(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114245802 B
(45)授权公告日 2024.10.15

(21)申请号 202080045323.6
(22)申请日 2020.06.18
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114245802 A
(43)申请公布日 2022.03.25
(30)优先权数据
62/864,372 2019.06.20 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.12.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/038537 2020.06.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/257525 EN 2020.12.24
(73)专利权人 石药集团巨石生物制药有限公司
地址 050035 河北省石家庄市高新区黄河大道226号
(72)发明人 闫哲 冯立新 李银贵
(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
专利代理师 徐迅 崔佳佳
(51)Int.Cl.
*C07K 1/107*(2006.01)
*A61K 38/20*(2006.01)
*A61K 47/60*(2017.01)
*A61P 35/00*(2006.01)
*A61P 35/02*(2006.01)
(56)对比文件
EP 0785276 A1,1997.07.23
审查员 杨添淇

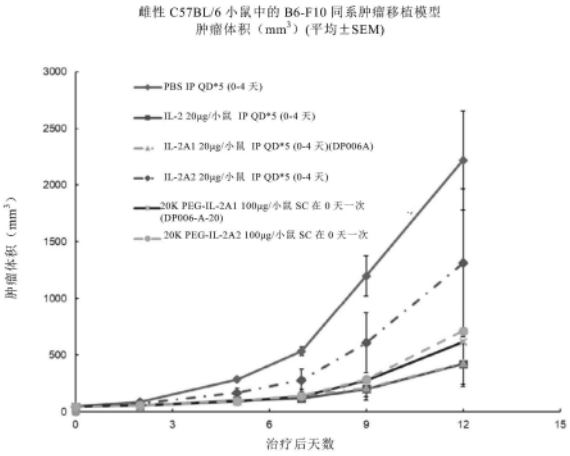
权利要求书2页 说明书106页
序列表22页 附图22页

(54)发明名称

# 修饰的IL-2蛋白、PEG偶联物及其用途

(57)摘要

本申请提供了一种修饰的白细胞介素2(IL-2)蛋白,其包含工程化的谷氨酰胺(Q)残基。本申请还提供了一种包含修饰的IL-2蛋白的修饰的IL-2蛋白-聚乙二醇(PEG)偶联物,所述修饰的IL-2蛋白含有工程化的Q残基和PEG部分,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联。还提供了药物组合物、试剂盒、制造方法和治疗方法。




CN 114245802 B

1.一种修饰的白细胞介素-2蛋白,包含一个工程谷氨酰胺Q残基;所述工程Q残基位于IL-2受体α亚基结合域内;所述修饰的白细胞介素-2蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所示。

2.根据权利要求1所述的修饰的IL-2蛋白,其中修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基的结合$K_D$为亲本IL-2蛋白与IL-2Rα亚基之间的结合$K_D$的2～800倍。

3.根据权利要求1所述的修饰的IL-2蛋白,其中修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基的结合$K_D$为亲本IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$的1-30倍。

4.根据权利要求1所述的修饰的IL-2蛋白,其中所述修饰的IL-2蛋白能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T细胞、辅助性T细胞、调节性T细胞、γδT细胞、自然杀伤T细胞和自然杀伤细胞。

5.根据权利要求4所述的修饰的IL-2蛋白,其中修饰的IL-2蛋白具有比亲本IL-2蛋白降低2至50倍的激活Treg细胞的能力。

6.根据权利要求4所述的修饰的IL-2蛋白,其中所述修饰的IL-2蛋白增加CTL与Treg的比率或NK细胞与Treg的比率的能力为亲本IL-2蛋白的1至20倍。

7.一种修饰的IL-2蛋白-聚乙二醇偶联物,包括权利要求1-6中任一项的修饰的IL-2蛋白和PEG部分,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联。

8.根据权利要求7所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中PEG部分是线性的。

9.根据权利要求7所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述PEG部分是分枝的。

10.根据权利要求7所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述PEG部分的分子量在10kDa至40kDa之间。

11.根据权利要求7所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中PEG部分是甲氧基-PEG-胺。

12.根据权利要求7所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白与IL-2Rα亚基之间结合$K_D$的10-2000倍。

13.根据权利要求7所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间结合$K_D$的1-30倍。

14.根据权利要求7所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T细胞,辅助性T细胞、调节性T细胞、γδT细胞、自然杀伤T细胞、和自然杀伤细胞。

15.根据权利要求14所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物具有比亲本IL-2蛋白降低2至5000倍的激活Treg细胞的能力。

16.根据权利要求14所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与亲本IL-2蛋白相比具有1至20倍更高的增加CTL与Treg的比率或NK细胞与Treg的比率的能力。

17.一种药物组合物,包括权利要求1-6中任一项所述的修饰的IL-2蛋白,或权利要求7-16中任一项所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,以及任选的药学上可接受的载体。

18.一种权利要求17所述的药物组合物在制备用于治疗疾病的药物中的应用,其中所述疾病是癌症,其中所述癌症是肾细胞癌、转移性黑色素瘤、急性髓系白血病、非霍奇金淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、乳腺癌或膀胱癌。

19.根据权利要求18的应用,其中所述药物组合物是静脉内、瘤内、腹腔内或皮下给药的。

20.根据权利要求18的应用,其中所述药物组合物每月给药一次、每3周给药一次、每2周给药一次、每周给药一次、每周给药两次、隔天给药一次或每天给药一次。

21.一种修饰的IL-2蛋白-聚乙二醇(PEG)偶联物的制备方法,包括权利要求1-6中任一项所述的修饰的IL-2蛋白和PEG部分,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,其中所述PEG部分的偶联是通过TGase介导的。

22.根据权利要求21所述的制备方法,其中所述TGase是微生物TGase。

23.根据权利要求21或22所述的制备方法,其中所述TGase是野生型TGase。

24.根据权利要求21所述的制备方法,其中所述TGase的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示。

25.根据权利要求21所述的制备方法,其中所述TGase是工程化的TGase。

# 修饰的IL-2蛋白、PEG偶联物及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年6月20日提交的美国临时申请第62/864,372号中的优先权,该申请的内容通过引用整体并入本文。

[0003] 以ASCII文本文件形式提交序列表

[0004] 以下提交的ASCII文本文件的内容通过引用整体并入此处:序列表的计算机可读形式(CRF)(文件名:720692000440SeqList.txt,记录日期:2020年6月16日,大小:33KB)。

[0005] 本申请的领域

[0006] 本申请涉及一种修饰的白细胞介素2(IL-2)蛋白,其包含工程化的谷氨酰胺(Q)残基。本申请还涉及一种修饰的IL-2蛋白-聚乙二醇(PEG)偶联物,该偶联物包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白含有工程化的Q残基和PEG部分,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联。还提供了药物组合物、试剂盒、制造方法和治疗方法。

[0007] 本申请的背景

[0008] 健康个体的免疫系统可以区分健康细胞和非健康细胞,如癌细胞,后者通常会被免疫反应清除。当免疫系统受到损害时,它就不能区分和消除癌细胞。通过给癌症患者施用免疫调节蛋白,患者的免疫系统可以至少部分恢复正常,以消除癌症。白细胞介素-2(IL-2)是一类用于肿瘤免疫治疗的免疫调节蛋白。

[0009] 野生型IL-2是一种约15-16kDa的细胞因子信号分子。它调节免疫系统的白血细胞(白细胞,通常是淋巴细胞)的活性。IL-2参与机体对微生物感染的自然反应和对“自我”与“非自我”的区分。它通过与淋巴细胞上表达的IL-2受体(IL-2R)结合介导其作用。IL-2R是由 IL-2Rα(p55,CD25)、IL-2Rβ(p75,CD122)和$\gamma_c$(通用γ链,IL-2Rγ,p65,CD132)三条链组成的异三聚体复合物。IL-2对于抗原选择的T细胞克隆在免疫应答期间的快速扩增、分化和存活,以及B细胞、自然杀伤(NK)细胞和调节性T细胞($T_{reg}$)的正常功能是至关重要的。

[0010] IL-2被提示可以治疗急性髓系白血病(AML)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、乳腺癌和膀胱癌。阿地白介素(Aldesleukin)(Proleukin®)是一种市售的非糖基化人重组IL-2(hrIL-2),已被FDA批准用于治疗转移性肾细胞癌(mRCC)和转移性黑色素瘤(mM)。然而,据报道即使在推荐剂量下,阿地白介素仍有严重的副作用,包括毛细血管渗漏综合征(CLS)和中性粒细胞功能受损。此外,由于需要多剂量频繁的静脉输注,因此在临床环境中施用阿地白介素。为了未来更普遍的应用,有待解决IL-2的毒性和短半衰期等问题。

[0011] 本文提及的所有出版物、专利、专利申请和公开的专利申请的公开内容,通过引用整体并入本文。

[0012] 本申请的概要

[0013] 本申请提供了修饰的IL-2蛋白,其包含工程化的Q残基。本申请还提供了修饰的IL-2 蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白和PEG部分,所述修饰的IL-2蛋白含有工程化的Q残基,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联。本文所述的任何修饰的IL-2蛋白可用于制备修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,例如本文所述的任一修饰的IL-2蛋

白-PEG偶联物。还提供了药物组合物、试剂盒、制造方法和治疗方法。

[0014] 在一个方面,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白。在一些实施方案中,所述工程化的Q残基位于IL-2受体α(IL-2Rα)亚基结合域内。在一些实施方案中,所述工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合结构域外的约1至约3个(例如1、2或3)氨基酸残基之间。

[0015] 在根据如上所述任一种修饰的IL-2蛋白的实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包括一个工程化的Q残基。

[0016] 在根据如上所述任一种修饰的IL-2蛋白的实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包括两个或更多个工程化的Q残基。

[0017] 在根据如上所述任一种修饰的IL-2蛋白的实施方案中,所述工程化的Q残基是(例如,来自)相对于亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2阿地白介素)的单个氨基酸突变。在一些实施方案中,亲本IL-2包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,单个氨基酸突变选自下组:F43Q、R37Q、F41Q、K42Q、Y44Q、T36Q、M38Q,或其组合。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NOs:2和4-8中任一所示的氨基酸序列。

[0018] 在根据如上所述任一种修饰的IL-2蛋白的实施方案中,所述工程化的Q残基是适合谷氨酰胺转胺酶(TGase)反应的外源补丁(patch)序列的一部分。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包括外源补丁序列,并且工程化的Q残基是补丁序列内的氨基酸残基之一。在一些实施方案中,所述外源补丁序列取代亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2蛋白,或IL-2阿地白介素)的一部分。在一些实施方案中,所述亲本IL-2蛋白包含SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述外源补丁序列选自下组:LEEQAA(SEQ ID NO:9)、IFKQTY(SEQ ID NO:10)、PKEQKY(SEQ ID NO:11)、VIQGV(SEQ ID NO: 12)、REEQFN(SEQ ID NO:13)、GLLQGA(SEQ ID NO:14)、或其组合。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NOs:3和15-19中任一所示的氨基酸序列。

[0019] 在根据如上所述任一种修饰的IL-2蛋白的实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白还包括一个或多个额外氨基酸突变,所述额外氨基酸突变不是工程化的Q残基。

[0020] 在根据如上所述任一种修饰的IL-2蛋白的实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含的氨基酸序列与含有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白具有至少95%(例如至少约为95%,96%,97%,98%或99%)的同一性。

[0021] 在根据如上所述任一种修饰的IL-2蛋白的实施方案中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基之间的结合$K_D$,约为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与 IL-2Rα亚基之间的结合$K_D$的约2至约800倍(例如,约2至约50倍、约400至约500倍,或约476倍)。

[0022] 在根据如上所述任一种修饰的IL-2蛋白的实施方案中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$,约为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与 IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$的约1至约30倍(例如,约1至约10倍、约10至约20倍,或约16倍)。

[0023] 在根据如上所述任一种修饰的IL-2蛋白的实施方案中,修饰的IL-2蛋白能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T细胞($T_C$,毒性T淋巴细胞,或CTL)、辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,激活Treg细胞的能力降低约2至约50倍(例如,约2至约10倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素) 相比,激活CTL或NK细胞的能

力相似(例如相等)或降低约1至约5倍。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白优先激活IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白具有相似(例如:相等) 或约1至约20倍(例如约1至约10倍)更高的增加CTL与Treg的比率或NK细胞与Treg 的比率的能力。

[0024] 另一方面,提供了一种修饰的IL-2蛋白-聚乙二醇(PEG)偶联物,该偶联物包含上述任一所述修饰的IL-2蛋白和PEG部分,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2 蛋白偶联。在一些实施例中,PEG部分是线性的。在一些实施例中,PEG部分是分枝的。

[0025] 在根据如上所述任一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的一些实施方案中,PEG部分的分子量在约10kDa至约40kDa之间,例如约20kDa、约30kDa或约40kDa。

[0026] 在根据如上所述任一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的一些实施方案中,PEG部分末端被选自下组的封端部分(end-capping moiety)封闭:羟基、烷氧基、取代的烷氧基、烯氧基、取代的烯氧基、炔氧基、取代的炔氧基、芳氧基和取代的芳氧基。在一些实施方案中,PEG部分是甲氧基-PEG-胺。

[0027] 在根据如上所述任一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的一些实施方案中,修饰的IL-2 蛋白包括两个或更多个工程化的Q残基,并且其中两个或更多个工程化的Q残基中的至少一个分别与PEG部分结合。

[0028] 在根据上述任何一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的一些实施方案中,PEG部分的偶联是通过TGase介导的,例如微生物TGase(mTGase)。在一些实施方案中,TGase是野生型TGase,例如包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,TGase是工程化的TGase,例如与SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列具有至少约80%(例如至少约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任何一种)同一性的工程化TGase。在一些实施方案中,TGase具有至少约90%的纯度(例如至少约90%、95%、96%、97%、 98%或99%中的任何一种)。

[0029] 在根据上述任何一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的一些实施方案中,修饰后的IL-2 蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基的结合$K_D$,约为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基的结合$K_D$的10～2000倍。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物不结合或不能被检测(例如,通过SPR)到结合IL-2Rα亚基。

[0030] 在根据上述任何一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$,约为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2 阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$的约1至约30倍(例如,约1至约10倍、或约 8倍,或约11倍)。

[0031] 在根据上述任何一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T细胞($T_c$,细胞毒性T淋巴细胞,或 CTL),辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2 阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物激活Treg细胞的能力降低了约2至约5000 倍。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素) 相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物激活CTL或NK细胞的能力相似或降低了约1至约 50倍。在一些实施方案中,

与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物优先激活IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物相似地或优先地激活CTL和/或NK细胞不优先激活Treg细胞;例如与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,具有相似(例如相等)或约1至约20倍(例如约1至约10倍)更高的增加CTL与Treg的比率或NK 细胞与Treg的比率的能力。

[0032] 还提供了编码上述任一种修饰的IL-2蛋白的分离的核酸,包含这种分离的核酸的载体,以及包含所述的分离的核酸或所述载体的宿主细胞。

[0033] 进一步提供了药物组合物,其包含上述任一种修饰的IL-2蛋白,或上述任一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,和任选的药学上可接受的载体。

[0034] 在另一方面,提供了一种治疗个体(例如人)中的疾病(例如癌症)的方法,包括向个体施用有效量的上述任一种药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物经静脉、瘤内、腹腔内或皮下给药。在一些实施方案中,药物组合物以约1μg/kg至约100μg/kg给药(例如约1微克/千克至约50微克/千克)。在一些实施方案中,所述药物组合物每月给药一次、每3 周给药一次、每2周给药一次、每周给药一次、每周给药两次、隔天给药一次或每天给药一次。在一些实施方案中,该疾病是癌症,例如肾细胞癌、转移性黑色素瘤、急性髓系白血病(AML)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、乳腺癌或膀胱癌。

[0035] 另一方面,提供了一种制备包含修饰IL-2蛋白的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的方法,所述修饰IL-2蛋白包含与PEG部分特异性偶联的工程化的Q残基,其中所述方法包括:在TGase存在下,在足以生成修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的条件下,将上述任一种修饰IL-2 蛋白与PEG部分接触,其中所述PEG部分通过所述工程化的Q残基与修饰IL-2蛋白偶联。在一些实施方案中,所述方法进一步包括:产生包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白。

[0036] 另一方面,提供了一种制备包含修饰IL-2蛋白的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的方法,所述修饰IL-2蛋白包含与PEG部分特异性偶联的工程化的Q残基,其中所述方法包括:a)在TGase存在下,在足以生成中间体偶联物的条件下,将上述任一种修饰IL-2蛋白与小分子柄接触,其中,所述中间体偶联物包含通过工程化的Q残基特异性地与小分子柄偶联的修饰IL-2蛋白,以及b)将所述中间体偶联物与PEG部分接触,从而获得所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述PEG部分通过所述小分子柄偶联。在一些实施方案中,所述方法进一步包括:产生包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白。

[0037] 另一方面,提供了一种制备包含修饰IL-2蛋白的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的方法,所述修饰IL-2蛋白包含与PEG部分特异性偶联的工程化的Q残基,其中所述方法包括:在TGase存在下,在足以生成所述修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的条件下,使包含多种以上任一所述的修饰IL-2蛋白的组合物与所述PEG部分接触,其中所述组合物中至少约 30%(例如,至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%中的任意一种)的修饰IL-2蛋白通过所述工程化的Q残基与所述PEG部分结合。在一些实施方案中,所述方法进一步包括:产生包含多个含有工程化Q残基的修饰的IL-2蛋白的组合物。在一些实施方案中,组合物中的至少约70%(例如至少约70%、80%、90%或95%)的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG部分偶联。

