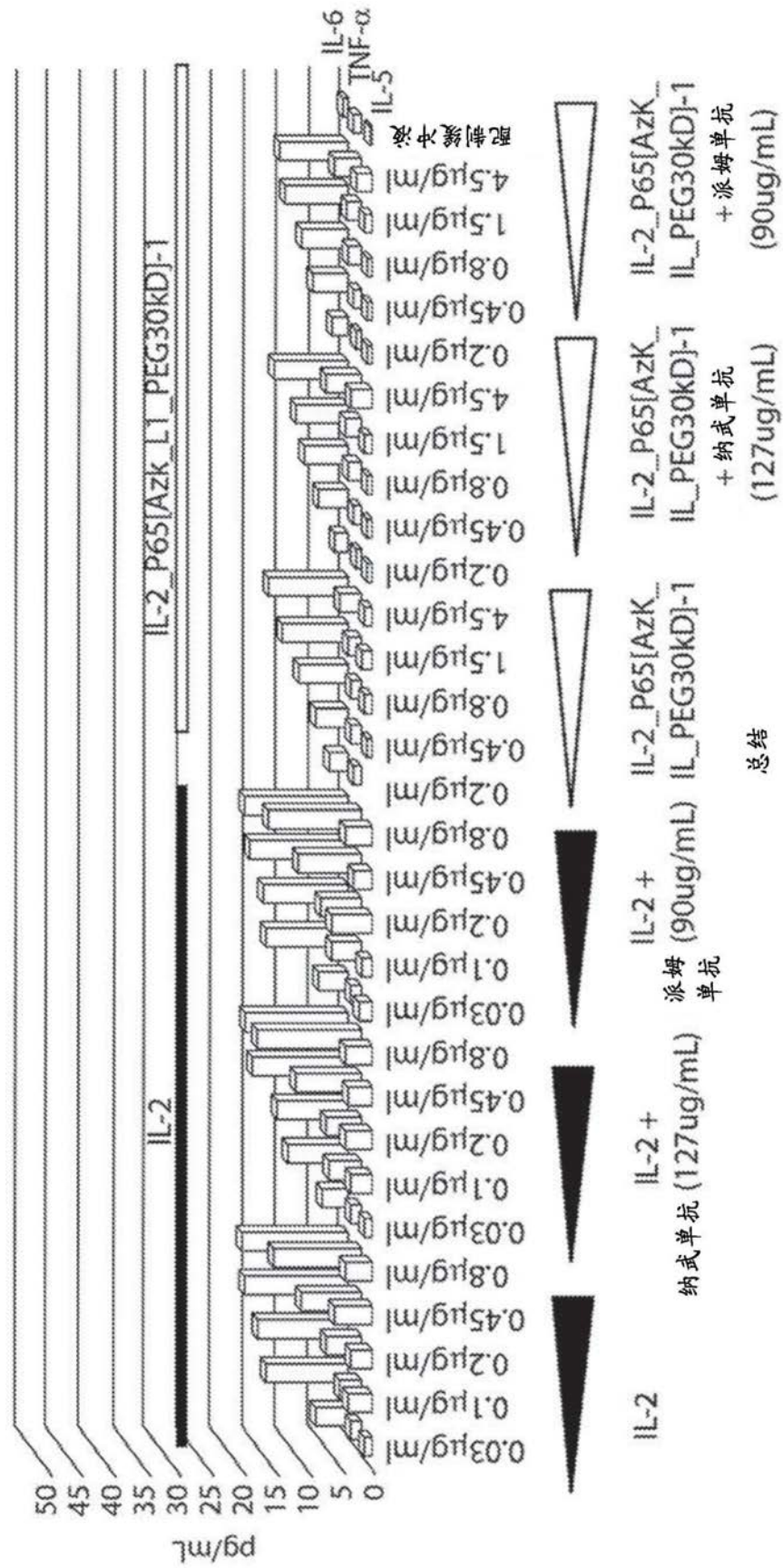


图11B

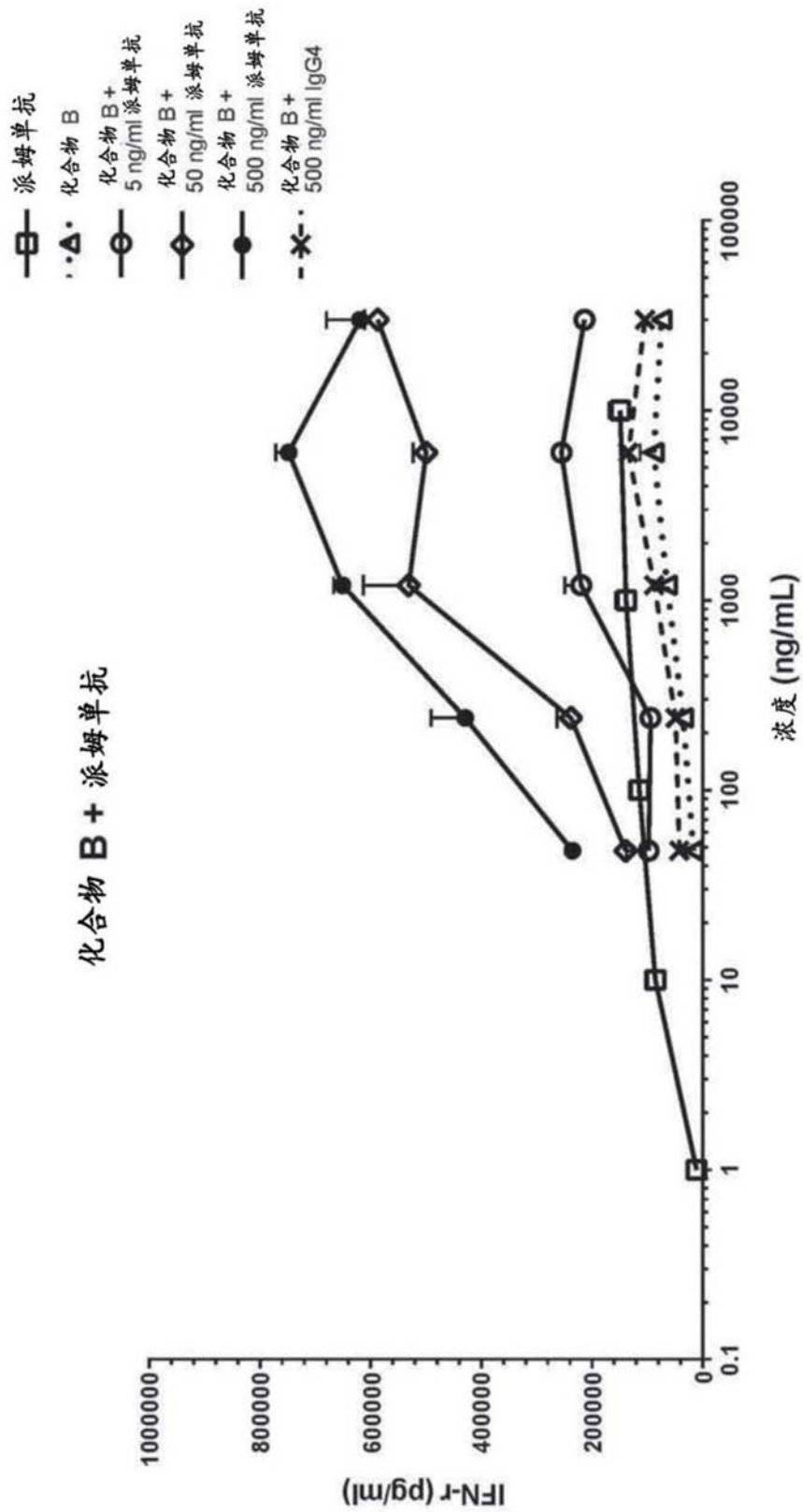


图12

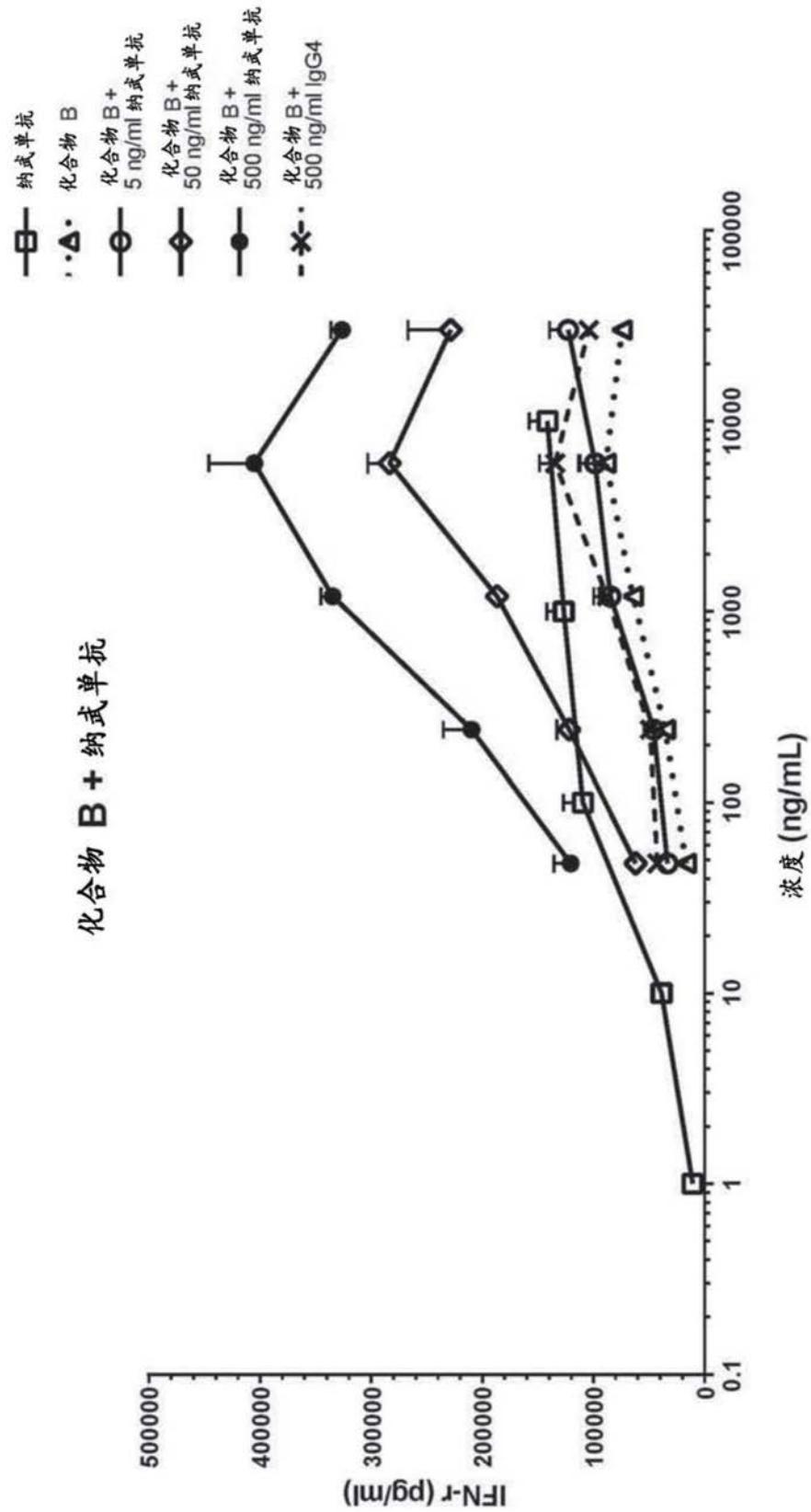


图13

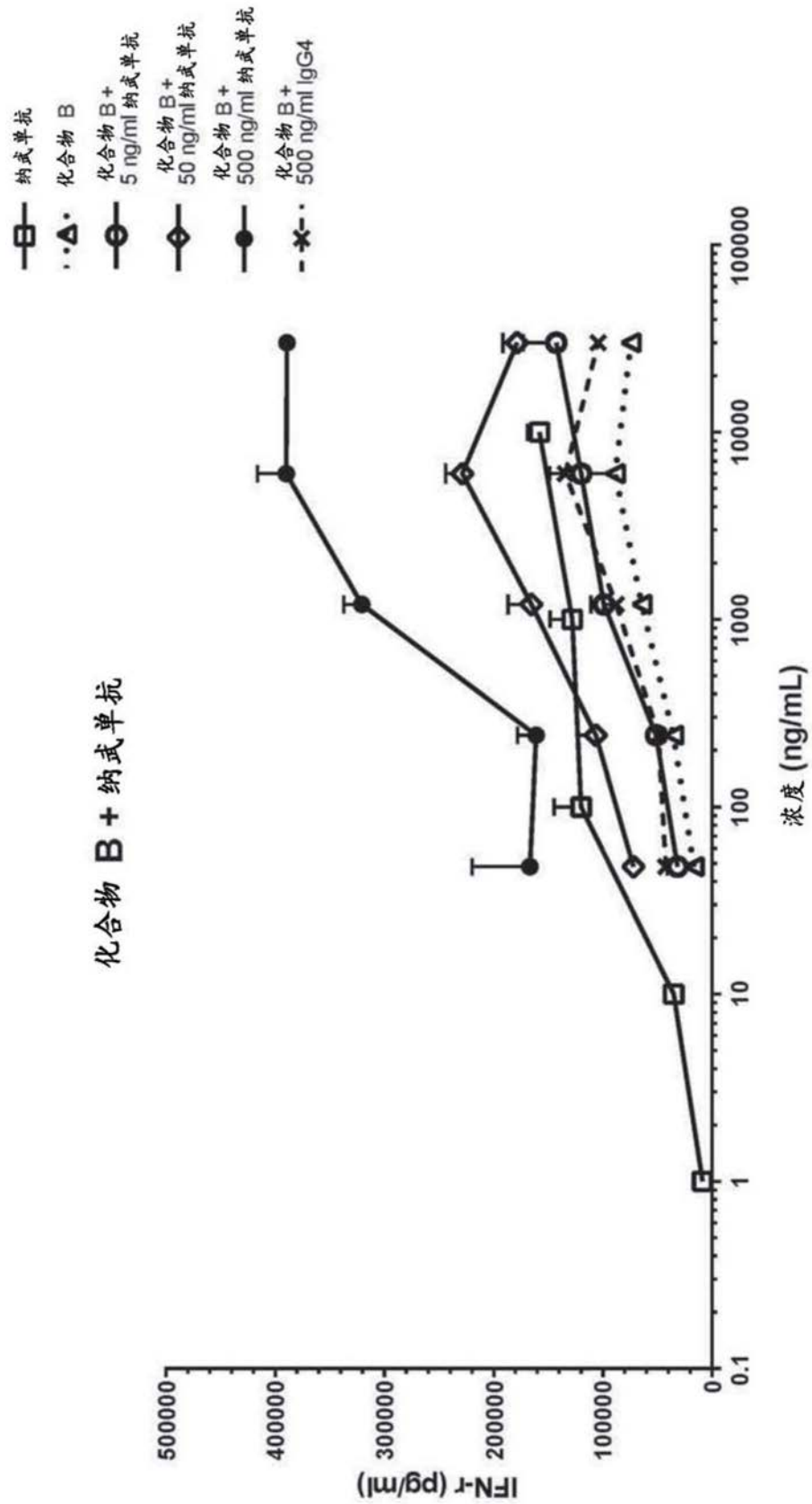