[0038] 另一方面,提供了一种制备包含修饰IL-2蛋白的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的方

法,所述修饰IL-2蛋白包含与PEG部分特异性偶联的工程化的Q残基,其中所述方法包括:a)在TGase存在下,在足以产生包含与小分子柄特异性偶联的修饰IL-2蛋白的中间体偶联物的条件下,将包含多种上述修饰IL-2蛋白的组合物与小分子柄接触,其中组合物中至少约30%(例如,至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%)的修饰IL-2 蛋白通过工程化的Q残基与小分子柄偶联,以及b)将中间体偶联物与PEG部分接触,从而获得修饰IL-2蛋白-PEG偶联物,其中组合物中至少约30%(例如,至少约30%、40%、 50%、60%、70%、80%、90%或95%)的中间体偶联物通过小分子柄与PEG部分偶联。在一些实施方案中,所述方法进一步包括:产生包含多个含有工程化Q残基的修饰的IL-2 蛋白的组合物。在一些实施方案中,组合物中的至少约70%(例如至少约70%、80%、90%或95%)的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG部分偶联。

[0039] 在另一方面,提供了一种增加IL-2蛋白的循环半衰期$t_{1/2}$或总暴露量(overall exposure)$AUC_{0-inf}$的方法,包括:a)将工程化的Q残基引入IL-2蛋白,以生成上述任一种所述的修饰IL-2蛋白;b)在TGase存在下,在足以使PEG部分通过工程化的Q残基与修饰IL-2蛋白偶联的条件下,使修饰IL-2蛋白与PEG部分接触;以及,其中,与IL-2蛋白相比,PEG部分的长度足以增加PEG偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期或总暴露量 $AUC_{0-inf}$。在一些实施方案中,PEG偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期至少是IL-2蛋白的至少约1.5倍(例如,至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30倍)。在一些实施方案中,例如在单次静脉给药或单次皮下给药之后,PEG偶联修饰的IL-2蛋白的总暴露量($AUC_{0-inf}$)比IL-2蛋白高至少约5倍(例如,至少约10、15、20、25、30、35、 40、45、50或100倍)。

[0040] 在另一方面,提供了一种增加IL-2蛋白的循环半衰期或总暴露量$AUC_{0-inf}$的方法,包括:a)将工程化的Q残基引入IL-2蛋白中,以产生上述任一种修饰IL-2蛋白;b)在TGase存在下,在足以通过工程化的Q残基而产生包含与小分子柄特异性偶联的修饰IL-2蛋白的中间体偶联物的条件下,将修饰的IL-2蛋白与小分子柄接触;和c)在足以使PEG部分通过小分子柄与中间体偶联物偶联的条件下,将中间体偶联物与PEG部分接触;并且,其中,与IL-2蛋白相比,PEG部分的长度足以增加PEG偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期。在一些实施方案中,PEG偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期至少是IL-2蛋白约1.5 倍(例如,至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30倍)。在一些实施方案中,例如在单次静脉给药或单次皮下给药之后,PEG偶联修饰的IL-2蛋白的总暴露量 ($AUC_{0-inf}$)比IL-2蛋白高至少约5倍(例如,至少约10、15、20、25、30、35、40、45、50 或100倍)。

[0041] 在另一方面,提供了一种增加IL-2蛋白的循环半衰期或总暴露量$AUC_{0-inf}$的方法,包括:a)将工程化的Q残基引入所述IL-2蛋白中,以生成包含多个含有工程化Q残基的修饰IL-2蛋白的组合物,例如包含以上任一种所述的修饰IL-2蛋白的组合物;b)在TGase 存在下,在足以使PEG部分通过工程化的Q残基与修饰IL-2蛋白偶联的条件下使组合物与PEG部分接触;其中组合物中至少约30%(例如,至少约30%、40%、50%、60%、70%、 80%、90%或95%)的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG部分偶联;并且与IL-2 蛋白相比,其中PEG部分的长度足以增加PEG偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期或总暴露量$AUC_{0-inf}$。在一些实施方案中,组合物中至少约70%(例如,至少约70%、80%、90%或95%)的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG部分偶联。在一些实施方案中,PEG 偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期至少是IL-2蛋白的约1.5倍(例如,至少约2、3、4、5、 6、7、8、9、10、15、20、25或30倍)。

在一些实施方案中,例如在单次静脉给药或单次皮下给药之后,PEG偶联修饰的IL-2蛋白的总暴露量($AUC_{0-inf}$)比IL-2蛋白高至少约5 倍(例如,至少约10、15、20、25、30、35、40、45、50或100倍)。

[0042] 在另一方面,提供了一种增加IL-2蛋白的循环半衰期或总暴露量$AUC_{0-inf}$的方法,包括:a)将工程化的Q残基引入所述IL-2蛋白中,以生成包含多个含有工程化Q残基的修饰IL-2蛋白的组合物,例如包含以上任一种所述的修饰IL-2蛋白的组合物;b)在TGase 存在下,在足以使小分子柄通过工程化的Q残基与修饰IL-2蛋白偶联的条件下,使组合物与小分子柄接触;其中组合物中至少约30%(例如,至少约30%、40%、50%、60%、70%、 80%、90%或95%)的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与小分子柄偶联;和c)将包含中间体偶联物的组合物与PEG部分接触从而获得修饰的IL-2-蛋白-PEG偶联物,其中组合物中的约30%(例如,至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%)的中间体偶联物通过小分子柄与PEG部分偶联;并且与IL-2蛋白相比,其中PEG部分的长度足以增加PEG偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期或总暴露量$AUC_{0-inf}$。在一些实施方案中,组合物中至少约70%(例如,至少约70%、80%、90%或95%)的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG部分偶联。在一些实施方案中,PEG偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期至少是IL-2蛋白的约1.5倍(例如,至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 或30倍)。在一些实施方案中,例如在单次静脉给药或单次皮下给药之后,PEG偶联修饰的IL-2蛋白的总暴露量($AUC_{0-inf}$)比IL-2蛋白高至少约5倍(例如,至少约10、15、20、 25、30、35、40、45、50或100倍)。

[0043] 本发明还提供了可用于本文所述方法的试剂盒和制品。

[0044] 附图的简要说明

[0045] 图1示出了示例性亲本IL-2蛋白(IL-2 Aldesleukin)的氨基酸序列和结构。IL-2Rα亚基结合域为下划线处,IL-2Rβ亚基结合域被框出,$\gamma_c$结合域为斜体。突变为谷氨酰胺(Q)的示例性残基被加粗。还显示了二级结构α螺旋(h)、无规则卷曲(c)和延伸链(e)。

[0046] 图2显示了示例性修饰的IL-2蛋白和亲本IL-2蛋白(Aldesleukin,例如,Proleukin®) 的氨基酸序列比对。工程化的Q残基用阴影标出。

[0047] 图3显示了示例性修饰IL-2蛋白(IL-2A1、IL-2A2)的表达和纯化的SDS-PAGE分析。标尺显示在左侧。

[0048] 图4A-4B显示了示例性修饰IL-2蛋白(IL-2A1,IL-2A2)的聚乙二醇化的SDS-PAGE分析,亲本IL-2蛋白(Aldesleukin)作为对照。左图为考马斯蓝蛋白染色,右图为碘化钡PEG染色。

[0049] 图5展示了对亲本IL-2蛋白(Aldesleukin)、示例性修饰IL-2蛋白(IL-2A1、IL-2A2) 和示例性修饰IL-2蛋白-PEG偶联物(PEG-20K-IL-2A1、PEG-20K-IL-2A2)响应的CTLL-2 细胞生长测定结果。X轴显示蛋白浓度。

[0050] 图6A-6B显示在注射亲本IL-2(Aldesleukin)、示例性修饰的IL-2蛋白(IL-2A1、IL-2A2) 和示例性修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物(PEG-20K-IL-2A1、PEG-20K-IL-2A2)后,小鼠血液和脾脏中淋巴细胞的增殖。亲本IL-2(未修饰的)和修饰的IL-2蛋白(IL-2A1、IL-2A2)通过腹腔内(i.p.)注射,每日1次,连用5天,20μg/小鼠/天。修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物是皮下(s.c.)单次注射,100μg/小鼠。

[0051] 图7显示体内亲本IL-2(Aldesleukin,未修饰的IL-2)、示例性修饰IL-2蛋白(IL-2A1、IL-2A2)和示例性修饰IL-2蛋白-PEG偶联物(PEG-20K-IL-2A1、PEG-20K-IL-2A2)对B16-F10小鼠黑色素瘤异种移植瘤体积的影响。PBS注射液作为阴性对照。将亲本IL-2 和修饰的IL-2蛋白(IL-2A1、IL-2A2)通过腹腔(i.p.)注射,每日1次,连用5天,20μg/ 小鼠/天。修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物通过皮下(s.c.)单次注射,100μg/小鼠。

[0052] 图8描述了一步法的修饰IL-2蛋白-PEG的偶联方法的示意图。

[0053] 图9描述了两步法的修饰的IL-2蛋白-PEG的偶联的示意方法图。

[0054] 图10A描述了在SD大鼠中单次静脉注射后,随时间的PEG-IL-2A1(具有20kDa、30kDa或40kDa PEG部分)的血清浓度。图10B描述了在SD大鼠中单次静脉注射后 PEG-IL-2A1的PK度量。

[0055] 图11A描述了在SD大鼠中单次皮下注射后,随时间的PEG-IL-2A1(具有20kDa、30kDa或40kDa PEG部分)的血清浓度。图11B描述了在SD大鼠中单次皮下注射后 PEG-IL-2A1的PK度量。

[0056] 图12A-12E描述了阿地白介素IL-2(图12A),IL-2A1(DP006A,图12B), PEG-20K-IL-2A1(DP006-A-20,图12C),PEG-30K-IL-2A1(DP006-A-30,图12D),或PEG-40K-IL-2A1(DP006-A-40,图12E)与IL-2Rα亚基的SPR结合曲线。X轴显示时间, Y轴显示响应单位(RU)。

[0057] 图13A-13E描述了阿地白介素IL-2(图13A),IL-2A1(DP006A,图13B), PEG-20K-IL-2A1(DP006-A-20,图13C),PEG-30K-IL-2A1(DP006-A-30,图13D),或 PEG-40K-IL-2A1(DP006-A-40,图13E)与IL-2Rβ亚基的SPR结合曲线。X轴显示时间, Y轴显示响应单位(RU)。

[0058] 图14显示了在SD大鼠中单次静脉注射2mg/kg的DP630a(DP006-A-30)后, PEG-30K-IL-2A1 DP630a(DP006-A-30)的血清浓度-时间曲线。数据用3只动物(雄性)的平均和标准差表示。

[0059] 图15显示在SD大鼠中单次皮下注射2mg/kg的DP630a(DP006-A-30)后, PEG-30K-IL-2A1 DP630a(DP006-A-30)的血清浓度-时间曲线。数据用3只动物(雄性)的平均和标准差表示。

[0060] 图16显示了SD大鼠单次静脉注射2mg/kg DP006-A后,DP006-A的血清浓度-时间曲线。数据用3只动物(雄性)的平均和标准差表示。

[0061] 图17显示了在SD大鼠中单次静脉注射DP630a(DP006-A-30)或DP006-A 2mg/kg后,DP630a(DP006-A-30)和DP006-A的血清浓度-时间曲线的比较。数据用3只动物(雄性)的平均和标准差表示。DP630a(DP006-A-30)的终点时间为72小时,DP006-A的终点时间为 8小时。

[0062] 图18显示了SD大鼠单次静脉注射或皮下注射2mg/kg后DP630a(DP006-A-30)的血清浓度-时间曲线的比较。数据用3只动物(雄性)的平均和标准差表示。

[0063] 图19显示了通过数据库检索获得的DP006-A和DP006-A-30在胰蛋白酶消化下的序列覆盖情况。

[0064] 图20显示了DP006-A和DP006-A-30在胰蛋白酶消化下的基峰色谱。

[0065] 图21显示了在DP006-A-30中的聚乙二醇化P43-47的萃取离子色谱(EIC)。

[0066] 图22显示了m/z为539.0666(z＝4)的MS1和MS/MS谱。

[0067] 图23显示了m/z在550.0738(z＝4)处的MS1和MS/MS谱。

[0068] 图24显示了通过数据库检索获得的Glu-C消化的DP006-A和DP006-A-30的序列覆盖情况。

[0069] 图25显示用Glu-C消化的DP006-A和DP006-A-30的基峰色谱。

[0070] 本申请的详细说明

[0071] IL-2是一种有效的肿瘤免疫治疗药物。然而,由于IL-2的严重副作用,如毛细血管渗漏综合征(CLS)和中性粒细胞功能受损,以及多次静脉输注的需要等,限制了IL-2在癌症治疗中的应用,并引起了一定的关注。本申请的发明人生成了一种修饰的IL-2蛋白,该修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其显示出显著改善的循环半衰期和总暴露量($AUC_{0-inf}$)(PEG偶联物)和体内生物活性,导致给药频率降低。在一些实施方案中,通过在IL-2Rα亚基结合域内引入一个工程化的Q残基,修饰的 IL-2蛋白与IL-2Rα亚基的结合亲和力降低,而与IL-2Rβ和/或$\gamma_c$亚基的结合亲和力保持或仅受到轻微影响。通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联的PEG部分可进一步调节IL-2R亚基的结合和T细胞/NK细胞的激活,并改善修饰的IL-2蛋白的药代动力学特征,如延长IL-2的血清循环半衰期和增加总暴露量($AUC_{0-inf}$)。相较于未修饰IL-2蛋白,本文所述的修饰IL-2蛋白和修饰IL-2蛋白-PEG偶联物可选择性地激活NK细胞和效应T 细胞(CD8+T细胞)而不诱导Treg扩增(或诱导Treg活化程度远低于NK细胞/效应T细胞活化),以避免或减少免疫抑制活性和毒性。

[0072] 本申请在一个方面提供了一种包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白(以下也称为“修饰IL-2蛋白”)。在另一方面,本发明还提供一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,包含修饰的IL-2蛋白,该修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联(以下也称为“修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物”、“PEG 修饰的IL-2”、“聚乙二醇化修饰的IL-2”或“修饰的IL-2蛋白的PEG偶联物”)。在一些实施方案中,本文所述的修饰IL-2蛋白可用于制备本文所述的任意一种修饰IL-2蛋白-PEG 偶联物。在一些实施方案中,本文所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物可以包括本文所述的任意一种修饰的IL-2蛋白。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白具有两个或更多(例如两个)工程化的Q残基,并且至少一个工程化的Q残基与一个PEG部分偶联。在一些实施方案中,修饰IL-2蛋白的每个工程化的Q残基与一个PEG部分结合。在一些实施方案中,在包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白群体中,至少约90%(例如至少约91%、92%、 93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中的任意一个)的修饰的IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG部分偶联(例如一个PEG部分,与工程化的Q残基的至少一个,偶联,或每个工程化的Q残基与一个PEG部分偶联)。还提供了编码本文描述的修饰IL-2 蛋白的分离的核酸;包含这种分离的核酸的载体;包含这种分离的核酸或载体的宿主细胞;包含本文所述的修饰IL-2蛋白和/或修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的药物组合物;使用这样的药物组合物、本文所述的任何修饰的IL-2蛋白和/或本文所述的任何修饰的IL-2蛋白 -PEG偶联物的治疗方法;以及制备本文所述的修饰IL-2蛋白和/或修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的方法。还提供了试剂盒和制品。

[0073] I.定义

[0074] “转谷氨酰胺酶”在此可与“TGase”互换使用,是指能够进行转谷氨酰胺化反应的酶。此处使用的术语“转谷氨酰胺化”是指将来自蛋白/肽(例如,修饰的IL-2)的受体谷氨酰胺残基(例如,工程化的Q残基)的γ-谷氨酰胺转移到胺基,例如赖氨酸的伯胺或ε-氨基的

反应。

[0075] 当涉及多肽或蛋白的氨基酸残基时,术语“受体谷氨酰胺残基”是指谷氨酰胺残基(如本文所述的工程化的Q残基),其在适当的条件下被TGase识别,并可通过谷氨酰胺和供体胺基团(如赖氨酸或结构相关的伯胺如氨基戊基)之间的反应被TGase交联到包含供体胺基团的偶联部分。

[0076] 本文使用的“IL-2蛋白上的内源性受体谷氨酰胺残基”或“内源性Q残基”是指IL-2蛋白中天然存在的受体谷氨酰胺残基,而不是本文描述的工程化的Q残基。

[0077] 本文中使用的“工程化的Q残基”是指亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2或IL-2 Aldesleukin)中的非自然存在的受体谷氨酰胺残基,并且是(例如由)人工突变(例如插入或替换)的结果。有关例子,请参见下面的“工程化的Q残基”小节。

[0078] 此处使用的术语“胺供体基团”是指含有一个或多个活性胺(例如伯胺)的活性基团。例如,PEG部分可以包含胺供体基团(例如伯胺-$NH_2$)、可选接头和PEG分子。在一些实施方案中,胺供体基团是伯胺(-$NH_2$),其为谷氨酰胺转胺酶提供底物,使得PEG分子通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联。因此,工程化的Q残基和胺供体基团之间的连接可以是化学式-$CH_2$-$CH_2$-CO-NH-。PEG部分也可以是含有反应性Lys残基的聚合物。

[0079] 本文所用“PEG”、“聚乙二醇”和“聚(乙二醇)”是可互换的,且包括任何非肽水溶性聚 (环氧乙烷)。典型地,根据本发明使用的PEG包括以下结构“-$(OCH_2CH_2)_n$-”,其中(n)是2到4000的整数。如本文所用,PEG还包括“-$CH_2CH_2$-$O(CH_2CH_2O)_n$-$CH_2CH_2$-”和“-$(OCH_2CH_2)_nO$-”,取决于末端氧是否被替换,例如在合成转化过程中。术语“PEG”包括具有各种末端或“端帽”基团等的结构。术语“PEG”也指包含大量,即超过约50%的-$OCH_2CH_2$-重复亚基的多聚体。关于特定形式,所述PEG可以具有任意数量的多种分子量,以及诸如“支链”、“线形”、“分叉”、“多官能”等的结构或几何形状,将在下面更详细地描述。

[0080] 术语“端帽”和“末帽”在此可互换地使用,用于指代具有端帽部分的聚合物的末端或端点。

[0081] “非天然存在”对于本文所述的聚合物,例如PEG部分,是指其完整部分在自然界中没有发现的聚合物。然而,非自然存在的聚合物可以包含一个或多个自然存在的单体或单体片段,只要整个聚合物结构在自然界中没有发现。

[0082] 术语“间隔部分”、“连接”和“接头”在此用于指代可选地用于连接互连多个部分的键或原子或原子集合。所述间隔部分可以是水解稳定的,或者可以包括生理学上可水解或酶学上可降解的连接。除非上下文另有明确规定,间隔部分可选地存在于化合物的任意两个元素之间(例如,所提供包含有工程化的Q残基的修饰IL-2和PEG部分的偶联物可以通过间隔物或接头部分直接或间接连接)。

[0083] “可选的”或“可选地”是指随后描述的情况可能发生或可能不发生,因此描述包括情况发生的例子和情况不发生的例子。

[0084] “大体上”是指几乎全部或完全,例如,满足以下一个或多个条件:大于50%、大于等于51%、大于等于75%、大于等于80%、大于等于90%,和大于等于95%。

[0085] 如本文所用,术语“特异性结合”、“特异性识别”或“特异性用于”指可测量和可重复的相互作用,例如配体(例如,IL-2)与其对应的受体(或受体亚基,例如,IL-2R)之间的结合,这决定了在包括生物分子在内的异质分子群体存在时配体的存在。例如,特异性结合其

相应受体(或受体亚基,例如IL-2R)的配体(例如IL-2)是以比其结合其他受体更大的亲和力、亲合力、更容易和/或更长的持续时间结合该受体的配体。在一些实施方案中,例如通过放射免疫分析(RIA)或表面等离子体共振(SPR)测量的,配体(例如,IL-2)与无关受体的结合程度小于配体(例如,IL-2)与其相应受体(例如,IL-2R)的结合程度的约10%。在一些实施方案中,特异性结合其相应受体(或受体亚基,例如IL-2R)的配体(例如IL-2)具有≦100μM、≦10μM、≦1μM、≦100nM、≦10nM、≦1nM、≦0.1nM、或≦0.01nM的解离常数(Kd)。在一些实施方案中,特异性结合其相应受体(或受体亚基,例如,IL-2R)的配体 (例如,IL-2)在来自不同物种的蛋白中保守。在一些实施例中,特异性结合可以包括但不需要排他结合。

[0086] 术语"特异性"是指配体(如IL-2)对其相应受体(或受体亚基,如IL-2R)的选择性识别。

[0087] "结合亲和力"一般是指分子中单个结合位点之间的非共价相互作用总和的强度(例如,配体如IL-2,或其结合域)及其结合伴侣(例如,一种受体,如IL-2R或其亚基)。除非另有说明,如本文所用,"结合亲和力"是指反映结合对成员之间1:1相互作用的内在结合亲和力(例如,配体和受体,或配体结合域和受体亚基)。分子X(或X的结合位点)对其伴侣Y(或Y的相应识别位点)的亲和力通常可用解离常数(Kd)来表示。低亲和力的分子(如修饰的IL-2)通常会缓慢结合其结合伴侣(例如IL-2R或其亚基)并且容易解离,而高亲和力的分子通常更快地结合其结合伴侣,并倾向于保持更长的结合时间。测量结合亲和力的各种方法在本领域中是已知的,其中任何一种方法都可用于本申请的目的。下面描述用于测量结合亲和力的具体说明性和示例性实施例。本领域已知的任何合适的配体结合测定或抗体/抗原结合测定可用于测量结合亲和力,例如,RIA、SPR、Biacore测定、Octet分析等等。

[0088] 相对于肽或多肽序列的"氨基酸序列同一性百分比(%)"和"同源性",定义为在序列对齐和必要时引入间隙以实现最大的序列同一性百分比之后,候选序列中与特定肽或多肽序列中氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比,并且不考虑任何保守替换作为序列同一性的一部分。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以在本领域技术人员范围内以各种方式实现,例如使用公开可用的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或 Megalign™ (DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在被比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0089] 本文所述的"分离的"核酸分子(例如,编码修饰的IL-2蛋白)是一种核酸分子,其被鉴定并与至少一种污染核酸分子分离,在其产生的环境中,污染核酸分子通常与其相关联。如果分离的核酸不与与生产环境相关的所有成分结合最好。本文所述的分离的编码多肽和抗体的核酸分子的形式不同于其在自然界中被发现的形式或环境。因此,分离的核酸分子不同于编码本文中天然存在于细胞中的多肽和抗体的核酸。

[0090] 术语"控制序列"是指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的DNA 序列。例如,适用于原核生物的控制序列包括启动子、可选的操作序列和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。

[0091] 当核酸被置于与另一核酸序列的功能关系中时,核酸被"可操作地连接"。例如,如果前序列或分泌前导序列的DNA表达为参与多肽分泌的前蛋白,则它与多肽的DNA可操作地连接;如果启动子或增强子影响序列的转录,则启动子或增强子与编码序列可操作地连接;或核糖体结合位点与编码序列可操作地连接,如果它被定位以协助翻译。通常,"可操作连

接”意味着被连接的DNA序列是连续的,在分泌前导序列的情况下,是连续的并处于阅读段(reading phase)。但是,增强子不必是连续的。连接是通过在方便的限制性位点连接来完成的。如果不存在这样的位点,则按照传统方法使用合成的寡核苷酸适配子或接头。

[0092] 除另有说明外,“编码一个氨基酸序列的核苷酸序列”包括所有相互的退化的版本、编码同一氨基酸序列的核苷酸序列。编码蛋白或RNA的短核苷酸序列也可以包括内含子,以至于编码蛋白的核苷酸序列在某些版本中可能包含内含子。

[0093] 如本文所用,术语“载体”是指能够复制与其连接的另一种核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体,以及被引入宿主细胞基因组的载体。某些载体能够引导与其操作连接的核酸的表达。这样的载体在这里称为“表达载体”。

[0094] 这里所用的术语“转染”或“转化”或“转导”是指外源核酸转移或引入宿主细胞的过程。“转染”或“转化”或“转导”细胞是指用外源核酸转染、转化或转导的细胞。该细胞包括主要受试者细胞及其后代。

[0095] 如本文所用,“治疗”或“进行治疗”是一种获得有益或期望结果的方法,包括临床结果。为了本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于以下一个或多个:减轻由疾病引起的一个或多个症状、减小疾病的范围、稳定疾病(例如,防止或延缓病情恶化),防止或延缓疾病传播(例如转移),预防或延缓疾病的复发,延缓或减缓疾病的进展,改善疾病状态,提供疾病的缓解(部分或全部),减少治疗疾病所需的一种或多种其他药物的剂量,延缓疾病的进展,提高生活质量,和/或延长生存期。“治疗”还包括减少癌症的病理后果。本申请的方法考虑了这些治疗方面中的任何一个或多个。

[0096] 如本文所用,“个体”或“受试者”指哺乳动物,包括但不限于人、牛、马、猫科动物、犬科动物、啮齿动物或灵长类动物。在一些实施例中,个体是人。此处使用的“患者”包括任何患有疾病(例如,癌症)的人。术语“受试者”、“个人”和“患者”在此可互换使用。

[0097] 如本文所用,术语“有效量”是指足以治疗特定的紊乱、状况或疾病,例如改善、减轻、减少和/或延迟其一个或多个症状的药剂的量,例如此处描述的修饰IL-2蛋白或修饰IL-2 蛋白-PEG偶联物,或其药物组合物。关于癌症,有效量包括足以引起肿瘤缩小和/或降低肿瘤生长速率(例如抑制肿瘤生长)或防止或延迟其他不想要的细胞增殖。在一些实施例中,有效量是足以延迟发展的量。在一些实施例中,有效量是足以防止或延迟复发的量。有效量可以一次或多次给药。药物(例如修饰的IL-2蛋白或修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物) 或组合物(例如药物组合物)的有效量可能可以:(i)减少癌细胞的数量;(ii)缩小肿瘤大小;(iii)在一定程度上抑制、延缓、减缓甚至阻止癌细胞向外周器官浸润;(iv)禁止(即在某种程度上减缓甚至阻止)肿瘤转移;(v)抑制肿瘤生长;(vi)防止或延迟肿瘤的发生和/或复发;和/或(vii)在某种程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状。在一些实施例中,有效治疗量是延长患者生存期的量。

[0098] 如本文所用,“延缓”疾病的发展是指延缓、阻碍、减缓、延缓、稳定和/或推迟疾病的发展(例如,癌症)。这种延迟可以有不同的时间长度,这取决于疾病和/或正在治疗的个人的病史。对本领域技术人员来说显而易见的是,充分的或显著的延迟实际上可以包括预防,因为个体不发展疾病。一种“延迟”癌症发展的方法是与不使用该方法相比,在给定时间范围内减少疾病发展的概率和/或在给定时间范围内降低疾病程度的方法。这种比较通常基于临床研究,使用统计上显著数量的个体。癌症的发展可以用标准方法检测,包括但不限

于,计算机轴向断层扫描(CAT扫描),磁共振成像(MRI),腹部超声,凝血测试,动脉造影,或活检。发展也可能是指最初无法检测到的癌症进展,包括发生、复发和发病。

[0099] 如本文所用,术语“刺激”指的是由细胞表面部分的连接诱导的初级反应。例如,在受体的背景下,这种刺激需要受体的连接和随后的信号转导事件。关于T细胞的刺激,这种刺激是指在一个实施方案中,T细胞表面部分的连接随后诱导信号转导事件,例如结合TCR/CD3复合物。此外,刺激事件可激活细胞并上调或下调分子的表达或分泌。因此,细胞表面部分的连接,即使在没有直接信号转导事件的情况下,也可能导致细胞骨架结构的重组或细胞表面部分的合并,每个表面部分都可以用于增强、修饰或改变随后的细胞反应。

[0100] 如本文所用,术语“活化”是指细胞在充分连接细胞表面部分以诱导显著的生化或形态变化后的状态。在T细胞的背景下,这种激活是指T细胞被充分刺激以诱导细胞增殖的状态。T细胞的激活还可以诱导细胞因子的产生和调节或溶解细胞的效应功能的发挥。T 细胞的活化还可诱导细胞因子的产生和调节或细胞溶解效应功能的表现。在其他细胞的范围内,该术语可推断出某种特定物理化学过程的上升或下降的调节。术语“活化的T细胞”指的是目前正在经历细胞分裂、细胞因子生产、调节或溶解细胞效应功能的T细胞,和/ 或最近经历“活化”过程的T细胞。

[0101] “生物活性”或“生物活性“包括但不限于一个分子(例如,IL-2)特异性结合其相应受体 (例如,IL-2R)的能力,适当地诱导下游信号转导,例如诱导细胞增殖、分化、细胞因子产生和/或调节或细胞溶解效应物功能的执行。

[0102] 应当理解,在此描述的本申请的实施例包括“由……组成”和/或“基本上由……组成”实施例。

[0103] 此处对“大约”值或参数的引用包括(并描述)针对该值或参数本身的变化。例如,提及“关于X”的描述包括“X”的描述。

[0104] 如本文所用,对“不”值或参数的引用通常意味着并描述“除了”该值或参数。例如,该方法不用于治疗X型癌症意味着该方法用于治疗X型以外的癌症。

[0105] 本文使用的术语“约X-Y”与“约X至约Y”具有相同的含义。

[0106] 如本文和所附权利要求中所用,单数形式“一个”、“或”和“该”包括复数形式,除非上下文另有明确规定。

[0107] II.修饰的IL-2蛋白和修饰的IL-2蛋白-PEG(聚乙二醇)偶联物

[0108] 在一个方面,本发明提供了一种修饰的IL-2蛋白,其包含工程化Q残基。本发明在另一方面还提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,该偶联物包含修饰的IL-2蛋白,该修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG 部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联。在一些实施方案中,本文所述的修饰 IL-2蛋白可用于制备本文所述的任何修饰IL-2蛋白-PEG偶联物。在一些实施方案中,本文所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物可以包括本文所述的任意一种修饰的IL-2蛋白。

[0109] 在一些实施方案中,还提供特异性识别本文所述的任何修饰的IL-2蛋白的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,还提供特异性识别本文所述的任何修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段可用于检测或测量本文所述的任何修饰的IL-2蛋白或修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的蛋白浓度(例如,在ELISA中)。

[0110] 在一些实施方案中,工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合域内。在一些实施方案中,工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合结构域之外约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3 个氨基酸残基中的任何一个)之间。

[0111] 因此,在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG- 胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,并且其中工程化的Q 残基位于IL-2Rα亚基结合域内。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG 偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,该修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,并且其中工程化的Q残基位于IL-2Rα亚基结合结构域之外的介于约1到约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q 残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合域内。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合结构域之外约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含一个工程化的Q残基。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含两个或多个(例如两个)工程化的Q残基。在一些实施方案中,所述工程化的Q残基是(例如,来自)相对于亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2 阿地白介素)的单个氨基酸突变(例如,插入、取代)的结果。在一些实施方案中,单个氨基酸突变(例如,替换)选自下组:F43Q、R37Q、F41Q、K42Q、Y44Q、T36Q、M38Q,或其组合,其中氨基酸位置相对于亲本IL-2蛋白(例如,IL-2阿地白介素)。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白是IL-2阿地白介素,其包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:2和4-8所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述工程化Q残基是适合TGase反应的外源补丁序列的一部分(当修饰的 IL-2蛋白包含作为外源补丁序列一部分的工程化Q残基时,所述修饰的IL-2蛋白包含外源补丁序列,并且工程化的Q残基是补丁序列中的氨基酸残基之一)。在一些实施方案中,外源补丁序列取代一部分亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白是阿地白介素,其包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,外源补丁序列选自LEEQAA(SEQ ID NO:9)、IFKQTY(SEQ ID NO: 10)、PKEQKY(SEQ ID NO:11)、VIQGV(SEQ ID NO:12)、REEQFN(SEQ ID NO:13)、GLLQGA(SEQ ID NO:14),或其组合。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:3和15-19任一所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白进一步包含一个或多个非工程化的Q残基的额外氨基酸突变。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2 Aldesleukin)具有至少约95%(例如约96%、约97%、约98%、约99%或约100%中的至少任一种)同一性的氨基酸序列,所述亲本IL-2蛋白包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在一些实施例中,修饰的IL-2 蛋白与IL-2Rα亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间结合$K_D$的约2-约800倍(例如,约2-约10倍、约10-约50倍、约2-约50倍、约400-约500倍或约476倍)。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间结合$K_D$的约1-约30倍(例如,约1-约10倍、约10-约20倍或约16倍)。在一实施方案中,修饰的IL-2蛋白能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T细胞($T_c$,细胞