图14

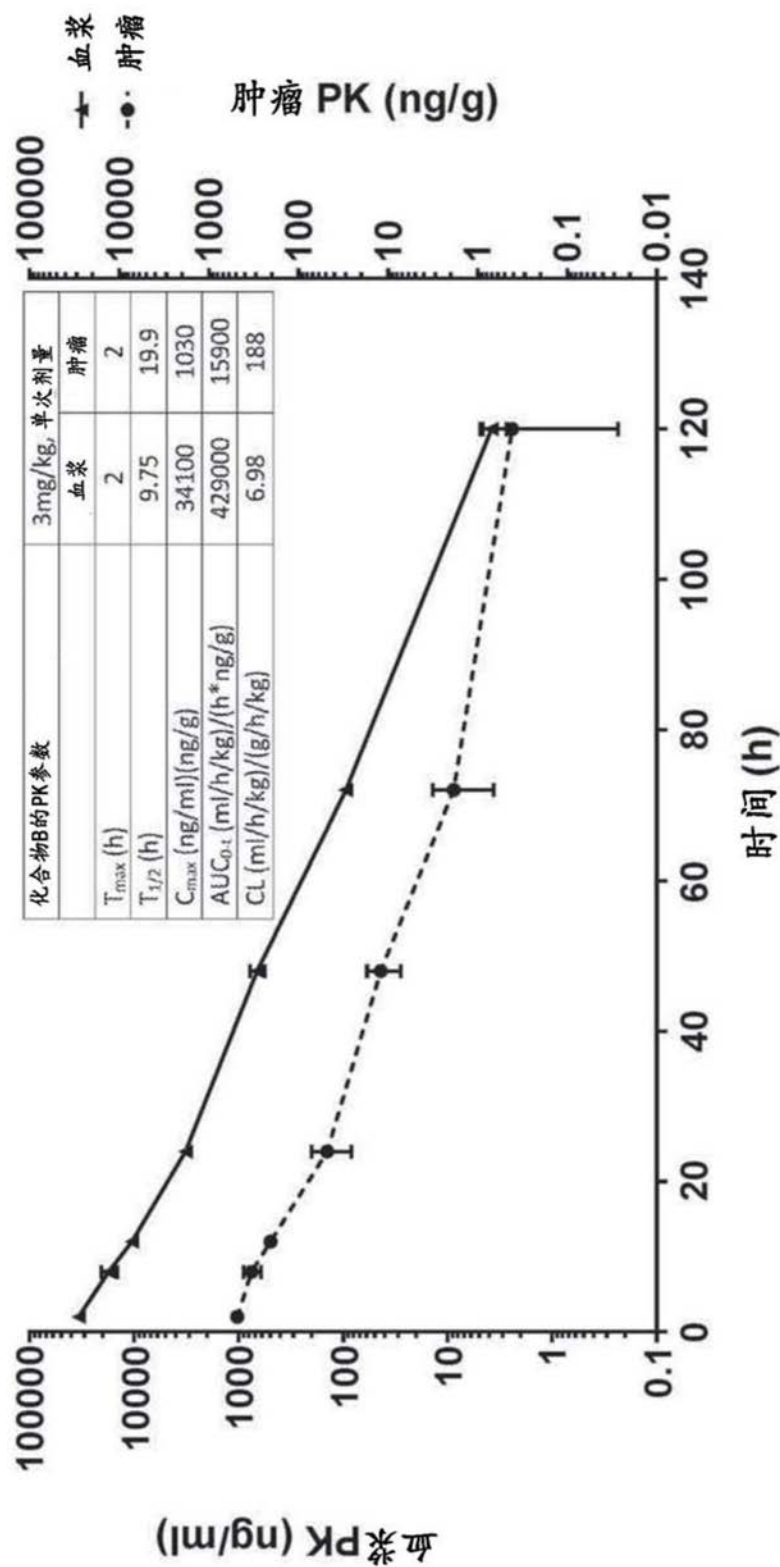


图15

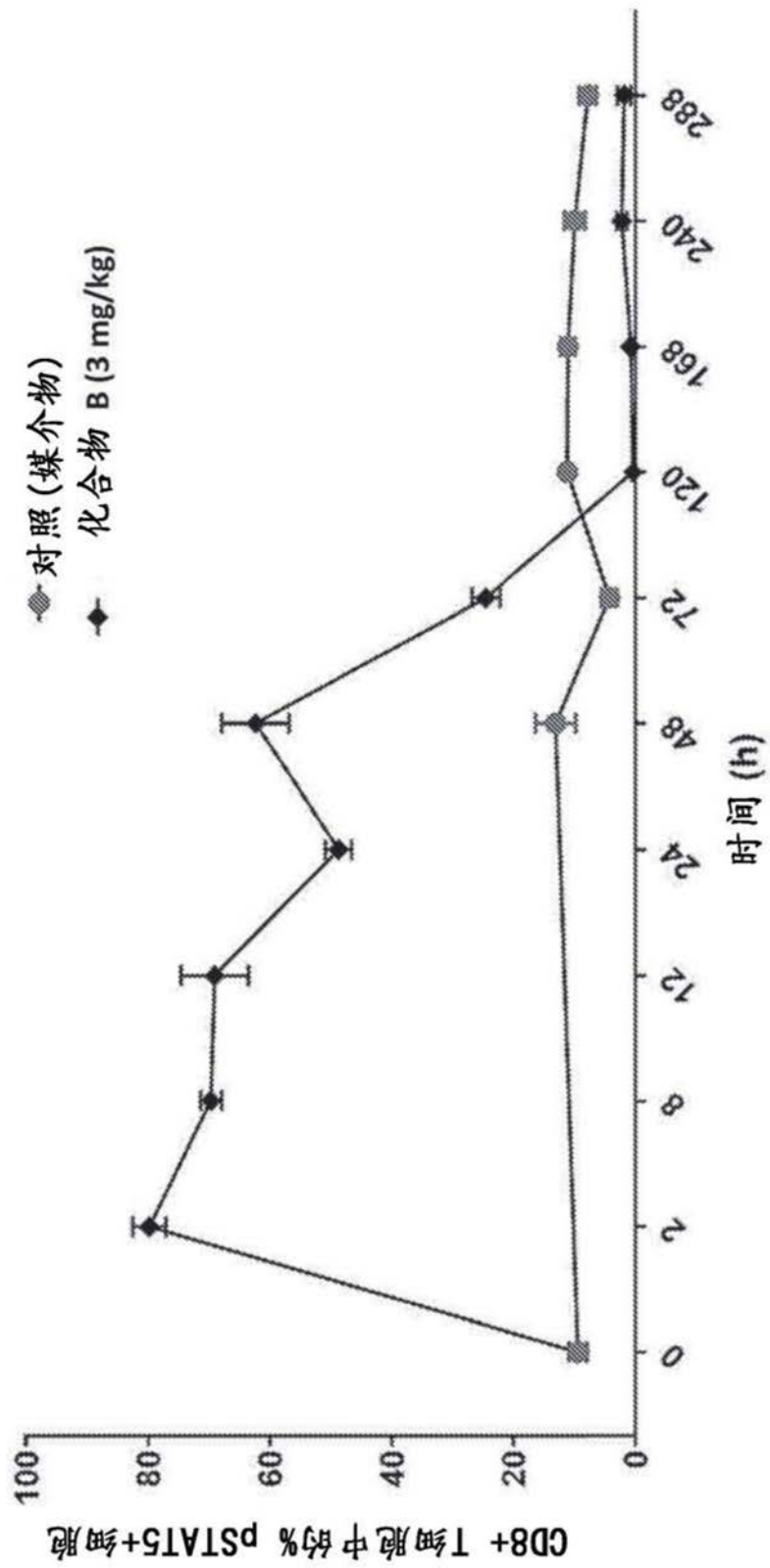


图16A

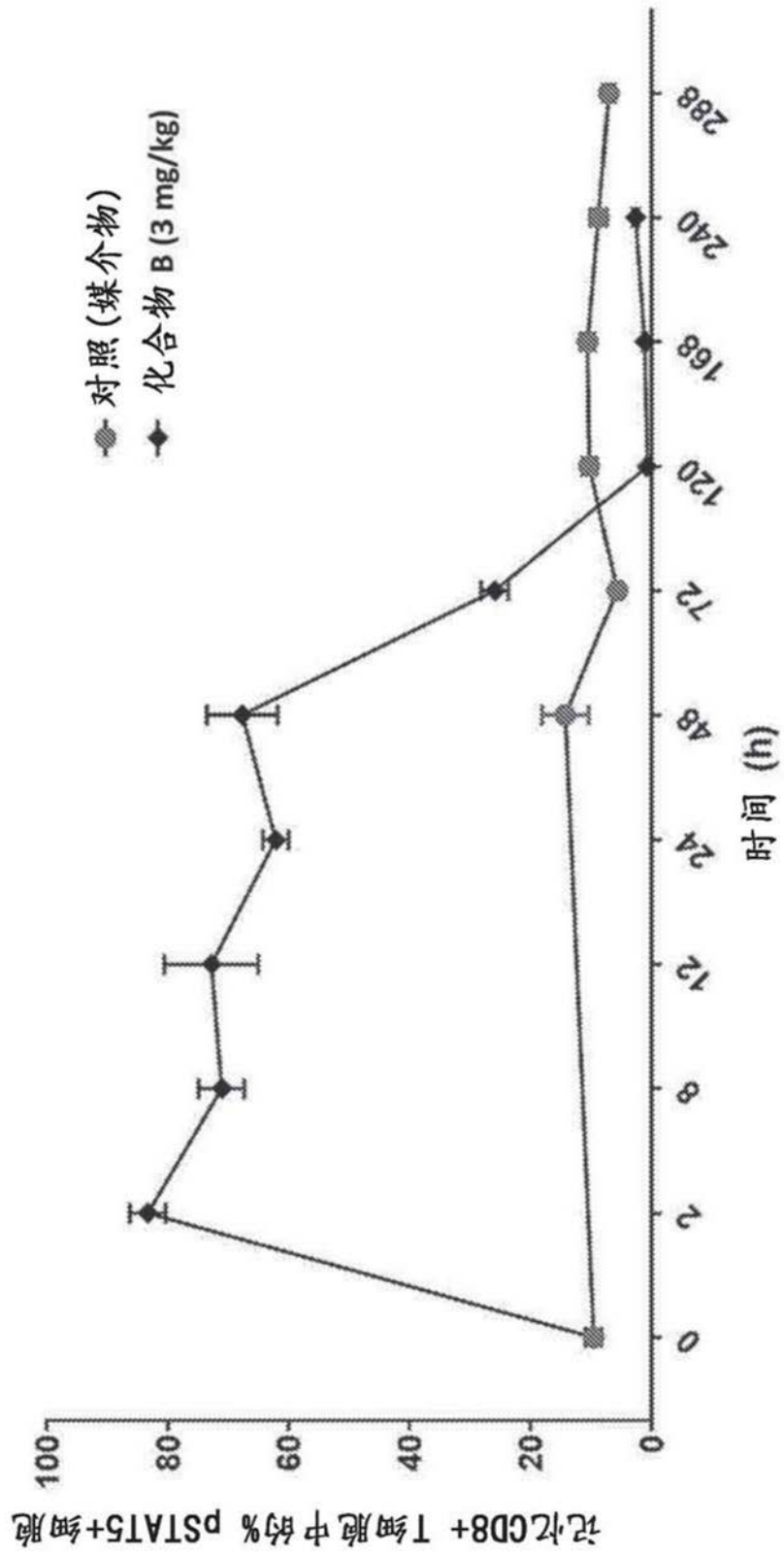


图16B