毒性 T淋巴细胞,或CTL),辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT) 细胞和自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白相比,修饰的IL-2蛋白具有约2至约50倍(例如,约2至约10倍)降低的激活Treg细胞的能力。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素) 相比,激活CTL或NK细胞的能力相似(例如相等)或降低约1至约5倍。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白具有类似(例如,等于)或约1至约20倍(例如,约1至约10倍)更高的能力来增加CTL 与Treg的比率或NK细胞与Treg的比率。在一些实施例中,PEG部分是线性的。在一些实施例中,PEG部分是分枝的。在一些实施方案中,PEG部分的分子量在约10kDa和约 40kDa之间,例如约20kDa、约30kDa或约40kDa。在一些实施方案中,PEG部分被选自羟基、烷氧基、取代的烷氧基、烯氧基、取代的烯氧基、炔氧基、取代的炔氧基、芳氧基和取代的芳氧基的封端部分所封端。在一些实施方案中,PEG部分是甲氧基-PEG-胺。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物包括修饰的IL-2蛋白,该修饰的IL-2 蛋白包括一个工程化的Q残基,其中一个PEG部分通过一个工程化的Q残基与修饰的IL-2 蛋白偶联。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括两个或更多个工程化的Q残基,其中两个或更多个工程化的Q残基中的每一个都与一个PEG部分偶联。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括两个或更多个工程化的Q残基,其中两个或更多个工程化的Q残基中的至少一个分别与一个PEG部分偶联。在一些实施方案中,PEG部分的结合是通过 TGase介导的,例如微生物TGase(mTGase)。在一些实施方案中,TGase是野生型TGase,例如包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。在一些实施例中,TGase是工程化的TGase。在一些实施方案中,所述工程TGase包含与野生型TGase具有至少约80%(例如至少约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)同一性的氨基酸序列,例如包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,TGase具有至少约90%(例如至少约90%、 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的纯度。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间结合$K_D$的约10-约2000倍(例如,约10-约50倍、或约100-约2000倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物不结合或不能被检测(例如,通过SPR)到结合IL-2Rα亚基。在一些实施例中,修饰的IL-2 蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$与亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2 或IL-2阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间结合$K_D$类似(例如等于),或为约1-约30倍(例如,约1-约10倍、约10-约8倍或约11倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T细胞($T_c$,细胞毒性T淋巴细胞,或CTL),辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK) 细胞。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物激活Treg细胞的能力降低了约2至约5000倍。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物激活CTL或NK细胞的能力相似或降低了约1至约50倍。

[0112] 在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白和/或修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物优先激活IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。在一些实施例中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介

素)相比,所述修饰的IL-2蛋白和/或修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物对CTL和/或NK细胞具有对Treg细胞相似或优先的激活,其具有类似(例如,等于)或约1至约20倍(例如,约 1至约10倍)更高的能力来增加CTL与Treg的比率或NK细胞与Treg的比率。

[0113] 在一些实施方案中,所述工程化的Q残基是(例如,来自)相对于亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)的单个氨基酸突变(例如,插入、取代)的结果。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白是阿地白介素,其包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,单个氨基酸突变选自下组:F43Q、R37Q、F41Q、K42Q、Y44Q、 T36Q、M38Q、或其组合,其中氨基酸残基位置相对于包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白。

[0114] 因此,在一些实施方案中,提供了包含工程化Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化Q残基是(例如,来自)相对于亲本IL-2蛋白(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的IL-2蛋白Aldesleukin)的单个氨基酸突变(例如,插入、取代)。在一些实施方案中,提供了包含工程化Q残基的修饰的IL-2蛋白,其中工程化Q残基是(例如,源自)相对于亲本IL-2 蛋白(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的IL-2蛋白Aldesleukin)的单个氨基酸突变 (例如,插入、取代),并且其中工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合域内。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是(例如来自) 相对于亲本IL-2蛋白(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的IL-2蛋白Aldesleukin) 的单个氨基酸突变(例如,插入、取代),并且其中工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合域外的约1-约3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是(例如来自) 相对于包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的单个氨基酸突变(例如,插入、取代),其中所述单个氨基酸突变选自下组:F43Q、R37Q、F41Q、K42Q、Y44Q、 T36Q、M38Q、或其组合。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含一个工程化的Q残基。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含两个或多个(例如两个)工程化的Q残基。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白进一步包含一个或多个非工程化的Q残基的额外氨基酸突变。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)具有至少约95%(例如至少约96%、97%、98%、99%或100%中的任何一种)同一性的氨基酸序列,例如所述亲本IL-2蛋白包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白,其包含相对于含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的F34Q的工程化Q残基。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白,其包含相对于含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的R37Q的工程化Q残基。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白,其包含相对于含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的F41Q的工程化Q残基。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白,其包含相对于含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的K42Q的工程化Q残基。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2 蛋白,其包含相对于含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的Y44Q的工程化 Q残基。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白,其包含相对于含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的R37Q的第一工程化Q残基和Y44Q的第二工程化Q 残基。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:2和4-8所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2 阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白降低了与IL-2Rα亚基的结合。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基之间结合的$K_D$为

亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或 IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间结合$K_D$的约2-约800倍(例如,约2-约10倍、约10- 约50倍、约2-约50倍、约400-约500倍或约476倍)。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间结合$K_D$的约1-约30倍(例如,约1-约10倍、约10-约20倍或约 16倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T细胞 ($T_c$,细胞毒性T淋巴细胞,或CTL),辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白与亲本 IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,激活Treg细胞的能力降低约2至约50倍(例如,约2至约10倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白与亲本 IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,激活CTL或NK细胞的能力相似(例如相等)或降低约1至约5倍。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白具有类似(例如,等于)或约1 至约20倍(例如,约1至约10倍)更高的能力来增加CTL与Treg的比率或NK细胞与Treg 的比率。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白优先激活IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。

[0115] 在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含含有工程化的 Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺)的修饰的IL-2蛋白,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,并且其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的其他氨基酸序列的一部分。其中工程化的Q残基是(例如来自)相对于亲本IL-2蛋白(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的IL-2蛋白Aldesleukin)的单个氨基酸突变(例如,插入、取代)。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含含有工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺)的修饰的IL-2蛋白,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,其中工程化的Q残基是(例如来自)相对于亲本 IL-2蛋白(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的IL-2蛋白Aldesleukin)的单个氨基酸突变(例如,插入、取代),并且其中工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合域内。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含含有工程化的Q残基和PEG 部分(例如,甲氧基-PEG-胺)的修饰的IL-2蛋白,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,其中工程化的Q残基是(例如来自)相对于亲本IL-2蛋白(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的IL-2蛋白Aldesleukin)的单个氨基酸突变(例如,插入、取代),并且其中工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合域外的约1-约3个氨基酸残基(如1、 2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含含有工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺)的修饰的IL-2蛋白,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,其中工程化的Q残基是(例如来自)相对于包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的单个氨基酸突变(例如,插入、取代),其中所述单个氨基酸突变选自下组:F43Q、R37Q、F41Q、 K42Q、Y44Q、T36Q、M38Q、或其组合。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含一个工程化的Q残基。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含两个或多个(例如两个)工程化的Q残基。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物包括修饰的IL-2蛋白,该修饰的IL-2蛋白包括一个工程化的Q残基,其中一个PEG部分通过一个工程化的Q 残基与修饰的IL-2蛋白偶联。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括两个或更多个工程化的Q残

基,其中两个或更多个工程化的Q残基中的每一个都与一个PEG部分偶联。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括两个或更多个工程化的Q残基,其中两个或更多个工程化的Q残基中的至少一个分别与一个PEG部分偶联。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白进一步包含一个或多个非工程化的Q残基的额外氨基酸突变。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2蛋白或IL-2 Aldesleukin)具有至少约95%(例如至少约96%、97%、98%、99%或100%中的任何一种) 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含含有工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺)的修饰的IL-2蛋白,其中 PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,其中工程化的Q残基是(例如来自)相对于含有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的F43Q的单个氨基酸突变。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含含有工程化的 Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺)的修饰的IL-2蛋白,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,其中工程化的Q残基是(例如来自)相对于含有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的R37Q的单个氨基酸突变。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含含有工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺)的修饰的IL-2蛋白,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2 蛋白偶联,其中工程化的Q残基是(例如来自)相对于含有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的F41Q的单个氨基酸突变。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2 蛋白-PEG偶联物,其包含含有工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺)的修饰的IL-2蛋白,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,其中工程化的Q残基是(例如来自)相对于含有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的 K42Q的单个氨基酸突变。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含含有工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺)的修饰的IL-2蛋白,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,其中工程化的Q残基是(例如来自)相对于含有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的Y44Q的单个氨基酸突变。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含含有两个工程化的Q残基和一个PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺)的修饰的IL-2蛋白,其中PEG部分通过工程化的Q残基中的一个与修饰的IL-2蛋白偶联,其中工程化的Q残基是(例如来自)相对于含有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的R37Q和Y44Q的单个氨基酸突变。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含含有两个工程化的Q残基和两个PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺)的修饰的IL-2蛋白,其中一个PEG部分通过每个工程化的Q残基偶联,其中工程化的Q残基是(例如来自)相对于含有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的R37Q和Y44Q的单个氨基酸突变。在一些实施例中,两个PEG部分是相同的。在一些实施例中,两个PEG部分是不同的。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:2和4-8中任一所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含含有工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺)的修饰的IL-2蛋白,其中PEG部分通过工程化的 Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,其中工程化的Q残基是(例如来自)相对于含有SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的单个氨基酸突变,并且其中所述修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO: 2和4-8中任一所示的氨基酸序列。在一些实施例中,PEG部分是线性的。在一些实施例中,PEG部分是分枝的。在一些实施方案中,PEG部分的分子量在约10kDa 和约40kDa之间,例如

约20kDa、约30kDa或约40kDa。在一些实施方案中,PEG部分被选自羟基、烷氧基、取代的烷氧基、烯氧基、取代的烯氧基、炔氧基、取代的炔氧基、芳氧基和取代的芳氧基的封端部分所封端。在一些实施方案中,PEG部分是甲氧基-PEG- 胺。在一些实施方案中,PEG部分的结合是通过TGase介导的,例如微生物

[0116] TGase(mTGase)。在一些实施方案中,TGase是野生型TGase,例如包含SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列。在一些实施例中,TGase是工程化的TGase。在一些实施方案中,所述工程TGase包含与野生型TGase具有至少约80%(例如至少约85%、90%、95%、96%、 97%、98%或99%)同一性的氨基酸序列,例如所述野生型TGase包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,TGase具有至少约90%(例如至少约90%、91%、 92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的纯度。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间结合$K_D$的约10-约2000倍(例如,约10- 约50倍、或约10-约100倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物不结合或不能被检测(例如,通过SPR)到结合IL-2Rα亚基。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白 -PEG偶联物与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$与亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2 阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间结合$K_D$类似(例如等于),或为约1-约30倍(例如,约1- 约10倍、约10-约8倍或约11倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T细胞($T_c$,细胞毒性T淋巴细胞,或CTL),辅助性T 细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物激活Treg细胞的能力降低了约2至约5000倍。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物具有类似于(例如等于)或约1至约50倍的降低激活CTL或NK 细胞的能力。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物优先激活IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物在CTL和/或NK细胞上具有与Treg细胞相似或优先的激活,例如与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,具有相似(例如相等)或约1至约20倍(例如约1至约10倍)更高的能力来增加CTL与Treg的比率或NK细胞与Treg的比率。

[0117] 在一些实施方案中,工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列的一部分。当修饰的IL-2蛋白包括作为外源补丁序列一部分的工程化的Q残基时,修饰的IL-2蛋白包括外源补丁序列,并且工程化的Q残基是补丁序列内的氨基酸残基之一。在一些实施方案中,外源补丁序列取代亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)序列的一部分。在一些实施方案中,外源补丁序列选自LEEQAA(SEQ ID NO:9)、 IFKQTY(SEQ ID NO:10)、PKEQKY(SEQ ID NO:11)、VIQGV(SEQ ID NO:12)、REEQFN(SEQ ID NO:13)、GLLQGA(SEQ ID NO:14),或其组合。在一些实施方案中,所述亲本IL-2蛋白包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,与亲本IL-2 蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白和/或修饰的IL-2 蛋白-PEG偶联物优先激活IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。

[0118] 因此,在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程

化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列的一部分。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列的一部分,并且其中工程化的Q残基为(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在 IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列的一部分,并且其中外源补丁序列替换亲本IL-2蛋白的一部分(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白)。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列的一部分,其中外源性补丁序列替换了一部分亲本IL-2 蛋白(如包含SEQ ID NO:1氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),并且其中工程化的Q残基为(a) 在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(如1、 2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列的一部分,其中外源补丁序列替换亲本IL-2蛋白的一部分(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),并且其中的外源补丁序列选自下组:LEEQAA(SEQ ID NO:9)、IFKQTY (SEQ ID NO:10)、PKEQKY(SEQ ID NO:11)、VIQGV(SEQ ID NO:12)、REEQFN(SEQ ID NO:13)、GLLQGA(SEQ ID NO:14),或其组合。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列的一部分,其中外源补丁序列替换亲本IL-2蛋白的一部分(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),其中外源补丁序列选自下组:LEEQAA(SEQ ID NO:9)、IFKQTY(SEQ ID NO:10)、PKEQKY(SEQ ID NO:11)、VIQGV(SEQ ID NO:12)、REEQFN(SEQ ID NO:13)、GLLQGA(SEQ ID NO:14),或其组合,并且其中所述工程化的Q残基是(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含一个工程化的Q残基。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含两个或多个(例如两个) 工程化的Q残基。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白进一步包含一个或多个非工程化的Q残基的额外氨基酸突变。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括与亲本IL-2蛋白 (例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)具有至少约95%(例如至少约96%、97%、 98%、99%或100%中的任何一种)同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述修饰的 IL-2蛋白包含SEQ ID NOs:3和15-19的任意氨基酸序列。在一些实施方案中,与亲本IL-2 蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白降低了与IL-2 Rα亚基的结合。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基之间结合的$K_D$为亲本 IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间结合$K_D$的约2- 约800倍(例如,约2-约10倍、约10-约50倍、约2-约50倍、约400-约500倍或约476 倍)。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$是、或接近于(例等于)亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间结合 $K_D$的约1-约30倍(例如,约1-约10倍、约10-约20倍或约16倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T细胞($T_c$,细胞毒性T淋巴细胞,或CTL),辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白降低了约2至约50倍(例如,约2至约10倍)的激活Treg

细胞的能力。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,激活CTL或NK细胞的能力相似(例如相等)或降低约1至约5倍。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白具有类似(例如,等于)或约1至约20倍(例如,约1至约10 倍)更高的能力来增加CTL对Treg的比率或NK细胞对Treg的比率。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白优先激活IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。

[0119] 在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列LEEQAA(SEQ ID NO:9)的一部分,并且其中工程化的Q残基为(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约 3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列IFKQTY(SEQ ID NO:10)的一部分,并且其中工程化的Q残基为(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰 IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列PKEQKY(SEQ ID NO:11)的一部分,并且其中工程化的Q残基为(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列VIQGV(SEQ ID NO:12)的一部分,并且其中工程化的Q残基为(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列REEQFN(SEQ ID NO:13)的一部分,并且其中工程化的Q残基为(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2 蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列GLLQGA(SEQ ID NO:14)的一部分,并且其中工程化的Q残基为(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列LEEQAA(SEQ ID NO:9)的一部分,其中外源性补丁序列替换了一部分亲本IL-2蛋白(如包含SEQ ID NO:1氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),并且其中工程化的Q残基为(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase 反应的外源补丁序列IFKQTY(SEQ ID NO:10)的一部分,其中外源性补丁序列替换了一部分亲本IL-2蛋白(如包含SEQ ID NO:1氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),并且其中工程化的Q残基为(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列PKEQKY(SEQ ID NO:11)的一部分,其中外源性补丁序

列替换了一部分亲本IL-2 蛋白(如包含SEQ ID NO:1氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),并且其中工程化的Q残基为(a) 在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列VIQGV(SEQ ID NO:12)的一部分,其中外源性补丁序列替换了一部分亲本IL-2蛋白(如包含SEQ ID NO:1氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),并且其中工程化的Q残基为(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列REEQFN(SEQ ID NO:13)的一部分,其中外源性补丁序列替换了一部分亲本IL-2蛋白(如包含SEQ ID NO:1氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),并且其中工程化的Q残基为(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b) 在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列GLLQGA(SEQ ID NO:14)的一部分,其中外源性补丁序列替换了一部分亲本IL-2蛋白(如包含SEQ ID NO:1氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),并且其中工程化的Q残基为(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白进一步包含一个或多个非工程化的Q残基的额外氨基酸突变。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)具有至少约95%(例如至少约96%、97%、98%、99%或100%中的任何一种)同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白,其中工程化的Q残基是适于TGase反应的外源补丁序列的一部分,其中外源补丁序列替换包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白的一部分,并且其中所述修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:3和15-19中任一所示的氨基酸序列。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间结合$K_D$的约2-约800倍(例如,约2-约10 倍、约10-约50倍、约2-约50倍、约400-约500倍或约476倍)。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$接近于(例如,等于)亲本IL-2蛋白(如野生型 IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间结合$K_D$的约1-约30倍(例如,约1- 约10倍、约10-约20倍或约16倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T细胞($T_c$,细胞毒性T淋巴细胞,或CTL),辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白降低了约2至约50倍(例如,约2至约10倍)的激活Treg细胞的能力。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素) 相比,激活CTL或NK细胞的能力相似(例如相等)或降低约1至约5倍。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白具有类似(例如,等于)或约1至约20倍(例如,约1至约10倍)更高的能力来增加CTL 对Treg的比率或NK细胞对Treg的比率。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白优先激活IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。

[0120] 在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含含有工程化的 Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺)的修饰的IL-2蛋白,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,并且其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列的一部分。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,该修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,其中工程化的 Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列的一部分,并且其中工程化的Q残基在IL-2 Rα亚基结合域内。在一些实施例中,本发明提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,该修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列的一部分,并且其中工程化的Q残基位于 IL-2Rα亚基结合域之外的约1-约3个氨基酸残基之间(例如1、2或3个氨基酸残基中的任一个)。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的 IL-2蛋白,该修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列的一部分,并且其中外源补丁序列取代了部分的亲本IL-2 蛋白(例如,包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白)。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,其中工程化的Q残基是适于TGase反应的外源补丁序列的一部分,其中所述外源补丁序列取代部分的亲本IL-2蛋白(例如,包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),其中所述工程化的Q残基位于IL-2Rα亚基结合域内。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG 部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的Q残基是适于TGase反应的外源补丁序列的一部分,其中所述外源补丁序列取代部分的亲本IL-2蛋白(例如,包括SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),并且其中所述工程化的Q残基在IL-2 Rα亚基结合结构域外的约1-约3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个) 之间。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2 蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的Q残基是适于TGase反应的外源补丁序列的一部分,其中所述外源补丁序列取代部分的亲本IL-2蛋白(例如,包括SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白);,,并且其中的外源补丁序列选自下组:LEEQAA(SEQ ID NO:9)、IFKQTY(SEQ ID NO:10)、PKEQKY(SEQ ID NO: 11)、VIQGV(SEQ ID NO:12)、REEQFN(SEQ ID NO:13)、GLLQGA(SEQ ID NO:14),或其任意组合。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG- 胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的Q残基是适于TGase反应的外源补丁序列的一部分,其中所述外源补丁序列取代部分亲本IL-2 蛋白(例如,包括SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),其中外源补丁序列选自LEEQAA(SEQ ID NO:9),IFKQTY(SEQ ID NO:10)、PKEQKY(SEQ ID NO:11),VIQGV

(SEQ ID NO:12)、REEQFN(SEQ ID NO:13),GLLQGA(SEQ ID NO:14)及其任何组合,其中所述工程化的Q残基位于IL-2Rα亚基结合域内。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的 Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的Q残基是适于TGase反应的外源补丁序列的一部分,其中所述外源补丁序列取代部分亲本IL-2蛋白(例如,包括SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),其中外源补丁序列选自下组:LEEQAA(SEQ ID NO:9)、 IFKQTY(SEQ ID NO:10)、PKEQKY(SEQ ID NO:11)、VIQGV(SEQ ID NO:12)、 REEQFN(SEQ ID NO:13)、GLLQGA(SEQ ID NO:14),或其任意组合,其中所述工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合域外约1-3个氨基酸残基(如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含一个工程化的Q残基。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含两个或多个(例如两个)工程化的Q残基。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白进一步包含一个或多个非工程化的Q残基的额外氨基酸突变。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2蛋白、 IL-2阿地白介素)具有至少约95%(例如至少约96%、97%、98%、99%或100%中的任何一种)同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物包括修饰的 IL-2蛋白,该修饰的IL-2蛋白包括一个工程化的Q残基,其中一个PEG部分通过一个工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括两个或更多个(例如两个)工程化的Q残基,其中两个或更多个工程化的Q残基中的每一个都与一个PEG部分偶联。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括两个或更多个工程化的Q 残基,其中两个或更多个工程化的Q残基中的至少一个分别与一个PEG部分偶联。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:3和15-19的任意氨基酸序列。在一些实施例中,PEG部分是线性的。在一些实施例中,PEG部分是分枝的。在一些实施方案中,PEG部分的分子量在约10kDa和约40kDa之间,例如约20kDa、约30kDa或约 40kDa。在一些实施方案中,PEG部分被选自羟基、烷氧基、取代的烷氧基、烯氧基、取代的烯氧基、炔氧基、取代的炔氧基、芳氧基和取代的芳氧基的封端部分所封端。在一些实施方案中,PEG部分是甲氧基-PEG-胺。在一些实施方案中,PEG部分的结合是通过 TGase介导的,例如微生物TGase(mTGase)。在一些实施方案中,所述TGase为野生型 TGase,例如包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。在一些实施例中,TGase是工程化的TGase。在一些实施方案中,所述工程化的TGase包含的氨基酸序列与包含SEQ ID NO:20所示氨基酸序列的野生型TGase具有至少约80%(例如至少约85%、90%、95%、96%、 97%、98%或99%中的任何一种)同一性。在一些实施方案中,TGase具有至少约90%(例如至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的纯度。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2 蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间结合$K_D$的约10-约 2000倍(例如,约10-约50倍或约50-约500倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG 偶联物不结合或不能被检测(例如,通过SPR)到结合IL-2Rα亚基。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间结合$K_D$类似(例如等于),或为约1-约30 倍(例如,约1-约10倍、约10-约8倍或约11倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白 -PEG偶联物能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T细胞($T_c$,细胞毒性T淋巴细胞,或 CTL),辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细

胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,降低了约2至约5000倍(例如,约2至约 50倍)的激活Treg细胞的能力。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物具有类似于(例如等于)或约1至约50倍的降低激活CTL或NK细胞的能力。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物优先激活IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物在CTL和/或 NK细胞上具有与Treg细胞相似或优先的激活,例如与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,具有相似(例如相等)或约1至约20倍(例如约1至约10 倍)更高的能力来增加CTL对Treg的比率或NK细胞对Treg的比率。

[0121] 因此,在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG- 胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列LEEQAA(SEQ ID NO:9)的一部分,其中所述工程化的Q残基(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列

[0122] IFKQTY(SEQ ID NO:10)的一部分,其中所述工程化的Q残基(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的 Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列PKEQKY(SEQ ID NO:11)一部分,其中所述工程化的Q残基(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q 残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列 VIQGV(SEQ ID NO:12)的一部分,其中所述工程化的Q残基(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的 Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列REEQFN(SEQ ID NO:13)的一部分,其中所述工程化的Q残基(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白

包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的 Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列GLLQGA(SEQ ID NO:14)的一部分,其中所述工程化的Q残基是(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列LEEQAA(SEQ ID NO:9)的一部分,其中外源补丁序列替换一部分亲本IL-2蛋白(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白)其中所述工程化的Q残基是(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2 蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列IFKQTY(SEQ ID NO:10)的一部分,其中外源补丁序列替换部分亲本IL-2蛋白(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2)其中所述工程化的Q残基是(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3 个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的 Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的Q残基是适于TGase反应的外源补丁序列PKEQKY(SEQ ID NO:11)的一部分,其中所述外源补丁序列替换部分亲本IL-2蛋白(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),其中所述工程化的Q残基是(a) 在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(例如 1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2 蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2 蛋白结合,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列VIQGV(SEQ ID NO: 12)的一部分,其中外源补丁序列替换一部分亲本IL-2蛋白(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白),其中所述工程化的Q残基是(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的 Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列REEQFN(SEQ ID NO:13)的一部分,其中外源补丁序列替换一部分亲本IL-2蛋白(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2 蛋白)其中所述工程化的Q残基是(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补

丁序列GLLQGA(SEQ ID NO:14)的一部分,其中外源补丁序列替换一部分亲本IL-2蛋白(例如包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白)其中所述工程化的 Q残基是(a)在IL-2Rα亚基结合域内;或(b)在IL-2Rα亚基结合域外的约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,修饰的IL-2 蛋白进一步包含一个或多个非工程化的Q残基的额外氨基酸突变。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)具有至少约95%(例如至少约96%、97%、98%、99%或100%中的任何一种)同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,提供了一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其包含修饰的IL-2 蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包含工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG-胺),其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联,其中工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列的一部分,其中外源补丁序列取代部分包含SEQ ID NO: 1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白(Aldesleukin),其中所述修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:3和15-19中任一所示的氨基酸序列。在一些实施例中,PEG部分是线性的。在一些实施例中,PEG部分是分枝的。在一些实施方案中,PEG部分的分子量在约10kDa和约 40kDa之间,例如约20kDa、约30kDa或约40kDa。在一些实施方案中,PEG部分被选自羟基、烷氧基、取代的烷氧基、烯氧基、取代的烯氧基、炔氧基、取代的炔氧基、芳氧基和取代的芳氧基的封端部分所封端。在一些实施方案中,PEG部分是甲氧基-PEG-胺。在一些实施方案中,PEG部分的结合是通过TGase介导的,例如微生物TGase(mTGase)。在一些实施方案中,所述TGase为野生型TGase,例如包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。在一些实施例中,TGase是工程化的TGase。在一些实施方案中,所述工程化的 TGase包含的氨基酸序列与野生型TGase,例如包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的野生型TGase,具有至少约80%(例如至少约85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任何一种)同一性。在一些实施方案中,TGase具有至少约90%(例如至少约90%、91%、 92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的纯度。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间结合$K_D$的约10-约2000倍(例如,约10- 约50倍或约50-约500倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物不结合或不能被检测(例如,通过SPR)到结合IL-2Rα亚基。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG 偶联物与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间结合$K_D$的约1-约30倍(例如,约1-约10倍、约10-约8倍或约11倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T细胞($T_c$,细胞毒性T淋巴细胞,或CTL),辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,激活Treg细胞的能力降低了约2至约5000倍(例如,约2至约50倍)。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物具有类似于(例如等于)或降低了约1至约50倍的激活CTL或 NK细胞的能力。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2 阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物优先激活IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物在CTL和/或NK细胞上具有与Treg细胞相似或优先的激

活,例如与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,具有相似(例如相等)或约1至约20倍(例如约1至约10倍)更高的能力来增加CTL对Treg 的比率或NK细胞对Treg的比率。

[0123] 含有谷氨酰胺(Q)残基的修饰IL-2蛋白

[0124] 在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白降低了与IL-2Rα亚基单元的结合亲和力,同时保留或略微影响了与IL-2Rβ亚基单元的结合亲和力。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白优先激活IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。修饰的IL-2 蛋白可直接使用,或与另一部分(例如PEG)偶联以生成修饰的IL-2蛋白偶联物,例如本文所述的任意一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物。本节中对修饰的IL-2蛋白的描述也适用于整个申请中包含在PEG修饰的IL-2蛋白中的修饰的IL-2蛋白。

[0125] 因此,在一些实施方案中,提供了包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白。在一些实施方案中,所述工程化的Q残基位于IL-2受体α(IL-2Rα)亚基结合域内。在一些实施方案中,工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合结构域之外约1至约3个氨基酸残基(例如1、 2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含一个工程化的Q残基。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含两个或多个(例如两个)工程化的Q残基。在一些实施方案中,所述工程化的Q残基是(例如,来自)相对于亲本IL-2 蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)的单个氨基酸突变(例如,插入、取代)的结果。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白是Aldesleukin,包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,单个氨基酸突变(例如,替换)选自下组:F43Q、R37Q、F41Q、K42Q、Y44Q、T36Q、M38Q或其任意组合,其中氨基酸位置相对于含有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:2和4-8所示的任意氨基酸序列。在一些实施方案中,工程化的Q残基是适合谷氨酰胺转胺酶(TGase)反应的外源补丁序列的一部分。在一些实施方案中,外源补丁序列取代一部分亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白是Aldesleukin,包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,外源补丁序列选自下组:LEEQAA(SEQ ID NO:9)、IFKQTY(SEQ ID NO: 10)、PKEQKY(SEQ ID NO:11)、VIQGV(SEQ ID NO:12)、REEQFN(SEQ ID NO:13)、GLLQGA(SEQ ID NO:14),或其任意组合。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:3和15-19任一所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白进一步包含一个或多个非工程化的Q残基的额外氨基酸突变。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)具有至少约95%(例如至少约96%、97%、98%、99%或100%中的任何一种)同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基的结合降低了约2至约800倍(例如,约2至约10倍、约 5至约50倍、约2至约50倍、约400至约500倍或约476倍)。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2 阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间结合$K_D$的约2-约800倍(例如,约2-约10倍、约5-约50 倍、约10-约50倍、约2-约50倍、约400-约500倍或约476倍)。在一些实施例中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白

介素)相比,修饰的IL-2蛋白与IL-2 Rβ亚基的具有相似(例如相等)或降低约1至约30倍(例如,约1至约1.1倍,约1、2、3、 4、5、6、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、 26、27、28、29或30倍,约1至约10倍,约10至约20倍,或约16倍)的结合。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$,与,亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$,相似(例如相等),或为约1至约30倍(例如等于,约1至约1.1倍,或约1、2、3、4、5、6、8、9、10、11、 12、13、14、15、16、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30倍,约 1至约10倍,约10至约20倍,或约16倍)。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基之间的结合$K_D$约为50nM至约100μM(例如,约50nM至约600nM、约50nM至约 1μM、约1μM至约100μM、约1μM至约30μM或约17μM)。在一些实施例中,修饰的 IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$约为400nm-50μm(例如,约400nm-3000nm,约 1μm-50μm,约1μm-10μm,或约8.39μm)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白能够激活免疫细胞:例如杀伤T细胞($T_c$,细胞毒性T淋巴细胞,或CTL),辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞或自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,激活Treg细胞的能力降低约2至约50倍(例如,约2至约10倍)。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的 IL-2蛋白具有相似或约1至约5倍(例如相等,约1至约1.1倍,或约1、2、3、4或5倍中任一种)降低的激活CTL的能力。

[0126] 亲本IL-2蛋白

[0127] 白细胞介素-2(IL-2)是一种约15～16kDa的细胞因子信号分子。它在体内以不同的糖基化形式存在。IL-2调节免疫系统的白血细胞(白细胞,通常是淋巴细胞)的活性。其参与机体对微生物感染的自然反应和对“自我”与“非自我”的区分。它通过与淋巴细胞上表达的 IL-2受体(IL-2R)结合介导其作用。IL-2对于抗原选择的T细胞克隆在免疫应答期间的快速扩增、分化和存活,以及B细胞、自然杀伤(NK)细胞和调节性T细胞($T_{reg}$)的正常功能至关重要。

[0128] IL-2R是由IL-2Rα(p55,CD25)、IL-2Rβ(p75,CD122)和$\gamma_c$(通用γ链,IL-2Rγ,p65, CD132)三链组成的异三聚体复合物。γ链是所有细胞因子家族成员共有的,包括IL-2、 IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21。三种IL-2R亚基在不同的细胞类型上分别表达。由于IL-2R亚基组合的不同,可以产生低、中、高亲和力的IL-2受体。IL-2Rα链以低亲和力结合IL-2($K_d$～$10^{-8}$M),IL-2Rα亚基因此也被称为“低亲和力”IL-2受体。IL-2与只表达 IL-2Rα亚基的细胞结合不会导致任何可检测的生物学反应。β和γ链共同形成一种以中间亲和力结合IL-2($K_d$～$10^{-9}$M)的复合物,主要位于记忆性T细胞和NK细胞上。这三条受体链均形成一种以高亲和力(Kd～$10^{-11}$M,或～10pM)结合活化T细胞和调节性T细胞 ($T_{reg}$)IL-2的复合物。如此高的亲和力结合是由于快速的结合速率($k_{on}$≈$10^7M^{-1}\cdot s^{-1}$)但相对较慢的解离速率($k_{off}$≈$10^{-4}s^{-1}$)(DJ Stauber等人.,美国科学院院报.103(8):2788-2793. Epub 2006年2月13日)。大多数细胞(如静息T细胞)只表达IL-2Rβ和IL-2Rγ,对IL-2 的亲和力较低,因此对IL-2没有反应。在刺激时,静息T细胞表达相对高亲和力的IL-2Rα。 IL-2与IL-2受体α结合,使该受体依次与IL-2β和IL-2γ结合,导致T细胞活化。中间(βγ) 和高亲和力(αβγ)受体形式是功能性的,在IL-2结合时引起细胞的变化。IL-2Rα链不参与信号转导。β链与Janus激酶1(JAK1)复合。γ链与JAK3复合。当IL-2与IL-2R结合时, JAK1和JAK3被激活,并能在分子

中添加磷酸基团,从而激活三条细胞内信号通路:MAP 激酶通路、磷酸肌醇3-激酶(PI3K)通路和JAK-STAT通路。

[0129] 本文描述的“IL-2蛋白”或“IL-2”是指具有IL-2生物活性的IL-2全长蛋白、其片段或其变体,例如诱导效应T细胞(CTL)扩增。术语“片段”是指具有IL-2蛋白的一部分或片段的氨基酸序列,并具有IL-2生物活性的任意蛋白或多肽。片段包括通过IL-2蛋白的蛋白水解降解产生的蛋白或多肽,以及通过本领域常规方法化学合成产生的蛋白或多肽。

[0130] 本文所描述的“亲本IL-2蛋白”或“亲本IL-2”,是指对修饰的IL-2蛋白进行工程/修饰的IL-2蛋白参考序列。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白是野生型IL-2蛋白。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白来源于哺乳动物,包括但不限于人、牛、马、猫、犬、啮齿动物、兔或灵长类。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白是人IL-2蛋白。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白是野生型IL-2蛋白,例如野生型人IL-2蛋白。在一些实施方案中,亲本IL-2 蛋白是前体IL-2形式。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白是成熟的IL-2形式。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白是人前体IL-2(SEQ ID NO:23)。在一些实施方案中,亲本IL-2 蛋白可在Genbank中找到,登录号为NP 000577.2。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白是人成熟IL-2。在一些实施方案中,所述亲本IL-2蛋白包含SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白是Aldesleukin(例如,Proleukin®;SEQ ID NO:1;参见,例如,https://www.drugbank.ca/drugs/db00041)。阿地白介素(desalanyl-1,丝氨酸-125 人白细胞介素-2)是美国FDA批准的抗肿瘤(抗癌)生物应答调节剂。它的分子量约为15300 道尔顿,同义词为人重组白细胞介素-2,白细胞介素-2阿地白介素,125-L-丝氨酸-2-133- 白细胞介素2(人还原),或白细胞介素-2(2-133),125-丝氨酸。以下简称“IL-2阿地白介素”。Aldesleukin是一种重组IL-2,它与天然IL-2的不同之处在于:a)Aldesleukin没有糖基化,因为它由大肠杆菌产生;b)Aldesleukin没有N端丙氨酸(A);c)Aldesleukin在125位(C125S) 有半胱氨酸到丝氨酸的替换;d)阿地白介素的聚集状态很可能与天然IL-2不同。因此,在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白在IL-2成熟形式的125位包含半胱氨酸到丝氨酸(C125S) 的替换。在一些实施方案中,未糖基化的亲本人IL-2具有约15.3kDa的分子量。图1示出了示例性IL-2蛋白(Aldesleukin,SEQ ID NO:1)的序列和结构。在一些实施方案中,所述亲本IL-2蛋白包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,IL-2蛋白是与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列基本同源的蛋白或多肽,例如与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列具有至少约85%的同一性(例如至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、 96%、97%、98%、99%或100%中的任何一种)。