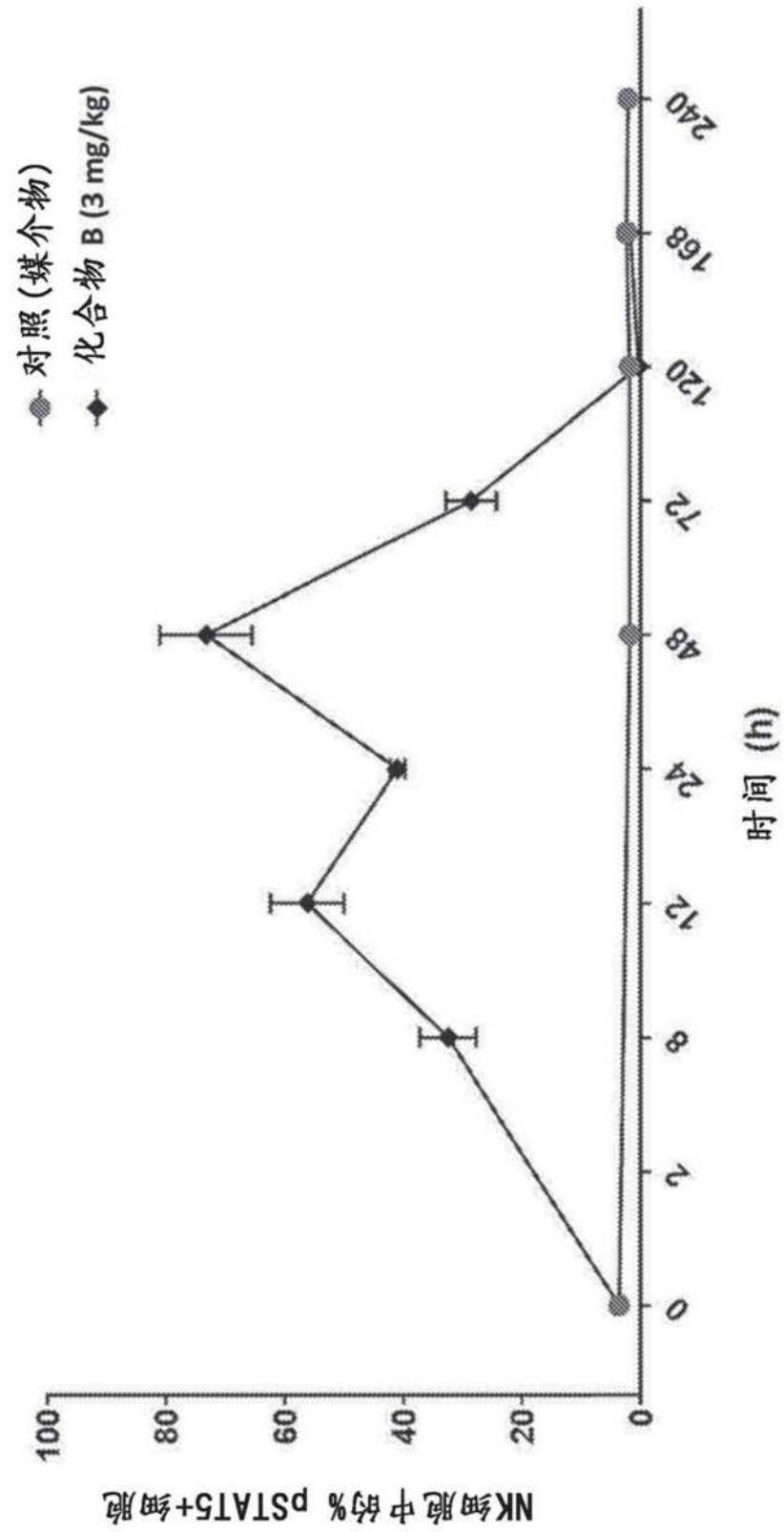


图16C

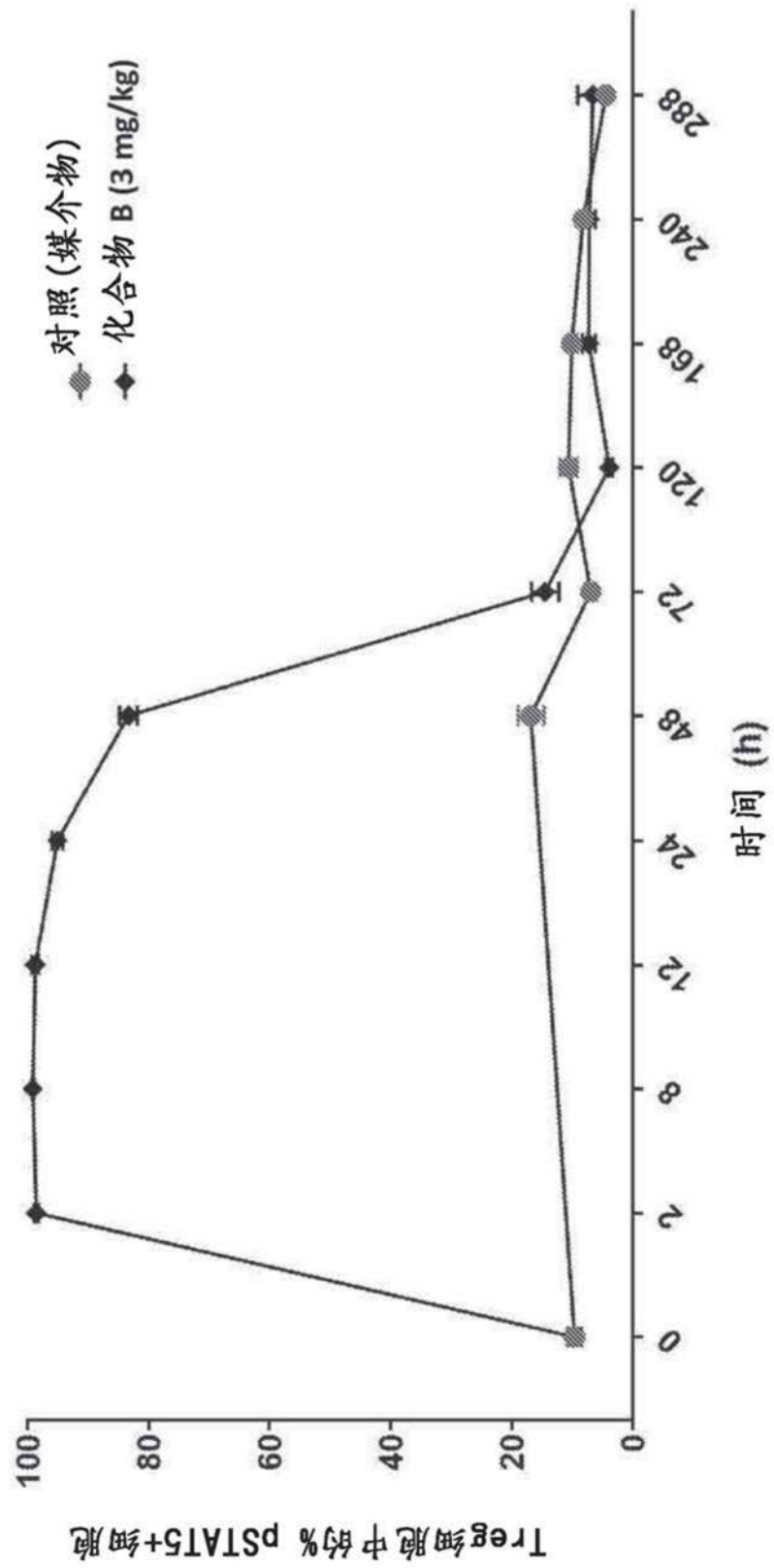


图16D

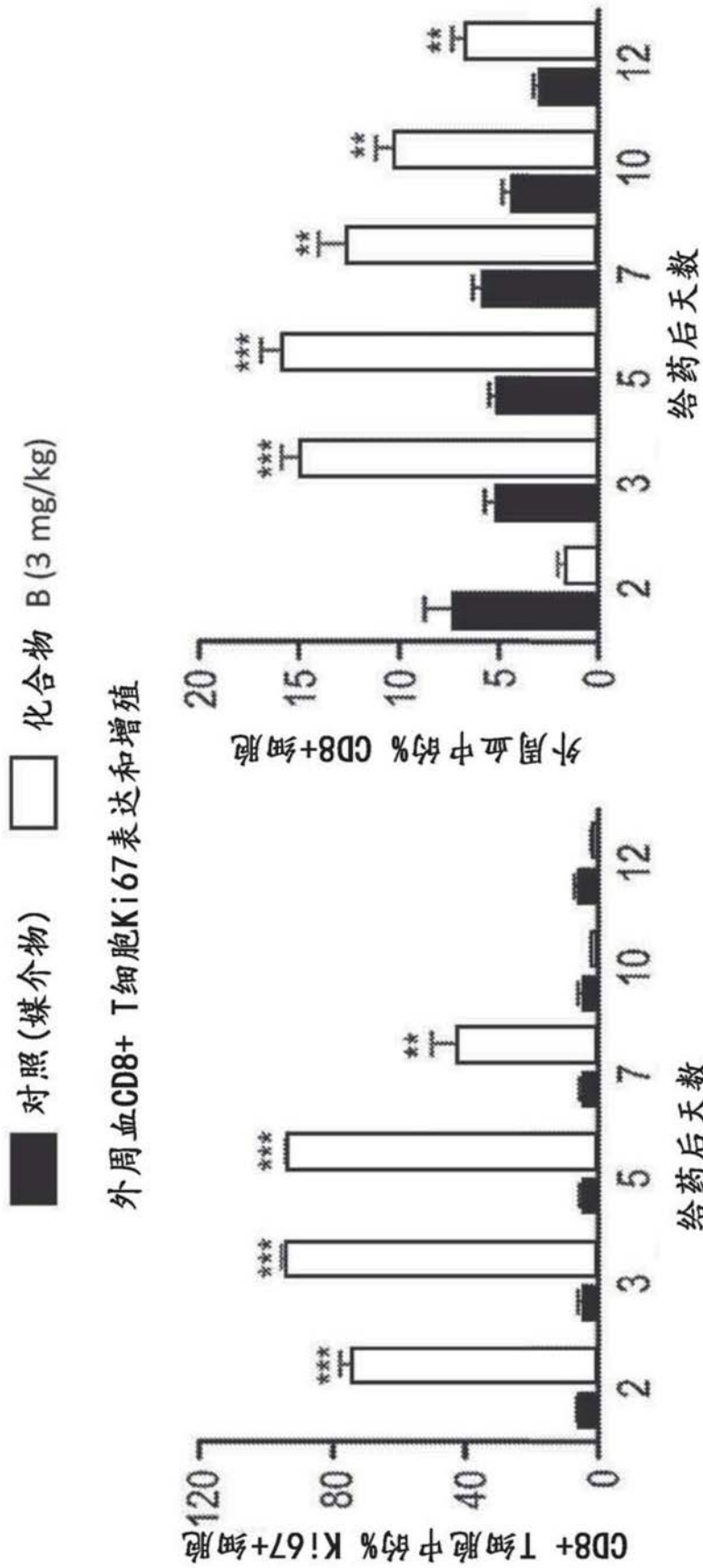


图 17A

图 17B

■ 对照 (媒介物) □ 化合物 B (3 mg/kg)