[0131] 所述亲本IL-2蛋白还可以是包含1-6个额外糖基化位点的类似物,所述类似物在所述蛋白的羧基末端具有至少一个额外氨基酸(所述额外氨基酸包括至少一个糖基化位点),以及所述类似物的氨基酸序列具有包含至少一个糖基化位点。亲本IL-2蛋白可以是天然的,也可以是重组产生的。在一些实施方案中,亲本和/或修饰的IL-2蛋白被糖基化。在一些实施方案中,亲本和/或修饰的IL-2蛋白是非糖基化的。在一些实施方案中,亲本和 /或修饰的IL-2蛋白含有其他翻译后修饰。

[0132] 在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白是突变型IL-2,例如包括插入、缺失、点突变和/或重排中的一种或多种的IL-2蛋白,其中突变不是工程化的Q残基。本文所述的突变IL-2或修饰的IL-2蛋白可包含在一个或多个结构域或基序中的突变(例如,非天然发生的突

变),所述结构域或基序选自下组:IL-2Rα结合域、IL-2Rβ结合域、$\gamma_c$结合域、这些结合域之间的氨基酸、α螺旋区、无规卷曲区、延伸链区,或其组合,其中突变不是工程化的Q残基(例如,参见图1)。亲本IL-2蛋白可以是至少保持一定程度IL-2活性的截断版本、杂合变体、肽模拟物、生物活性片段、缺失变体、取代变体或添加变体。

[0133] 亲本IL-2蛋白可以来源于人源、动物源和植物源。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白或修饰的IL-2蛋白可以从重组方法中衍生。参见,例如,美国专利No.5,614,185,此处提供的公开和实验。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白是重组IL-2,具有与通过重组 DNA技术制备的天然IL-2相当的生物活性,所述重组DNA技术如Taniguchiet al.,Nature, 302:305-310(1983)和Devos,Nucleic Acids Research,11:4307-4323(1983)所述。通常,修饰IL-2蛋白的编码基因是通过PCR介导的诱变或常规的分子克隆方法构建的,或体外合成,并插入待克隆的克隆载体中,然后插入表达载体中,用于转化宿主生物,如微生物,例如,大肠杆菌或者哺乳动物细胞,如CHO细胞。宿主生物在表达条件下表达外源基因以产生修饰的IL-2蛋白。

[0134] 氨基酸序列的实质同一性是指序列通过一个或多个氨基酸的改变(添加、替换)而相同或不同,这些改变不会导致合成蛋白与天然人IL-2之间的不利功能差异。

[0135] 在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白与活性部分偶联。在一些实施方案中,所述活性部分是非IL-2肽或多肽。在一些实施方案中,所述活性部分是生物相容性聚合物。在一些实施方案中,所述活性部分是细胞毒剂、免疫抑制剂或成像剂(例如,荧光团)。在一些实施方案中,所述细胞毒剂是化疗剂。在一些实施方案中,所述活性部分选自:改善修饰IL-2蛋白药代动力学性质的部分、治疗部分和诊断部分中的任何一个。在一些实施方案中,所述活性部分是小分子。细胞毒剂的实例包括但不限于蒽环素(anthracycline)、奥瑞斯汀(auristatin)、多拉司他汀(dolastatin)、CC-1065、多卡霉素(duocarmycin)、烯二炔(enediyne)、格尔德霉素(geldanamycin)、美坦辛(maytansine)、嘌呤霉素(puromycin)、紫杉烷(taxane)、长春花生物碱(vinca alkaloid)、SN-38、微管菌素(tubulysin)、半星素(hemiasterlin) 及其立体异构体、异构体、类似物或其衍生物。免疫抑制剂的实例包括但不限于更昔洛维 (gancyclovier)、依那西普(etanercept)、他克莫司(tacrolimus)、西罗莫司(sirolimus)、伏环孢素(voclosporin)、环孢素(cyclosporine)、雷帕霉素(rapamycin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、硫唑嘌呤(azathioprine)、霉酚酸酯(mycophenolgate mofetil)、甲氨蝶呤(methotrextrate)和糖皮质激素(glucocorticoid)及其类似物。在一些实施例中,所述活性部分是成像剂(例如,荧光团),例如荧光素、罗丹明(rhodamine)、镧系荧光粉及其衍生物。荧光团的实例包括但不限于异硫氰酸荧光素(FITC)(例如5-FITC)、酰胺荧光素(FAM)(例如5-FAM)、曙红 (eosin)、羧基荧光素(carboxyfluorescein)、红肌苷(erythrosine)、Alexa Fluor®(例如Alexa 350、405、430、488、500、514、532、546、555、568、594、610、633、647、660、680、700 或750)、羧四甲基罗丹明(TAMRA)(例如5,-TAMRA)、四甲基罗丹明(TMR)和磺酰罗丹明 (SR)(例如SR101)。在一些实施方案中,所述活性部分包括诸如放射性同位素的标记。放射性同位素或其它标记的实例包括但不限于3H、14C、15N、35S、18F、32P、33P、64Cu、 68Ga、89Zr、90Y、99Tc、123I、124I、125I、131I、111In、131In、153Sm、186Re、188Re、 211At、212Bi和153Pb。

[0136] 工程化的Q残基

[0137] 在一些实施方案中,工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合域内。在一些实施方案中,工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合结构域之外约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3 个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含一个工程化的Q残基。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含两个或多个(例如两个)工程化的Q 残基。

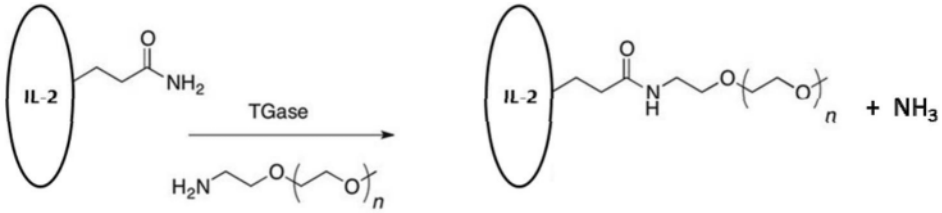
[0138] 编码包含本文描述的工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白的DNA序列可以使用PCR辅助诱变技术、常规的分子克隆技术如消化和连接或通过化学合成来构建。

[0139] 在一些实施方案中,所述工程化的Q残基是(例如,来自)相对于亲本IL-2蛋白,例如含有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的IL-2阿地白介素的单个氨基酸突变(插入或取代)的结果。在一些实施方案中,所述工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合域内,参见图1中下划线的部分。在一些实施方案中,单个氨基酸突变为(例如,来自)单个氨基酸取代Q。 IL-2Rα亚基结合域内的任何氨基酸残基都可以被突变(取代)为Q残基。在一些实施方案中,所述单个氨基酸突变是Q残基的插入。在IL-2Rα亚基结合域内的任何位置都可以插入一个Q残基。例如,图1中的IL-2,Q残基可以在下划线的区域边界内的任何位置插入。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白仅包含一个单一氨基酸突变(插入或取代)。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包括两个或更多个(例如两个)单个氨基酸突变 (插入、替换或其组合)。例如,在一些实施例中,两个或更多个Q残基插入IL-2Rα亚基结合结构域内。在一些实施方案中,IL-2Rα亚基结合结构域(包括结构域边界)内的两个或多个氨基酸残基被取代为Q残基。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包括在IL-2Rα亚基结合结构域内插入的一个或多个Q残基,以及在IL-2Rα亚基结合结构域(包括结构域边界)内的一个或多个原始氨基酸残基被取代为Q残基。在一些实施方案中,所述工程化的Q残基(单个氨基酸插入或取代)靠近IL-2Rα亚基结合结构域,例如在IL-2Rα亚基结合结构域之外的约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。例如,在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包括在IL-2Rα亚基结合结构域内(包括结构域边界上的取代)的一个或多个工程化的Q残基(插入或取代),以及在IL-2Rα亚基结合结构域外的N-末端或C-末端上的约1至约3个氨基酸残基(例如,1、2或3个氨基酸残基中的任一个)之间的一个或多个工程化的Q残基(插入或取代)。在一些实施例中,两个或更多个工程化的Q残基(插入或取代)是连续的。在一些实施方案中,两个或多个工程化的Q残基(插入或取代)不是连续的,例如被IL-2蛋白的一个或多个原始氨基酸残基穿插。

[0140] 在一些实施方案中,单个氨基酸突变含有工程残基是选自下组:F43Q、R37Q、F41Q、K42Q、Y44Q、T36Q、M38Q或其任意组合,其中氨基酸位置相对于包含SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列,例如IL-2 Aldesleukin,的亲本IL-2蛋白。因此,在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含F43Q的单个氨基酸突变(取代)。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2 蛋白包含R37Q的单个氨基酸突变(取代)。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含 SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含F41Q 的单个氨基酸突变(取代)。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含K42Q的单个氨基酸突变(取代)。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含Y44Q的单个氨基酸突变(取代)。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包

含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包括R37Q的第一单氨基酸突变(取代)和Y44Q的第二单氨基酸突变(取代)。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

[0141] 在一些实施方案中,工程化的Q残基是适合谷氨酰胺转胺酶(TGase)反应的外源补丁序列的一部分。为了本申请的目的,当修饰的IL-2蛋白包含作为外源补丁序列一部分的工程化的Q残基时,修饰的IL-2蛋白包括外源补丁序列,并且工程化的Q残基是补丁序列内的氨基酸残基之一。本文所用的"适用于TGase反应"是指通过引入包含工程化的Q 残基的外源补丁序列,TGase能够催化,例如,蛋白/肽(如IL-2)结合的Q残基侧链的γ- 羧酰胺基团(-(C=O)$NH_2$)和伯胺(R-$NH_2$如含有伯胺的PEG分子)之间形成异肽键,随后释放氨($NH_3$)。参见示例化学式I。

[0142] 


**化学式 I**

[0143] 在一些实施方案中,包含工程化的Q残基的外源补丁序列取代一部分亲本IL-2蛋白序列,例如野生型IL-2,或包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的IL-2 Aldesleukin。在一些实施方案中,将包含工程化的Q残基的外源补丁序列插入到亲本IL-2蛋白序列(例如 SEQ ID NO:1的IL-2 Aldesleukin)。在一些实施方案中,包括工程化的Q残基的外源补丁序列通过插入或替换IL-2Rα亚基结合域序列的部分完全引入IL-2Rα亚基结合域内。在一些实施方案中,在引入IL-2蛋白(插入或替换)后,包含工程化的Q残基的外源补丁序列包含IL-2Rα亚基结合域之外的氨基酸残基(例如约1、2、3、4或5个氨基酸残基)。例如,在一些实施方案中,6个氨基酸长的外源补丁序列(例如,XXXXQX(SEQ ID NO:25),或 QXXXXX(SEQ ID NO:26),X可以是任意氨基酸残基)代替SEQ ID NO:1(参见图1)所示 hIL-2中的"NYKNPK"序列(SEQ ID NO:27),外源补丁序列N端的3个氨基酸(如 XXX(SEQ ID NO:28)或QXX(SEQ ID NO:29))将在IL-2Rα亚基结合域之外。在一些实施方案中,在将包含工程化Q残基(插入或替换)的外源补丁序列引入IL-2蛋白后,工程化Q残基位于IL-2Rα亚基结合域内(包括结构域边界,如上述实例的XXXXQX(SEQ ID NO:25))。在一些实施方案中,在将包含工程化Q残基(插入或替换)的外源补丁序列引入 IL-2蛋白后,工程化Q残基位于IL-2Rα亚基结合域之外(例如上述实例的QXXXXX(SEQ ID NO:26))的约1至约3个氨基酸(例如约1、2或3个氨基酸)之间。在一些实施方案中,外源补丁序列包括两个或更多个(例如两个)工程化的Q残基(例如,QXXXQX(SEQ ID NO:30),X可以是任意氨基酸残基),将外源补丁序列引入IL-2蛋白(插入或置换)后,一个或多个工程化的Q残基可以在IL-2Rα亚基结合域内(包括结构域边界),一个或多个工程化的Q残基可以在IL-2Rα亚基结合域外约1-约3个氨基酸之间(如约1、2或3个氨基酸)。在一些实施方案中,外源补丁序列被引入IL-2Rα亚基结合域之外(插入或替换,没有重叠),但其包含的工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合域之外约1至约3个氨基酸之间(例如约1、2或3个氨基酸)。

[0144] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括一个工程化的Q残基,其为一个外源补丁

序列的部分。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括两个或多个(例如两个)工程化的Q残基,其为一个外源补丁序列的部分。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括两个或更多(例如两个)工程化的Q残基,每个残基是不同外源补丁序列的部分。在一些实施方案中,一个外源补丁序列内的两个或多个(例如两个)工程化的Q残基是连续的。在一些实施方案中,一个外源补丁序列中的两个或多个(例如两个)工程化的Q残基被其他氨基酸残基穿插。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括两个或多个(例如两个)外源补丁序列,每个序列包括工程化的Q残基。在一些实施例中,两个或更多个(例如两个)外源补丁序列是连续的(紧挨着彼此)。在一些实施方案中,两个或多个(例如两个)外源补丁序列被其他氨基酸残基穿插。

[0145] 外源补丁序列可以具有约3到约10个氨基酸之间的任何长度(例如约3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸长的任何长度)。在一些实施方案中,包含工程化的Q残基的外源补丁序列具有约3至约9个氨基酸、约3至约8个氨基酸、约3至约7个氨基酸、约3至约 6个氨基酸、约3至约5个氨基酸、约4至约9个氨基酸、约5至约8个氨基酸、约5至约7个氨基酸或约6个氨基酸的长度。

[0146] 外源补丁序列可以沿着外源补丁序列的整个长度包括一个或多个工程化的Q残基(例如1、2或3个工程化的Q残基)。在一些实施方案中,外源补丁序列包括1或2个工程化的Q残基。所述工程化的Q残基可以位于外源补丁序列的任何位置,例如N'末端、C' 末端和/或两者之间的任何位置。在一些实施方案中,外源补丁序列与除去工程化的Q残基(取代Q或插入Q)的亲本IL-2的相应替换部分相同。在一些实施方案中,外源补丁序列包括除了工程化的Q残基之外的其他突变(例如,插入、缺失或替换)。

[0147] 在一些实施例中,外源补丁序列选自下组:LEEQAA(SEQ ID NO:9)、IFKQTY(SEQ ID NO:10)、PKEQKY(SEQ ID NO:11)、VIQGV(SEQ ID NO:12)、REEQFN(SEQ ID NO:13)、GLLQGA(SEQ ID NO:14),或其任意组合。在一些实施方案中,外源补丁序列是LEEQAA(SEQ ID NO:9)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:15所述的氨基酸序列。在一些实施方案中,外源补丁序列是IFKQTY(SEQ ID NO:10)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:3所述的氨基酸序列。在一些实施例中,外源补丁序列是PKEQKY。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:16所述的氨基酸序列。在一些实施方案中,外源补丁序列是VIQGV(SEQ ID NO:12)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:17所述的氨基酸序列。在一些实施方案中,外源补丁序列是REEQFN(SEQ ID NO:13)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:18所述的氨基酸序列。在一些实施方案中,外源补丁序列是GLLQGA (SEQ ID NO:14)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NO:19所述的氨基酸序列。

[0148] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括作为单个氨基酸突变(插入或取代)的一个或多个工程化的Q残基,以及作为外源补丁序列一部分的一个或多个工程化的Q残基。

[0149] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白仅包含本文所述的工程化的Q残基突变,与亲本IL-2(例如,野生型IL-2或IL-2 Aldesleukin)相比没有任何其他突变。在一些实施方案中,本文描述的修饰IL-2蛋白可进一步包含一个或多个额外的氨基酸突变(例如,非自然发生的突变,例如插入、缺失、点突变和/或重排),它们不是工程设计的Q残基。额外的一个或多个突变所在的结构域或基序可以选自下组:IL-2Rα结合域、IL-2Rβ结合域、$\gamma_c$结合域、这

些结合域之间的氨基酸、α螺旋区、无规卷曲区、延伸链区,或其任意组合。在一些实施方案中,额外的一个或多个突变不影响工程化的Q残基上的TGase反应。

[0150] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括的氨基酸序列与亲本IL-2蛋白,例如野生型IL-2、或SEQ ID NO:1所示的IL-2 Aldesleukin,具有至少约85%(例如至少约86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任何一种)同一性。