外周血NK细胞Ki67表达和增殖

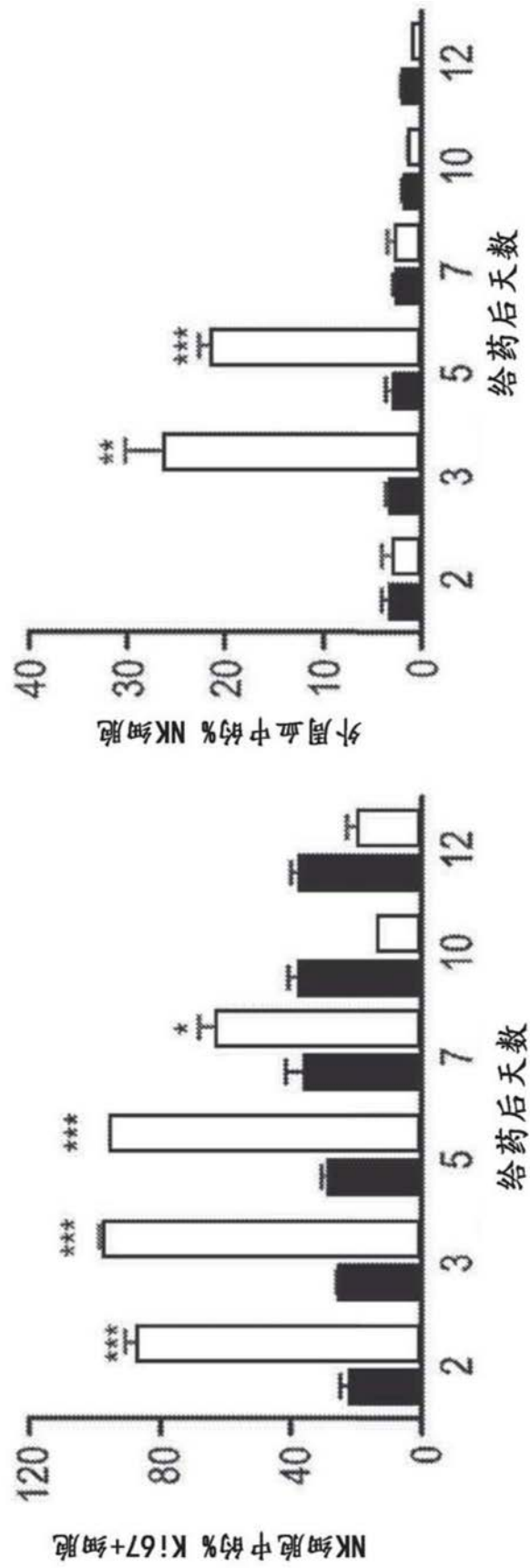


图 17C

图 17D

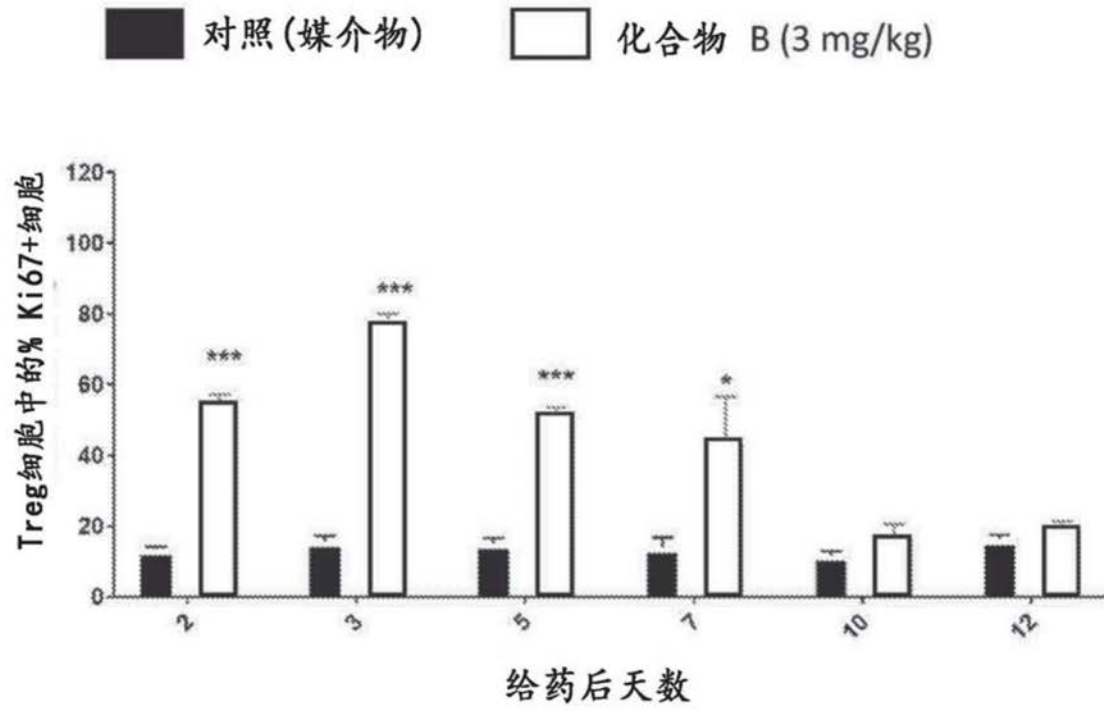


图17E

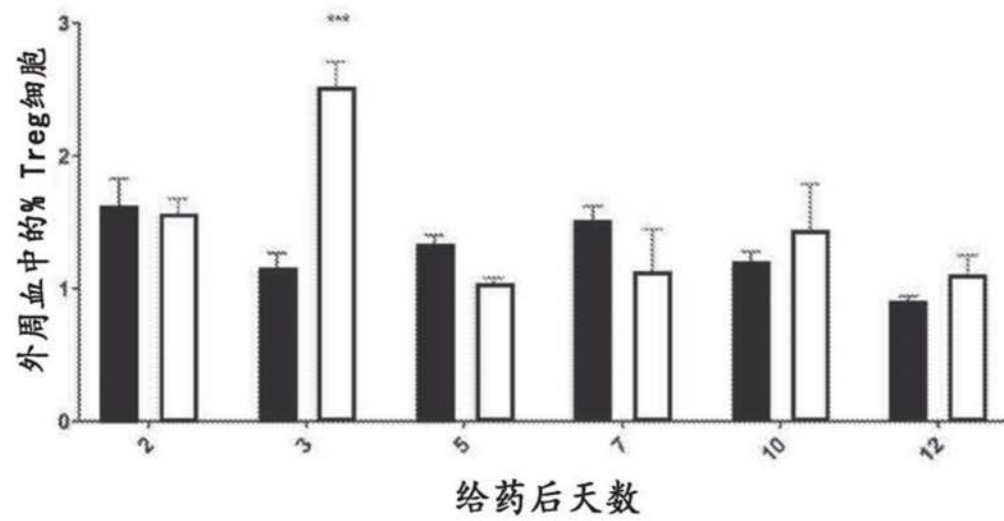


图17F

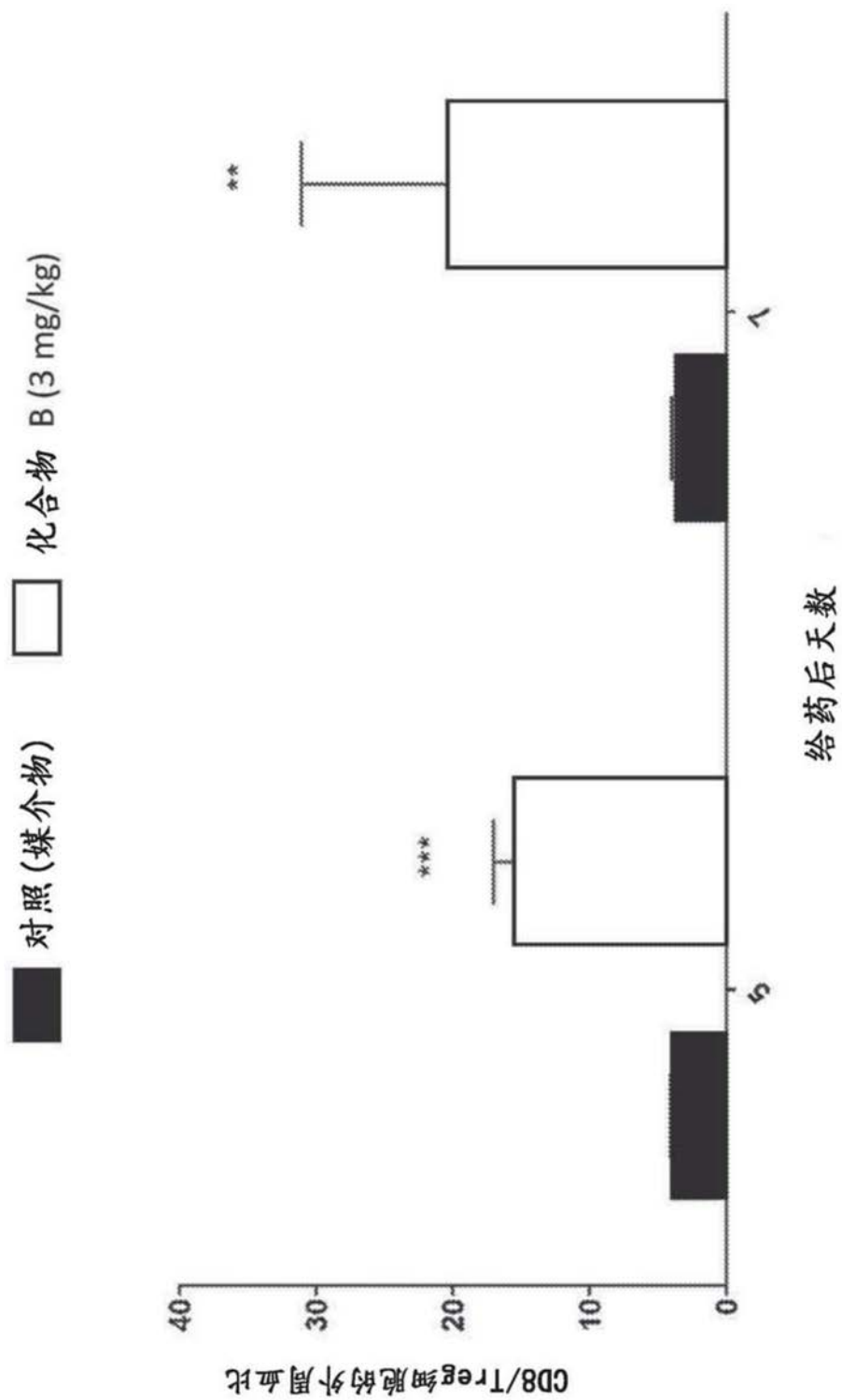


图17G

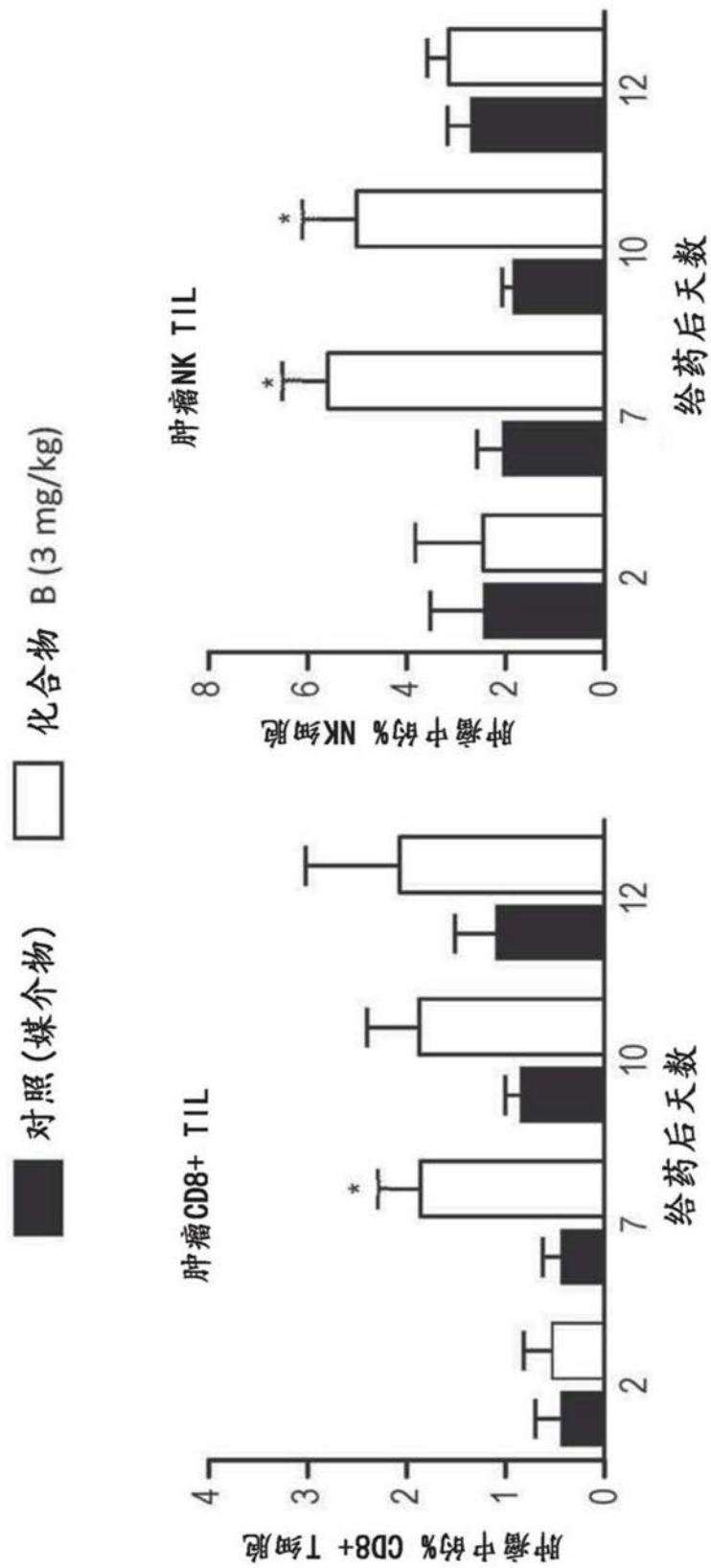


图18B

图18A

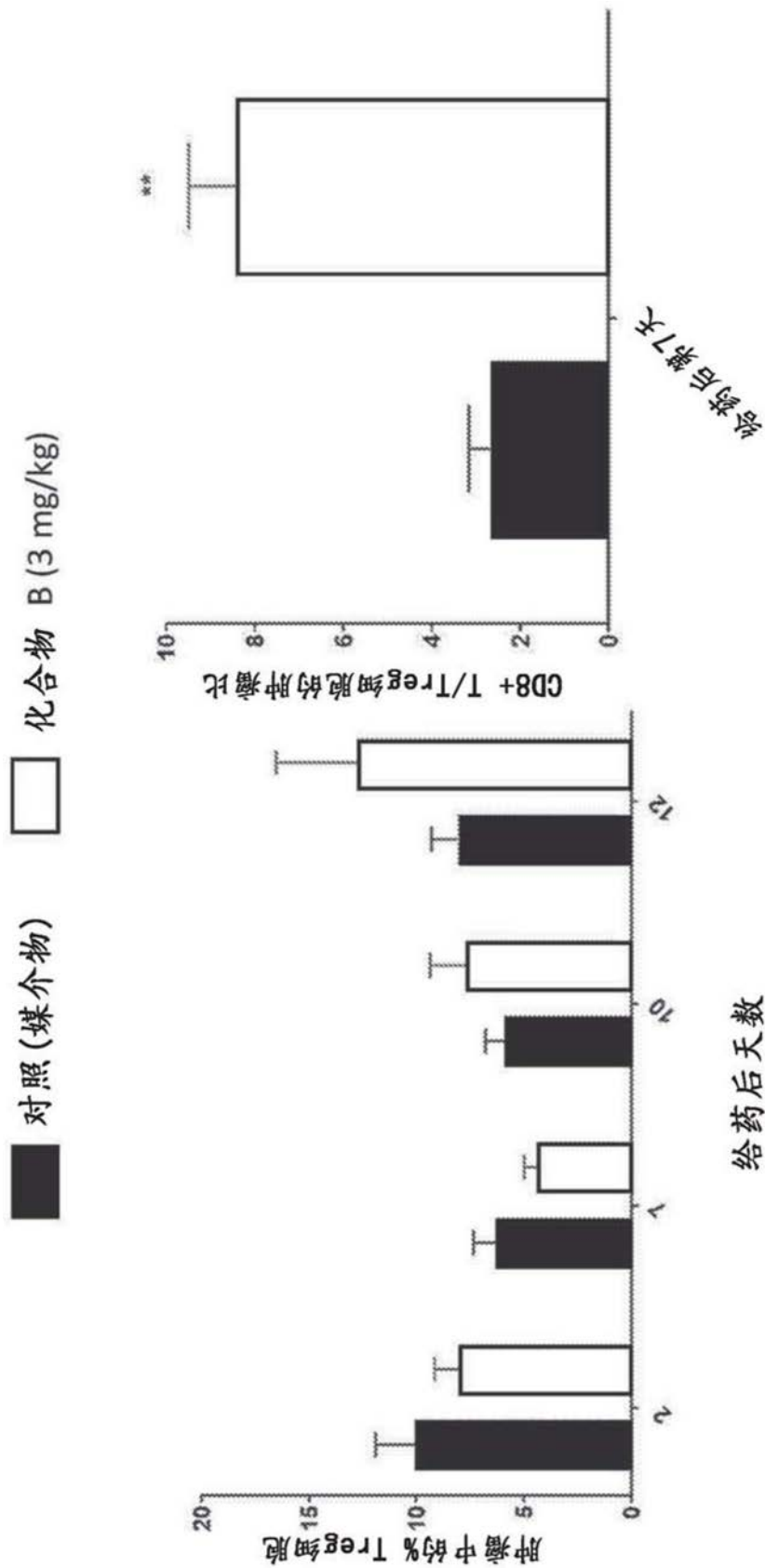


图18C

图18D

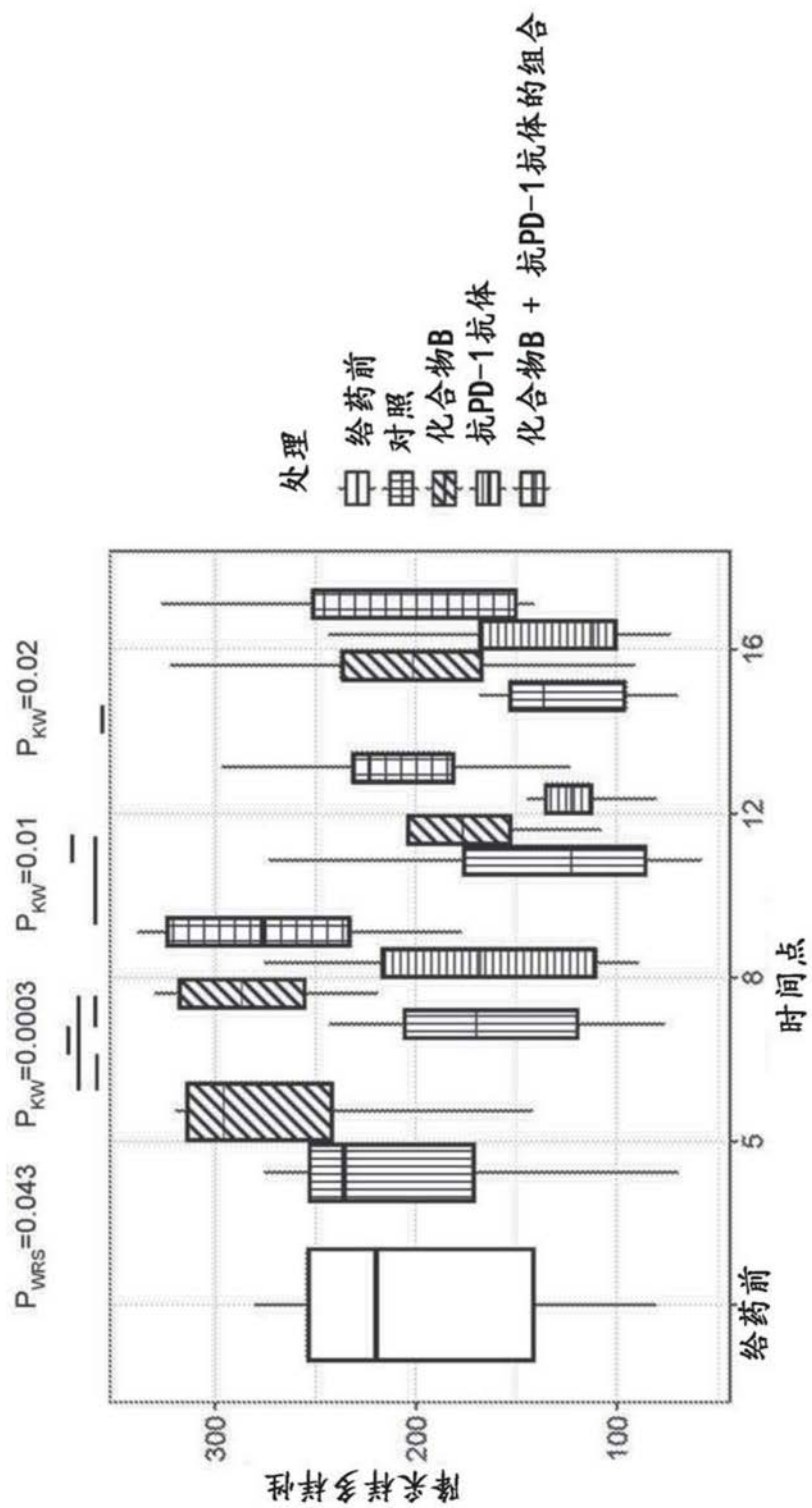


图19