[0151] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白可进一步修饰以包括官能团的连接(而不是通过添加含官能团的氨基酸残基)。例如,在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白可以进一步修饰以包括巯基。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白可以进一步修饰以包括N-末端α碳。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白可以进一步修饰以包括一个或多个碳水化合物部分。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白可以进一步修饰以包括醛基。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白可以进一步修饰以包括酮基。

[0152] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白将呈“单体”形式,其中相应肽的单个表达被组织成离散单元。在其他情况下,修饰的IL-2蛋白将以“二聚体”(例如,重组IL-2的二聚体)的形式存在,其中蛋白的两种单体形式相互结合(例如,通过二硫键)。例如,在重组人IL-2的二聚体的情况下,该二聚体可以是通过由每个单体的Cys125残基形成的二硫键而彼此相缔合的两个单体的形式。

[0153] 含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白与IL-2R亚基的结合亲和力

[0154] 结合亲和力可用$K_D$、$K_{off}$、$K_{on}$或$K_a$表示。如本文所用,术语“$k_{off}$”或“$K_{off}$”,指分子(例如,IL-2)从分子/结合配体复合物(例如,IL-2/IL-2R复合物,或IL-2/IL-2R亚基复合物)解离的离解速率常数,由动力学选择设置确定。如本文所用,术语“$K_{on}$”或“$k_{on}$”旨在指分子(例如IL-2)与其结合配偶体(例如IL-2R或其亚基)结合以形成分子/结合配偶体复合物(例如,IL-2/IL-2R复合物,或IL-2/IL-2R亚基复合物)的结合速率常数。如本文所用,术语平衡解离常数“$K_D$”或“$K_d$”是指特定分子/结合配偶体相互作用(例如,IL-2/IL-2R相互作用,或IL-2/IL-2R亚基相互作用)的解离平衡,并且描述了在平衡时占据结合配偶体(例如 IL-2R或其亚基)溶液中存在的所有结合域的一半所需的分子(例如IL-2)浓度,并且等于 $K_{off}/K_{on}$。$K_D$的测量假定所有结合剂都在溶液中。在结合配体(例如,IL-2R)被连接至细胞壁的情况下,例如在酵母表达系统中,相应的平衡速率常数表示为EC50,这给出了$K_D$的良好近似值。亲和常数$K_a$是解离常数$K_D$的倒数。本领域已知的任何合适的配体结合测定或抗体/抗原结合测定可用于测量结合亲和力,例如,RIA、SPR、Biacore测定、Octet 分析,等等。还可以参见实施例7。

[0155] 解离常数($K_D$)用作显示分子(例如,IL-2)与其结合配体(例如,IL-2R或其亚基)的亲和力的指标。例如,通过使用标记有各种标记试剂的IL-2或IL-2R(或其亚基),以及通过使用BiacoreX(由Amersham Biosciences制造),一种非处方药、测量试剂盒或类似试剂盒,根据试剂盒随附的用户手册和实验操作方法,可以容易地进行分析。可以使用这些方法得出的$K_D$值以M(摩尔)为单位表示。特异性结合IL-2R(或其亚基)的IL-2可具有解离常数($K_D$),例如$\leq 10^{-5}$M(10μM),$\leq 10^{-6}$M(1μM),$\leq 10^{-7}$M(100nM),$\leq 10^{-8}$M(10nM),$\leq 10^{-9}$M(1nM),$\leq 10^{-10}$M(100pM),或$\leq 10^{-11}$M(10pM)。

[0156] 分子(例如,IL-2)与其结合伙伴(例如,IL-2R或其亚基)的结合亲和力可以通过本

领域已知的方法进行实验测定。这些方法包括但不限于Western印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-、EIA-、Biacore-测定、表面等离子共振(SPR)、Octet和肽扫描。还可以参见实施例1中使用SPR(Biacore T-200)的示例性结合亲和力测量方法。简单地说,用EDC/NHS 化学方法将抗人抗体偶联到CM-5传感器芯片的表面。然后将人IL-2Rα-Fc或IL-2Rβ-Fc 融合蛋白作为该表面的捕获配体。修饰的IL-2蛋白(或亲本IL-2作为对照)的系列稀释液被允许与配体结合,结合的响应单位(RU)与IL-2浓度作图,以确定EC50值。每个测试 IL-2蛋白对每个IL-2R亚单位的亲和力计算为相对于亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或 IL-2阿地白介素)的倍数变化。

[0157] 在一些实施例中,$K_D$亲本IL-2(例如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间的结合约为10nM-50nM,例如约10nM-20nM、约20nM-40nM、约10nM-15nM、约 36.1nM、约14.5nM、或约10nM。在一些实施例中,$K_D$用SPR法测定。

[0158] 在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素) 相比,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基的结合亲和力降低,例如降低约2至约800倍(例如约2至约50倍)。因此,在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基之间的结合 $K_D$为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间结合 $K_D$的约2-约800倍(例如约5-6倍、约38-39倍、约2-约50倍、约400-约500倍或约476 倍),例如为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基的结合$K_D$的约2至约50倍,约2至约10倍,约10至约50倍,约20至约45倍,约30 至约40倍,约40至约50倍,约50至约100倍,约100至约500倍,约100至约800 倍,约200至约700倍,约300至约600倍,约400至约500倍,或约450至约500倍。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基的结合$K_D$约为20nM至100μm,例如约 20nM至约1000nM中,约50nM至约100μM,约1μM至约100μM,约1μM至约10μM,约10μM至约100μM,约1μM至约50μM,约10μM至约20μM,约17.2μM,约20nM 至约100nM,约100nM至约1000nM,约200nM至约900nM,约300nM至约800nM,约200nM至约600nM,约400nM至约700nM,约500nM至约1000nM,约500nM至约 600nM,约560nM,或约81nM中的任何一个。在一些实施例中,$K_D$用SPR法测定。

[0159] 在一些实施方案中,与亲本IL-2(例如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的 IL-2蛋白还具有与由所有三个亚基形成的IL-2R复合物(“IL-2Rαβγ复合物”)降低的的结合亲和力。在一些实施方案中,与亲本IL-2(例如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基的结合亲和力降低(例如约2至约800倍降低),和IL-2Rαβγ复合物的结合亲和力降低。

[0160] 在一些实施例中,亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2,或IL-2 Aldesleukin)和IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$约为100nM至约20μM,例如约100nM至约500nM、约400nM至约 20μM、约500nM至约1000nM、约1μM至约20μM、约1μM至约10μM、约100nM至约200nM、约300nM至约500nM、约200nM至约400nM、约536nM、约144nM或约410nM 中的任何一个。

[0161] 在一些实施方案中,与亲本IL-2(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白对IL-2Rβ亚基具有相似(例如相等)或约1至约30倍(例如约1至约10倍、约10至约20倍或约16倍)降低的结合亲和力。因此,在一些实施例中,修饰的IL-2 蛋白与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$与亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)和IL-2Rβ亚基之间结合$K_D$相似(或相等)或约1至约30倍(例如,约1至约10倍,约10至约20倍,

约16倍,约1.4倍,或约6.7倍),例如与亲本IL-2(如野生型IL-2、人 IL-2或IL-2阿地白介素)和IL-2Rβ亚基之间结合$K_D$相同,约1至约1.1倍,约1至约2 倍,约2至约30倍,约2至约10倍,约10至约20倍,约16倍。因此,在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基的结合$K_D$约为100nM至50μM,例如约400nM至约 50μM、约400nM至约3000nM、约1μM至约50μM、约10μM至约50μM、约1μM至约 10μM、约100nM至约800nM、约400nM至约1000nM、约1000nM至约3000nM、约2000nM 至约5000nM、约400nM至约3000nM、约8.39μM、约579nM或约2751nM。

[0162] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基的结合亲和力降低(例如,降低约2至约800倍或约2至约50倍),但与亲本IL-2(例如,野生型IL-2或IL-2阿地白介素) 相比,与IL-2Rβ亚基的结合亲和力相似(例如,相等)或降低约1至约30倍(例如,约1 至约10倍)。因此,在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基之间的结合$K_D$约为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)和IL-2Rα亚基之间结合$K_D$的约2-约800倍(例如,约2-约50倍、约400-约500倍、或约476倍、约5-约6倍、或约38-约39倍),修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$类似于(例如等于)亲本IL-2 蛋白(如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$的约1至约30倍(例如等于,约1至约1.1倍,约1至约2倍,约2至约10倍,约2至约30倍,约10至约 20倍,或约16倍)。

[0163] 含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白的生物活性

[0164] 静息T细胞和NK细胞仅表达IL-2Rβ和IL-2Rγ。活化的T细胞和Treg细胞表达 IL-2Rα、IL-2Rβ、IL-2Rγ,与IL-2有较高的亲和力。中间(βγ)和高亲和力(αβγ)受体形式是功能性的,在IL-2结合时引起细胞的变化。β链与Janus激酶1(JAK1)复合。γ链与JAK3 复合。当IL-2与IL-2R结合时,JAK1和JAK3被激活,并能在分子中添加磷酸基团,从而激活三条细胞内信号通路:MAP激酶通路、磷酸肌醇3-激酶(PI3K)通路和JAK-STAT 通路。

[0165] 本发明描述了测定体外IL-2活性的各种方法。一个示例性方法是下面描述的CTTL-2 细胞增殖测定(也见实施例3)。CTLL-2是细胞表面高表达IL-2Rα的C57BL/6小鼠细胞毒 T淋巴细胞系。简而言之,培养CTTL-2细胞,然后与本文描述的不同浓度的修饰IL-2蛋白或修饰IL-2蛋白-PEG偶联物孵育。亲本IL-2(如野生型IL-2,或IL-2阿地白介素) 作为对照。在充分(例如44小时)孵育后,将重天青(Resazurin)加入每个反应孔中并进行孵育。然后以每秒/孔的积分时间记录发光。通过对剂量-反应曲线的非线性回归分析,可以得到细胞增殖的EC50值(显示50%最大反应所需的测试化合物浓度)。另一个示例性方法在Moreauet al.,(1995)Mol.Immunol.32:1047-1056中描述。简而言之,在非特异性结合试验中,本文所述的修饰IL-2蛋白或修饰IL-2蛋白-PEG偶联物在含有IL-2受体的细胞系(例如CTTL-2)存在下,4℃预孵育1小时。此后,$^{125}$I标记的IL-2在体系中,4℃下孵育3小时。数据以假定的IL-2部分活性相对于亲本IL-2(例如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)的抑制能力%表示。本领域已知的其他方法也可用于评估IL-2功能,包括电测量法、分光光度法、色谱法和辐射测量法。

[0166] STAT5和ERK1/2信号传导也可以测量以反映IL-2生物活性,例如,通过使用本领域已知的任何合适方法磷酸化STAT5和ERK1/2。例如,STAT5和ERK1/2磷酸化可以使用对这些分子的磷酸化版本具有特异性的抗体结合流式细胞术分析来测量。例如,将新鲜分离的PBMC与修饰的IL-2蛋白在37℃下孵育20分钟。孵育后,细胞立即用 Cytofix缓冲液(BD Bioscience)在37℃下固定10分钟保持磷酸化状态,用Phosflow Perm 缓冲液III(BD

Bioscience)在4℃下渗透30min℃。细胞用针对磷酸化STAT5或ERK1/2 的抗体染色,例如Alexa647偶联的抗STAT5 pY694(BD Biosciences,圣荷西,加利福利亚),或Alexa488偶联的抗ERK1/2 pT202/pY204(BD Biosciences),并通过流式细胞术进行分析。或者,IL-2测试样品(例如,本文描述的修饰的IL-2蛋白或修饰的IL-2蛋白-PEG 偶联物)可以给小鼠静脉注射。随后取小鼠脾细胞,立即用BD Phoshoflow™ Lyse/Fix缓冲液固定,冰PBS洗涤2次,用抗CD4和抗CD25抗体(Biolegend)染色,然后在黑暗中,在冰上用BD PhosFlow Perm缓冲液III渗透30min。然后细胞用冰FACS缓冲液洗涤两次,按照制造商的实验方法(eBioscience)用抗FoxP3染色,用冰FACS缓冲液洗涤两次,在室温下黑暗中用抗磷STAT5-PE(1:30)(BD)染色30分钟。用FACS缓冲液洗涤细胞三次,然后在FACS Canto流式细胞仪(BD)上获取数据,并用FlowJo(Tree Star)进行分析。PI 3- 激酶信号也可以使用本领域已知的任何合适的方法测量以反映IL-2生物活性。例如,PI 3- 激酶信号转导可以使用对磷酸-S6核糖体蛋白有特异性的抗体结合流式细胞术分析来测量。

[0167] IL-2的生物活性也可以通过在体内或离体实验来反映,例如,通过在施用或与IL-2 测试样品(例如,本文描述的修饰IL-2蛋白或修饰IL-2蛋白-PEG偶联物)孵育后测量CD8+和/或NK细胞相对于Treg的增殖;或通过在注射IL-2测试样品(例如,本文描述的修饰IL-2蛋白或修饰IL-2蛋白-PEG偶联物)后测量肿瘤异种移植小鼠的肿瘤体积减少。另见实施例4和5。

[0168] 在一些实施方案中,本文描述的修饰IL-2蛋白能够激活免疫细胞。本文所述的"能够激活免疫细胞"是指诱导IL-2依赖性免疫细胞(例如,NK细胞、CD8+T细胞)增殖的能力,和/或激活免疫细胞的能力,如诱导STAT5磷酸化、ERK1/2磷酸化或刺激PI 3-激酶信号转导。在一些实施方案中,免疫细胞选自下组:杀伤T细胞($T_c$,细胞毒性T淋巴细胞,或CTL),辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白在激活Treg方面能力降低(例如约2至约50倍或约2至约 15倍降低的能力)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,激活CTL或NK细胞的能力相似(例如相等)或降低约1 至约5倍。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白具有类似(例如,等于)或约1至约20倍(例如,约1至约 10倍)更高的能力来增加CTL与Treg的比率或NK细胞与Treg的比率。在一些实施例中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2,或IL-2 aldeslekin)相比,修饰的IL-2蛋白在激活Treg 方面能力降低(例如约2至约50倍或约2至约15倍降低的能力),并且与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2,人IL-2,或IL-2 aldeslekin)相比,具有类似(例如,等于)或约1至约20 倍(例如,约1至约10倍)更高的能力来增加CTL与Treg的比率或NK细胞与Treg的比率。在一些实施方案中,与亲本IL-2(例如,野生型IL-2,hIL-2,或IL-2 Aldesleukin)相比,本文描述的修饰IL-2蛋白相对于Treg细胞,诱导CD8+ T细胞和/或NK细胞增殖的能力增强。参见图6B的示例。在一些实施方案中,与亲本IL-2(例如,野生型IL-2,hIL-2,或IL-2 Aldesleukin)相比,本文描述的修饰IL-2蛋白具有增强的诱导Treg分化的能力。

[0169] 在一些实施方案中,通过IL-2依赖性CTLL-2细胞增殖试验测量本文描述的修饰的IL-2蛋白和修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的生物活性。例如参见实施例3。在一些实施方案

中,亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)的EC50为约65.4nM至约 654nM,例如约100nM至约500nM,约200nM至约400nM,或约242nM。在一些实施方案中,修饰IL-2蛋白的EC50为约200nM至约2000nM,例如约200nM至约1000nM,约400nM至约1500nM,约1000nM至约2000nM,约500nM至约900nM,或约889nM。

[0170] 在一些实施方案中,与亲本IL-2(例如野生型IL-2、hIL-2或IL-2 Aldesleukin)相比,本文描述的修饰IL-2蛋白在IL-2Rα+T细胞(例如Treg细胞)中具有降低的刺激STAT5磷酸化的能力(例如能力降低约1至约200倍)。在一些实施方案中,与亲本IL-2(例如野生型IL-2、hIL-2或IL-2 Aldesleukin)相比,本文描述的修饰IL-2蛋白,刺激IL-2Rα+T细胞(例如,Treg细胞)中的PERK1/ERK2信号传导,的能力降低(例如,能力降低约1至约 200倍)。在一些实施方案中,IL-2Rα+T细胞是Treg细胞。

[0171] 修饰IL-2蛋白的药代动力学研究

[0172] 药物动力学(PK)是指药物(如修饰的IL-2蛋白或聚乙二醇修饰的IL-2蛋白)一旦施用于受试者后的吸收、分布、代谢和排泄。可用于确定临床效用的药代动力学参数包括但不限于血清浓度、随时间变化的血清浓度、最大血清浓度($C_{max}$),达到最大浓度的时间($T_{max}$)、消除半衰期($t_{1/2}$),给药间隔内浓度时间曲线下面积($AUC_{\tau}$)等。

[0173] 用于获得药物的PK曲线的技术,如本文所述的修饰的IL-2蛋白或聚乙二醇修饰的IL-2蛋白,或参比药物(例如,IL-2阿地白介素)是本领域已知的。例如,参见Heller et al., Annu Rev Anal Chem,11,2018;和Ghandforoush-Sattari et al.,J Amino Acids, Article ID 346237,2010卷。在一些实施方案中,使用个体的血液、血浆或血清样品以测量其体内的修饰IL-2蛋白或聚乙二醇修饰IL-2蛋白的PK曲线。在一些实施方案中,使用质谱技术如LC-MS/MS或ELISA测量在个体中的修饰IL-2蛋白或修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的 PK曲线。对PK曲线的PK分析可以通过本领域中已知的任何方法进行,比如非房室分析,例如,使用PKSolver V2软件(Zhang Y.et al.,"PKSolver An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamics data analysis in Micro Excel",Comput Methods Programs Biomed.2010;99(3):306-1)。示例性方法也参见实施例6和8。