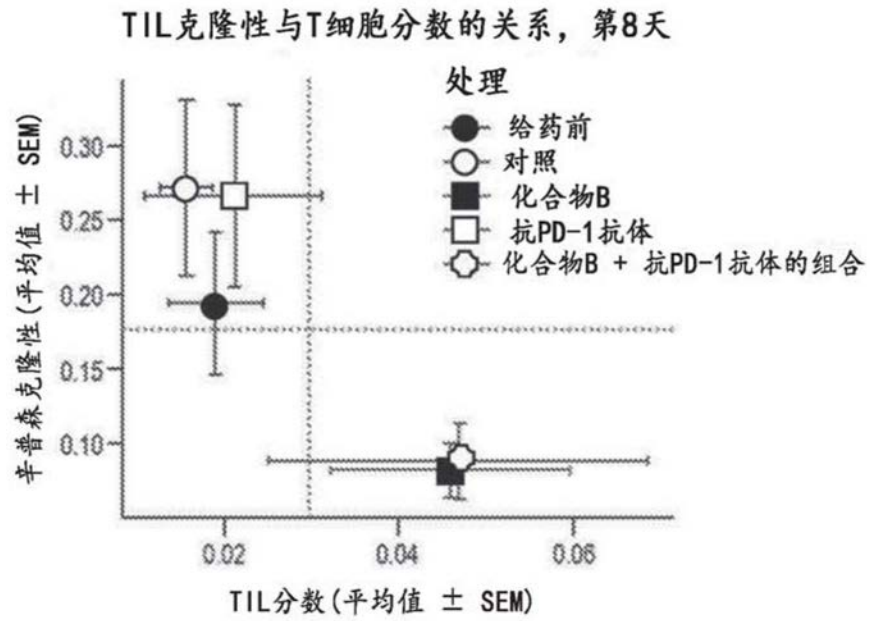


图20

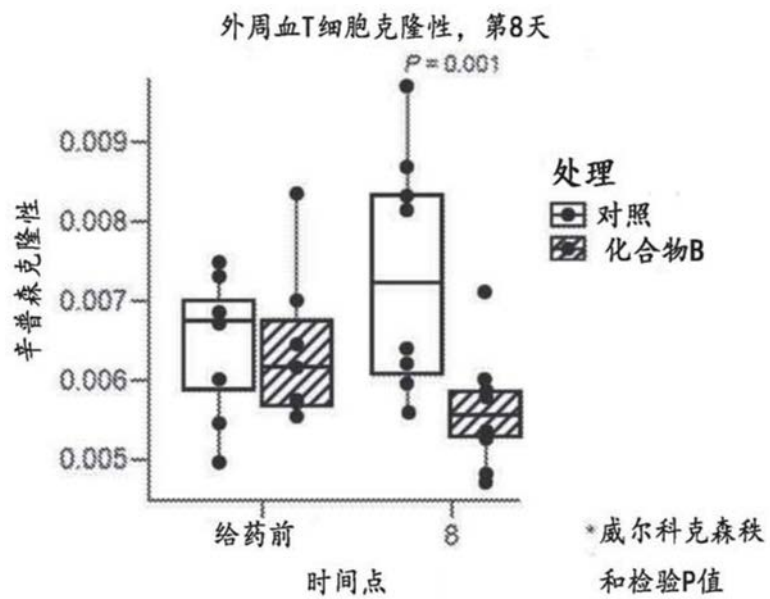


图21

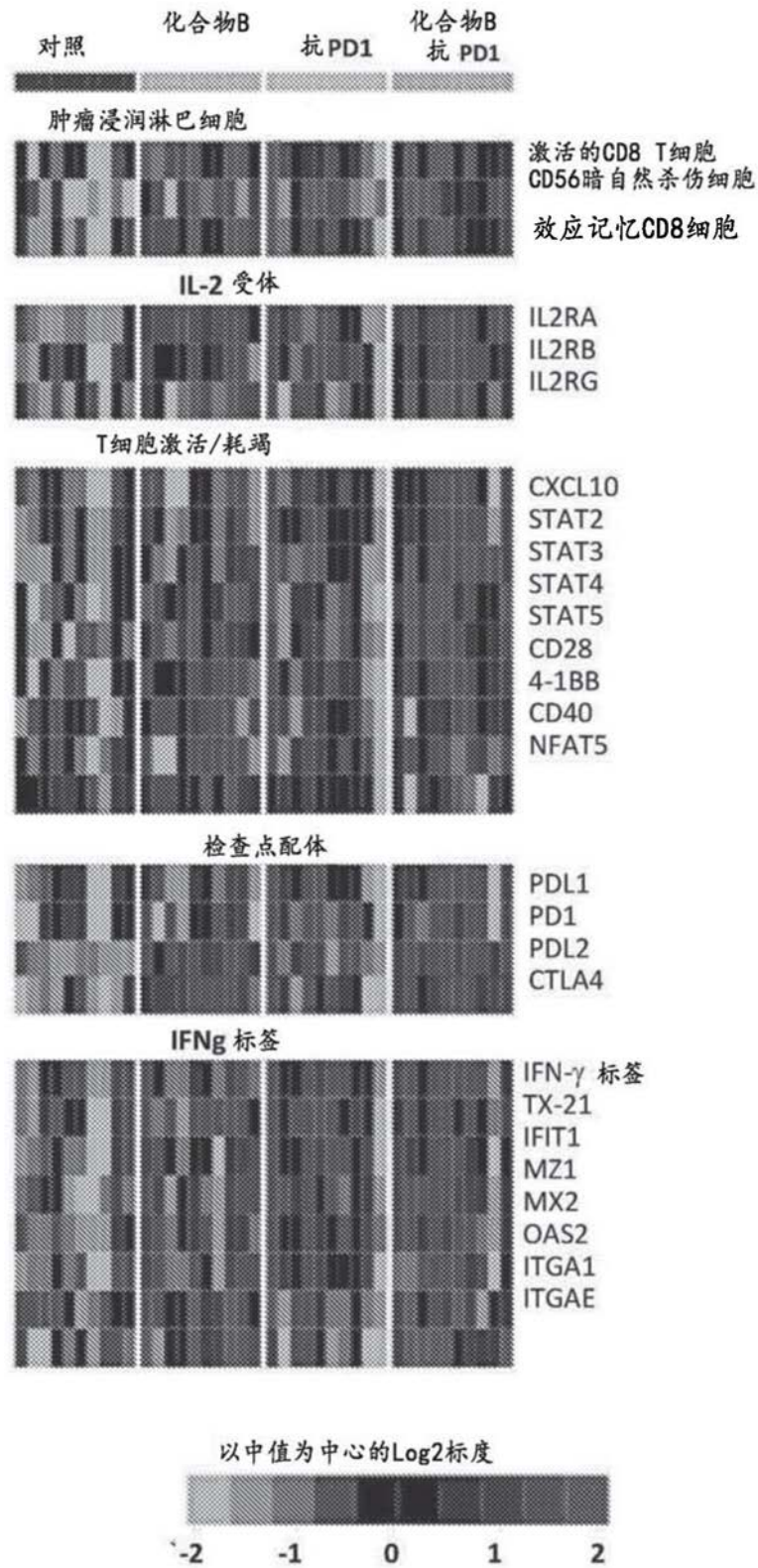


图22

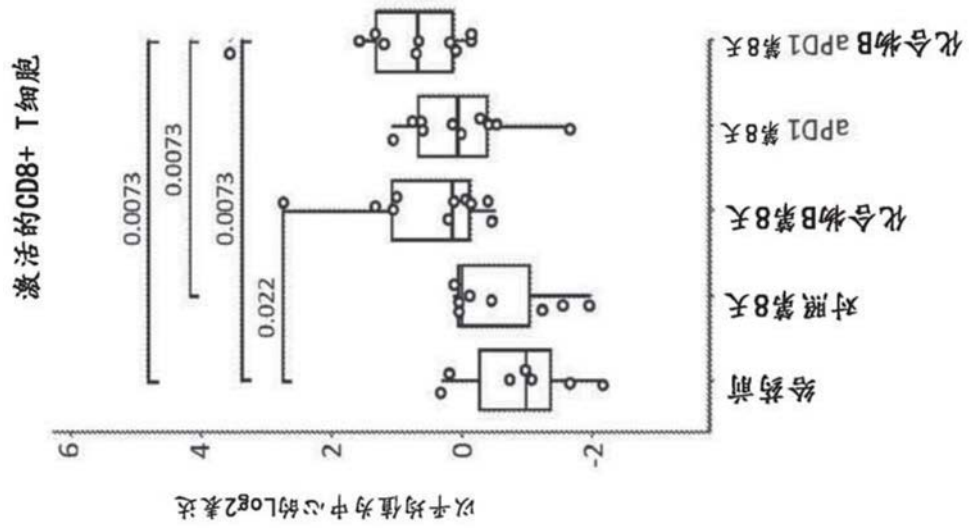


图23A

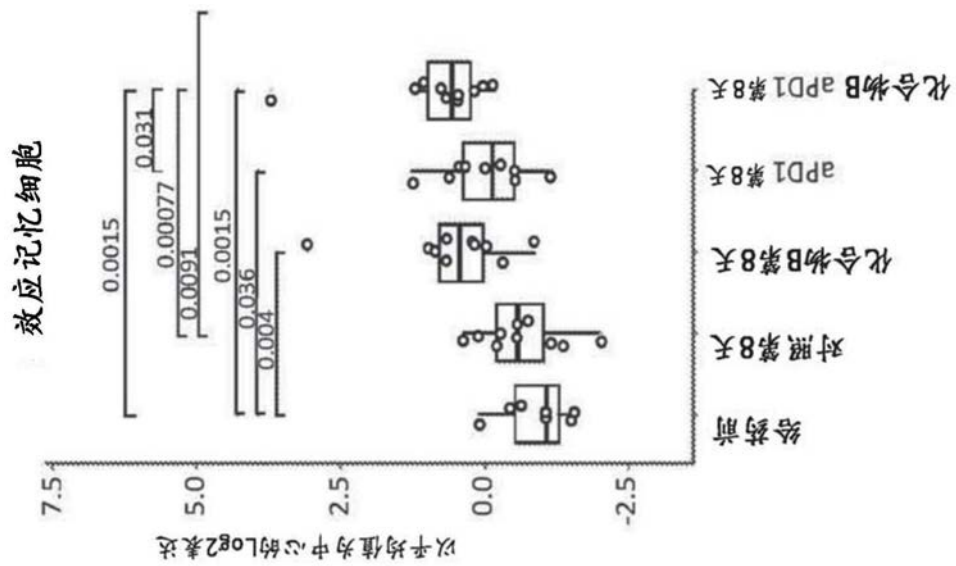


图23B

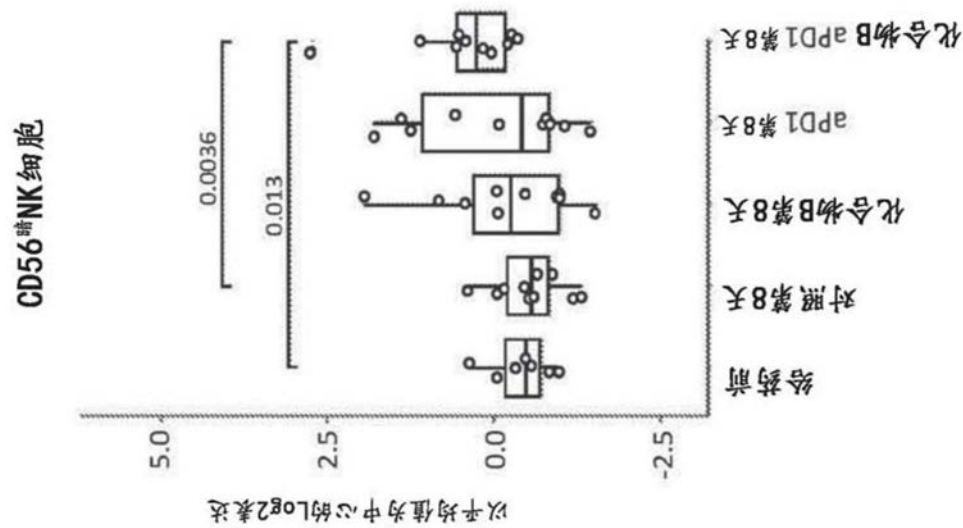


图23C

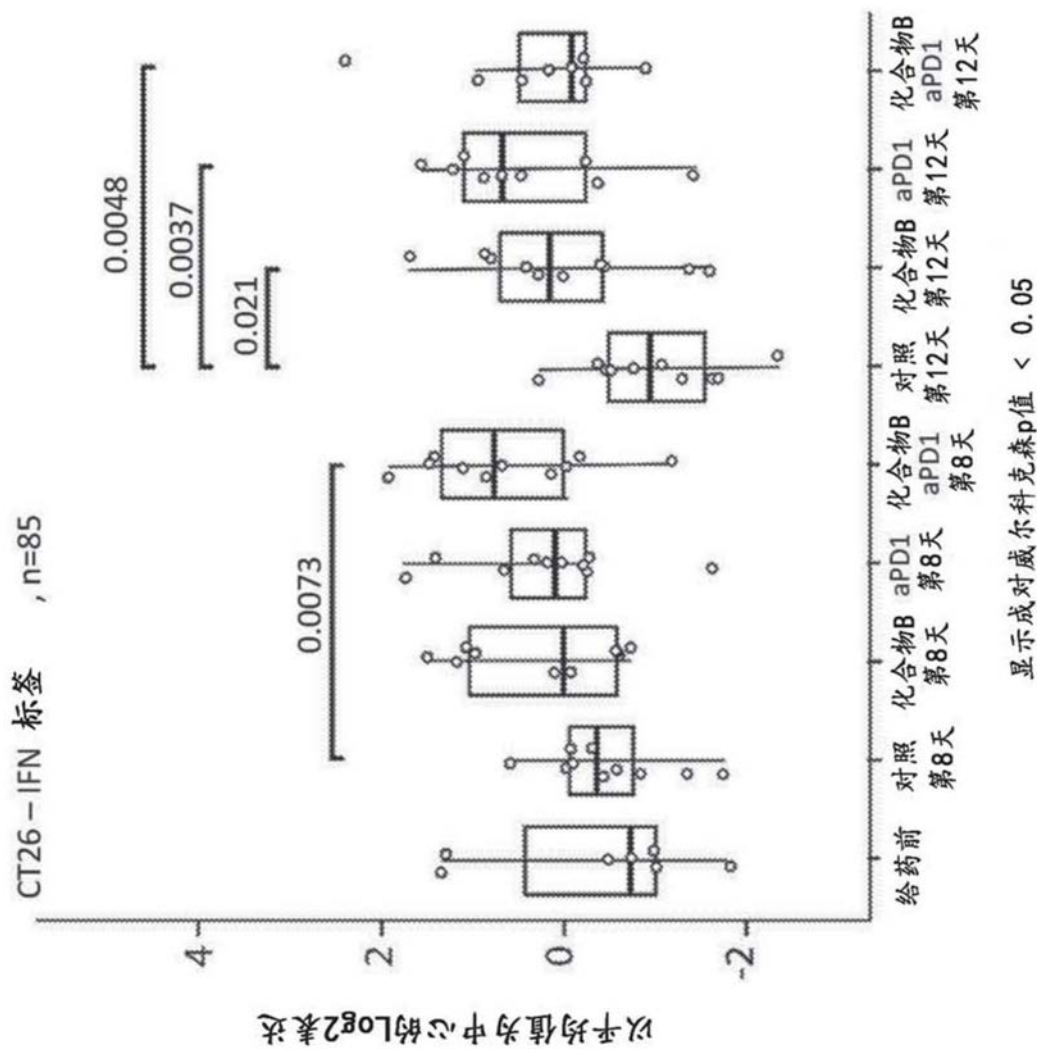


图24A

化合物B反应标签，第8天

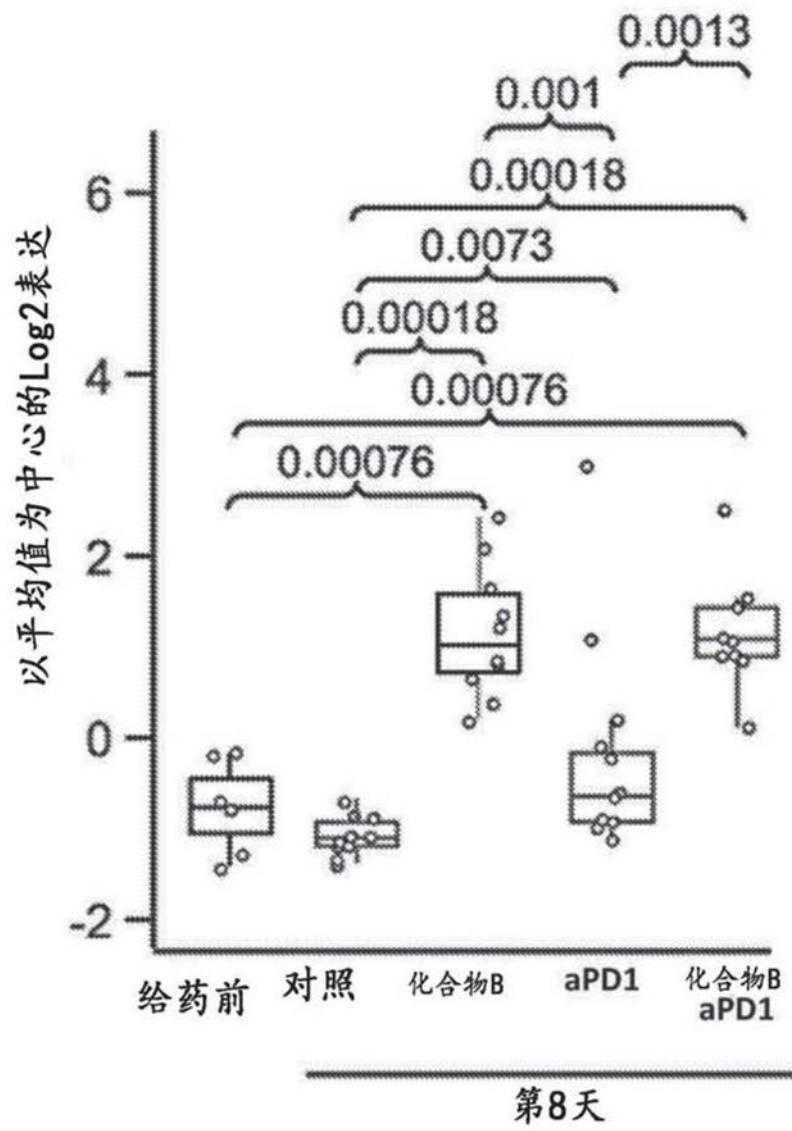


图24B

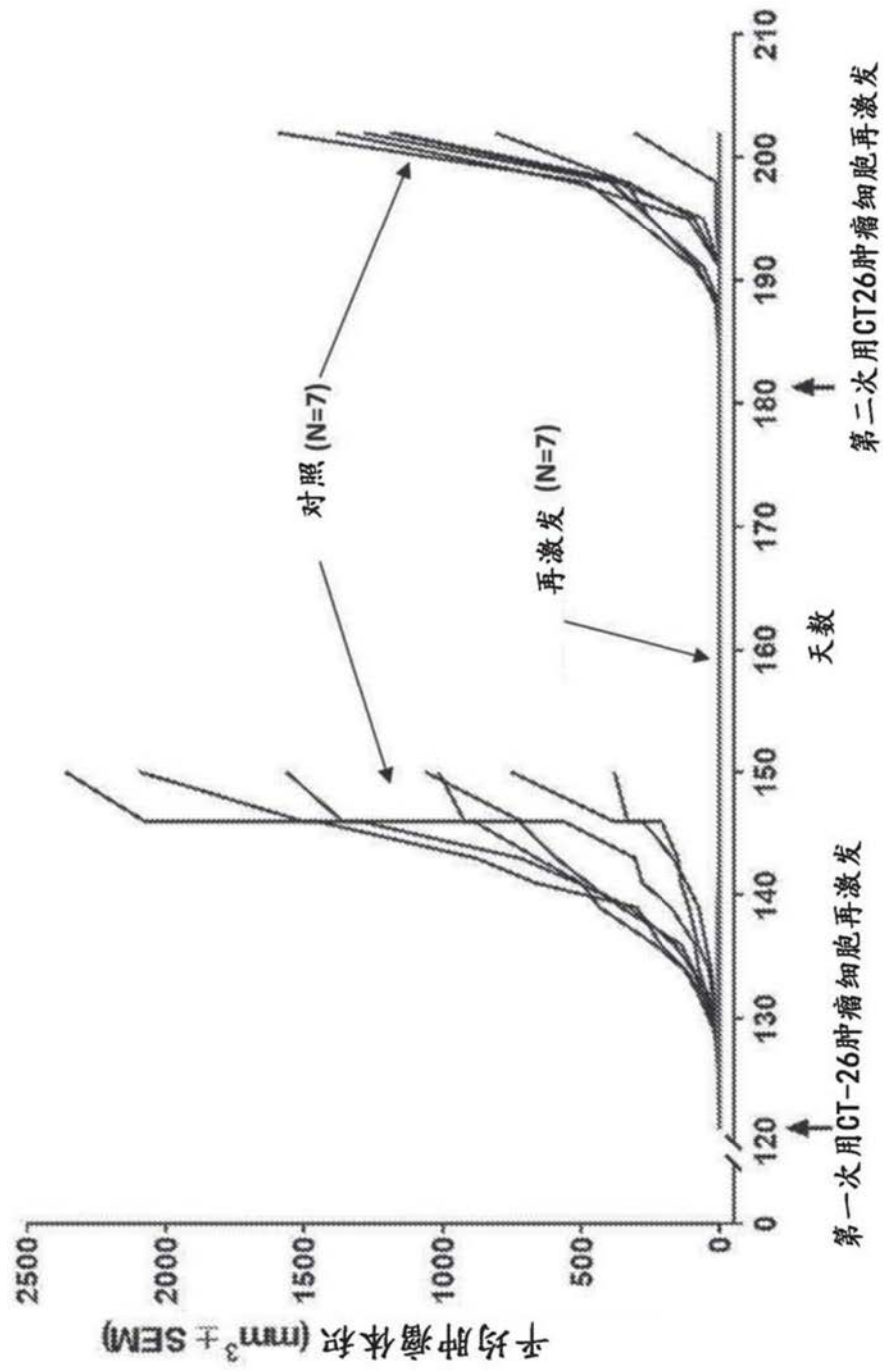


图25

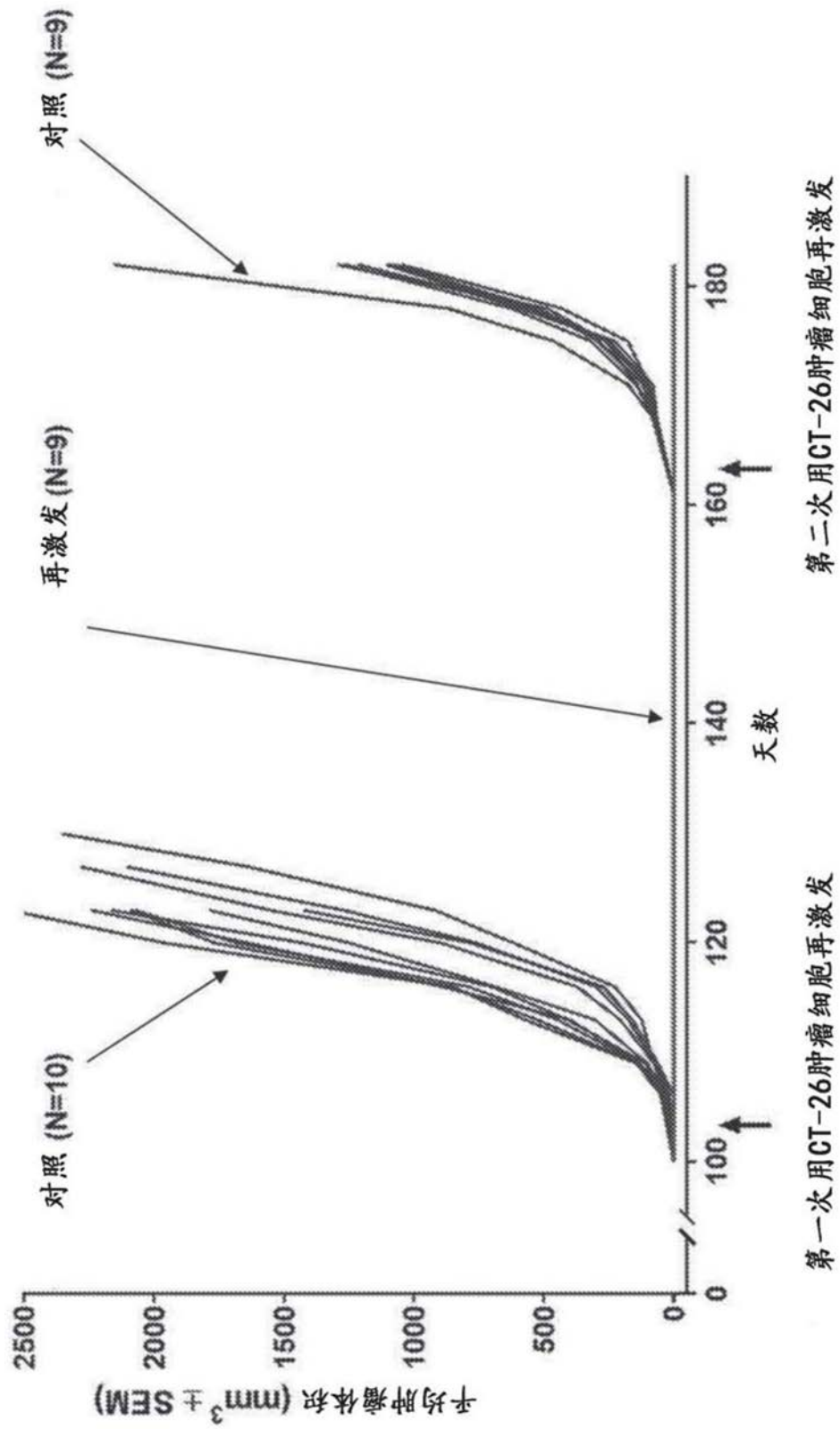


图26

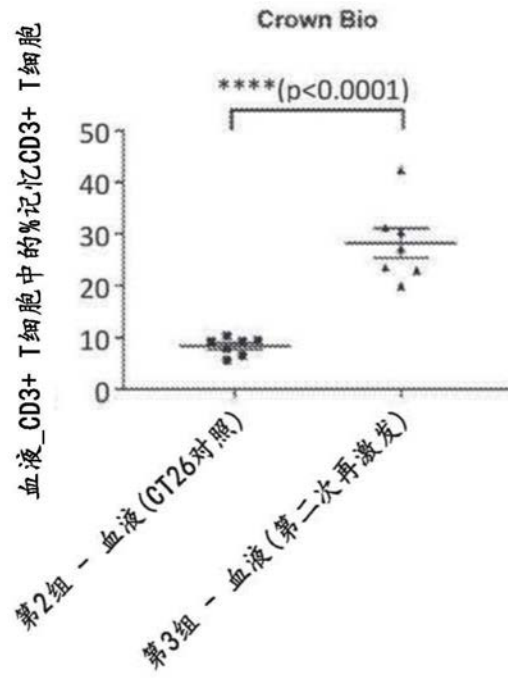


图27A

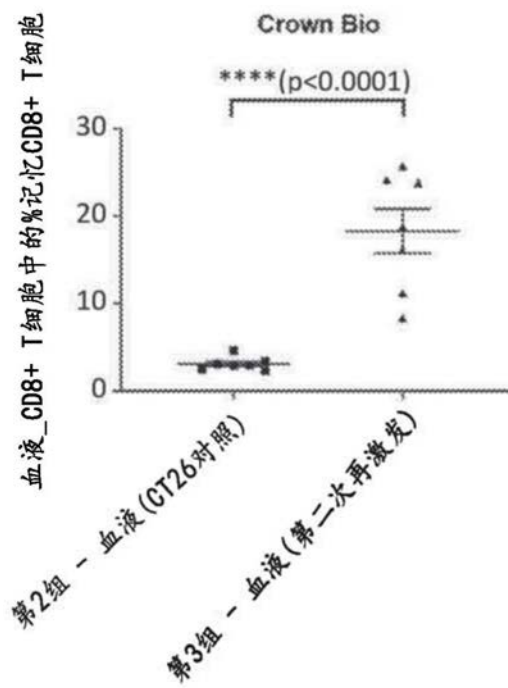


图27B