[0174] "C"表示药物(例如,修饰的IL-2蛋白,或聚乙二醇修饰的IL-2蛋白)在血浆、血清或受试者的任何适当体液或组织中的浓度,并且通常表示为每单位体积的质量,例如纳克每毫升。为方便起见,本文将药物在血清中的浓度称为"血清浓度"。在给药(例如,修饰的IL-2蛋白,或聚乙二醇修饰的IL-2蛋白,如静脉注射或皮下注射给药)后任何时间的血清浓度记为$C_{time}$或$C_T$。给药期间最大血清药物浓度记为$C_{max}$,而$C_{min}$为一个给药间隔结束时的最小血清药物浓度;而$C_{ave}$为给药间隔期间的平均浓度。

[0175] 术语"生物利用度"是指药物(如修饰的IL-2蛋白或聚乙二醇修饰的IL-2蛋白)进入体循环从而到达作用部位的程度——有时是进入体循环到达作用部位的速度。

[0176] "AUC"是血药浓度-时间曲线下的面积,被认为是最可靠的生物利用度的衡量标准,如给药间隔内的浓度-时间曲线下的面积($AUC_{\tau}$)、"总暴露量"或"跨时间的总药物暴露量"($AUC_{0-last}$或$AUC_{0-inf}$),给药后t时间的浓度时间曲线下面积($AUC_{0-T}$)等。

[0177] 血清浓度峰值时间($T_{max}$)是给药(例如,修饰的IL-2蛋白,或聚乙二醇修饰的IL-2蛋白)后达到峰值血清浓度($C_{max}$)的时间。

[0178] 半衰期($t_{1/2}$)是血浆或血清(或其他生物基质)中测得的药物浓度(例如修饰IL-2

蛋白,或聚乙二醇修饰IL-2蛋白)在特定时间点恰好降至其浓度或量的一半所需的时间。静脉注射后,药物在血浆或血清中的浓度因分布和清除而下降。在静脉注射后一段时间的血浆或血清药物浓度曲线中,第一阶段或快速下降被认为主要是由于分布,而下降的后期阶段通常较慢,被认为主要是由于消除,尽管在两个阶段两个过程都有发生。分布假定在足够的时间后完成。通常,消除半衰期由血浆/血清浓度与时间曲线的终末期或消除(显性)相确定。例如,参见,Michael Schrag和Kelly Regal,《临床前药物开发毒理学综合指南》的"第3章-药代动力学和毒代动力学",2013年。

[0179] 在一些实施方案中,本文描述的修饰IL-2蛋白具有约0.1小时至约10小时的半衰期 (例如,消除半衰期或分布半衰期),例如约0.1小时至约1小时、约0.5小时至约5小时、约1小时至约10小时或约3小时至约10小时。在一些实施方案中,本文描述的修饰IL-2 蛋白的半衰期为约7.3小时,或约0.1小时至约0.5小时。在一些实施方案中,本文所述的修饰IL-2蛋白在单次静脉注射中给药(例如,约2mg/kg)。在一些实施方案中,本文描述的亲本IL-2蛋白和/或修饰的IL-2蛋白的循环半衰期约为80分钟。

[0180] 在一些实施方案中,本文所述的修饰IL-2蛋白在单次静脉注射给药时提供了比单次皮下注射给药时更短的$T_{max}$。

[0181] 在一些实施方案中,当单次静脉注射或单次皮下注射(例如,约2mg/kg)给药时,本文描述的修饰IL-2蛋白提供的最大血清浓度($C_{max}$)在约0.05μg/mL至约100μg/mL之间,例如约1μg/mL至约10μg/mL,或约10μg/mL至约100μg/mL。在一些实施方案中,本文所述的修饰IL-2蛋白在单次静脉注射给药时提供了比单次皮下注射给药时更高的$C_{max}$。

[0182] 在一些实施方案中,在单次静脉注射给药时(例如,以约2mg/kg),本文所述的修饰IL-2蛋白提供的$AUC_{0-last}$或$AUC_{0-inf}$在约0.5小时·μg/mL至约20小时·μg/mL之间,例如约0.5小时·μg/mL至约5小时·μg/mL,约1小时·μg/mL至约10小时·μg/mL,或约5 小时·μg/mL至约20小时·μg/mL之间。在一些实施例中,本文所述的修饰IL-2蛋白的 $AUC_{0-last}$或$AUC_{0-inf}$约为5.3hr·μg/mL。在一些实施方案中,本文描述的修饰IL-2蛋白在单次静脉注射中给药时提供了比单次皮下注射时更大的总暴露量($AUC_{0-last}$)。

[0183] 偶联有聚乙二醇(PEG)的修饰IL-2蛋白

[0184] 在一些实施方案中,本文描述的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG部分偶联(也称为"修饰IL-2蛋白-PEG偶联物")。上述修饰IL-2蛋白的描述也适用于本文描述的PEG修饰的IL-2蛋白中包含的修饰IL-2蛋白。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物降低了与IL-2 Rα亚基单元的结合亲和力,同时保留或略微影响了与IL-2Rβ亚基单元的结合亲和力。

[0185] 在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物优先激活IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。

[0186] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白的所有工程化的Q残基均与一个PEG部分偶联。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括两个或多个(例如,2个)工程化的Q残基,但并非所有工程化的Q残基每一个都与一个PEG部分结合。在一些实施方案中,至少约50%(例如至少约60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任何一个)的工程化的Q残基分别与一个PEG部分偶联。在一些实施方案中,PEG部分与PEG修饰的IL-2 上的工程化Q残基的摩尔比为约1:1、约1:2、约1:3、约1:4、约1:6、约1:6、约1:7、约1:8、约1:9或约1:10。在

一些实施方案中,聚乙二醇化(即PEG部分与修饰的IL-2 蛋白结合)仅发生在PEG部分与工程化的Q残基之间。在一些实施方案中,聚乙二醇化还发生在修饰的IL-2蛋白的内源性Q残基上。在一些优选实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG 偶联物包括仅通过工程化的Q残基,而不是通过修饰IL-2蛋白的内源性Q残基,偶联到修饰的IL-2蛋白的PEG部分。

[0187] 聚乙二醇(PEG)部分

[0188] PEG是一种非抗原性的惰性聚合物,能显著延长蛋白在体内循环的时间。这使得蛋白在更长的时间内有效。用PEG共价修饰蛋白已被证明是延长蛋白在体内的循环半衰期的有用方法(Abuchowski et al.,1984;Hershfield,1987;Meyers et al.,1991)。聚乙二醇与蛋白的共价结合增加了蛋白的有效大小,并降低了其从体内的清除率。PEG有多种尺寸可供商购,通过使用不同尺寸的PEG,可以针对个体适应症定制PEG修饰蛋白的循环半衰期。PEG修饰的其他好处包括增加蛋白溶解度、增加体内蛋白稳定性和降低蛋白免疫原性(Katre et al.,1987,Katre,1990)。

[0189] 本文所述PEG包括任何非肽水溶性聚(环氧乙烷)。典型地,根据本发明使用的PEG包括以下结构"-$(OCH_2CH_2)_n$-",其中(n)为2到4000。如本文所用,PEG还包括"-$CH_2CH_2$-O$(CH_2CH_2O)_n$-$CH_2CH_2$-"和"-$(OCH_2CH_2)_n$O-",取决于末端氧是否被替换,在例如合成转化过程中。

[0190] 在不希望被任何理论或作用机制束缚的情况下,长链状聚乙二醇聚合物被认为在水性介质中高度水合,并快速运动。这种快速运动被认为导致PEG扫出一个大体积,并阻止其他分子的接近和干扰。因此,当连接到另一个化学实体(如多肽)时,PEG聚合物链可以保护这些化学实体免受免疫反应和其他清除机制的影响。因此,聚乙二醇化(即共价加入聚乙二醇)可以通过优化药代动力学、提高生物利用度、降低免疫原性和给药频率来提高药物的有效性和安全性。"聚乙二醇化"在通常意义上是指PEG分子与另一化合物(例如,修饰的IL-2蛋白)的偶联(即化学键合)。例如,PEG的附着已经被证明可以保护蛋白免受蛋白水解。参见Blomhoff,H.K.等人,1983年,生物化学生物物理学报,757:202-208。除非另有明确说明,术语"PEG"、"聚乙二醇聚合物"等是指聚乙二醇聚合物及其衍生物,包括甲氧基-PEG(mPEG)。

[0191] 通常,PEG被活化以具有适合偶联到修饰的IL-2(例如,工程化的Q残基)上的期望位点的反应性基团(例如,胺)。将PEG偶联到反应性基团的方法是本领域已知的,并在Zalipsky,S,等人,"用于修饰多肽的功能化聚乙二醇的用途"在《聚乙二醇化学:生物技术和生物医学应用》,J.M.Harris,Pleenus出版社,纽约(1992),Zalipsky(1995),高级药物评论,16:157-182中进一步描述。

[0192] 在一些实施方案中,"PEG部分"可以包括胺供体基团(例如伯胺-$NH_2$)、任选的选接头和PEG分子。在一些实施方案中,PEG部分是氨基-(任选接头)-$(CH_2CH_2O)_n$,其中n是至少1的整数。在一些实施方案中,胺供体基团是伯胺(-$NH_2$),其为谷氨酰胺转胺酶提供底物,使得PEG分子通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联。因此,工程化的Q残基和胺供体基团之间的连接可以是式-$CH_2$-$CH_2$-CO-NH-。在一些实施例中,PEG部分可以是$NH_2$-(接头)-PEG,$NH_2$-NH-(接头)-PEG,或$NH_2$-O-(接头)-PEG。在一些实施方案中, PEG部分是甲氧基-PEG-胺(mPEG-胺)。其它示例性的胺供体基团接头包括但不限于: Ac-Lys-Gly、氨基己酸、AC-Lys-β-Ala、Ac-Lys-Val(缬氨酸)-CIT(瓜氨酸)-PABC(p-氨基苯氧羰基)、氨基己酰-Val-Cit-

PABC、腐胺和Ac-Lys-腐胺。

[0193] 在一些实施例中,接头是不可切割的接头。在一些实施例中,接头包括但不限于:$NH_2$-R-PEG,$NH_2$NH-R-PEG和$NH_2$-O-R-PEG。在一些实施方案中,R是烷基。在一些实施方案中,PEG分子和工程化的Q残基通过可裂解接头连接。合适的可裂解接头包括但不限于:Lys-Phe-PEG或Lys-Val-Cit-PABC-PEG。PABC是指p-氨基酶氧羰基。Cit指瓜氨酸。

[0194] 在一些实施方案中,PEG部分通过-NH-$(C)_n$-接头连接到受体谷氨酰胺残基,其中$(C)_n$是取代或未取代的烷基或杂烷基链,其中n是约1至约60的整数。在一些实施方案中,链的碳被烷氧基、羟基、烷基羰基氧基、烷基-S-、巯基、烷基-C(O)S-、胺、烷基胺、酰胺或烷基酰胺取代。在一些实施例中,n为约2至约20。

[0195] 在一些实施例中,任选接头是分支的。在一些实施例中,接头是线性的。在一些实施例中,任选接头具有一个以上(例如2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多)连接位点,用于连接PEG部分。这些活性部分可以彼此相同或不同。例如,PEG部分可以包括连接到多个PEG分子的基于聚缩醛或聚缩醛衍生物的聚合物。

[0196] 在一些实施例中,当如本文所述进行两步偶联方法时(例如,参见图9和下面的"PEG 部分与工程化的Q残基的偶联"小节),所述PEG部分包括接头和PEG分子,其中所述接头是小分子柄$NH_2$-R内的R配体的结合伙伴(见下文"小分子柄"小节)。这允许连接包含结合伙伴的任何PEG部分。合适的配体/结合伙伴对包括但不限于:抗体/抗原、抗原/抗体、亲和素/生物素、生物素/亲和素、链亲和素/生物素、生物素/链亲和素、谷胱甘肽/GST、GST/谷胱甘肽、麦芽糖结合蛋白/直链淀粉、直链淀粉/麦芽糖结合蛋白、纤维素结合蛋白和纤维素、纤维素/纤维素结合蛋白等。

[0197] 在一些实施例中,PEG部分包括约2至约300个末端。在一些实施方案中,PEG部分是端封(end capped)的,例如烷氧基PEG或双官能PEG。在一些实施例中,PEG部分是线性的。在一些实施方案中,PEG部分是分枝的或多臂的(例如,分叉的PEG或连接到多元醇核上的PEG)、树枝状(或星形)结构,每个结构具有或不具有一个或多个可降解接头。PEG部分的内部结构可以以任意数量的不同重复模式组织,并且可以选自下组: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。

[0198] 在一些实施例中,用端封部分最终封住PEG部分。通常,尽管不是必须的,封端部分包括:羟基或$C_{1-20}$烷氧基,更优选$C_{1-10}$烷氧基,更优选$C_{1-5}$烷氧基。因此,封端部分的实例包括:烷氧基(例如,甲氧基、乙氧基和苄氧基),以及芳基、杂芳基、环、杂环等。必须记住,封端部分可以包括聚合物中末端单体的一个或多个原子(例如,$CH_3O(CH_2CH_2O)_n$-和$CH_3(OCH_2CH_2)_n$-)中的封端部分"甲氧基")。此外,上述每一种形式的饱和、非饱和、取代和未取代形式也包括在内。此外,封端基团也可以是硅烷。所述封端基团还可以有利地包括可检测的标记。当聚合物具有包括可检测标记的封端基团时,可以通过使用合适的检测器来确定聚合物和/或与聚合物偶联的部分(例如,活性剂)的量或位置。这种标记包括但不限于:荧光剂、化学发光剂、酶标记中使用的部分、比色剂(例如染料)、金属离子、放射性部分等。合适的探测器包括光度计、胶片、分光计等。所述封端基团还可以有利地包括磷脂。当聚合物具有包含磷脂的封端基团时,独特的性质被赋予聚合物和所得到的偶联物。示例性磷脂包括但不限于:选自称为磷脂酰胆碱类的磷脂。特定的磷脂包括但不限于:选自下组的二劳尔酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二甾酰磷脂酰胆碱、山甲酰磷脂

酰胆碱、花生酰磷脂酰胆碱和卵磷脂。所述封端基团还可以包括靶向部分，使得所述聚合物以及附着在聚合物上的任何部分，例如修饰的IL-2蛋白，可以优先定位在感兴趣的区域中。在一些实施方案中，封端部分是甲氧基。在一些实施方案中，PEG部分是甲氧基-PEG-胺。在一些实施方案中，PEG部分是约 20kDa、约30kDa或约40kDa的甲氧基-PEG-胺。在一些实施方案中，PEG部分是 X-(PEG)n-$NH_2$，其中，n为5-100的整数，X为选自下组的官能团：甲氧基、乙醛、氨基氧基、丙醛、N-羟基丁二酰亚胺、巯基、马来酰亚胺、碘乙酰胺、叠氮化物、炔烃、DBCO等。

[0199] 按照本领域中的惯例，PEG部分的尺寸通过参考标称分子量来指示，标称分子量通常以千道尔顿(kDa)提供。分子量以本领域已知的各种方法计算，包括数量、重量、粘度和"Z"平均分子量。除非另有说明，此处所有对分子量的提及均指重均分子量。分子量的测定，数均和重均，可以用凝胶渗透色谱或其他液相色谱技术来测量。也可以使用其他测量分子量值的方法，例如使用端基分析或测量综合性质(例如，凝固点降低、沸点升高或渗透压)来确定数均分子量，或使用光散射技术、超速离心或粘度计来确定重均分子量。本发明的聚合物，例如PEG部分，通常是多分散的(即聚合物的数均分子量和重均分子量不相等)，具有优选小于约1.2、更优选小于约1.15、更优选小于约1.10、更优选小于约 1.05、最优选小于约1.03的低的多分散度值。可以理解的是，聚合物如PEG等，以分子量分布在标称平均值附近的形式存在。作为PEG分子量术语的示例，术语"PEG20kD"或"20kDa PEG"是指标称分子量为20千道尔顿的聚乙二醇聚合物。对于30kDa PEG或40kDa PEG，也是类似的。

[0200] 在一些实施方案中，PEG部分的分子量在约5kDa至约50kDa的范围内，例如约6kDa至约40kDa、约7kDa至约30kDa、约8kDa至约25kDa、约9kDa至约20kDa、约10kDa 至约15kDa、约10kDa至约20kDa、约10kDa至约30kDa、约10kDa至约40kDa、约20kDa 至约40kDa、或约10kDa至约50kDa中的任何一种。在一些实施方案中，PEG部分的分子量约为5kDa、6kDa、7kDa、8kDa、9kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、 35kDa、40kDa、45kDa或约50kDa中的任何一种。在一些实施方案中，PEG部分具有约 20kDa或约40kDa的分子量。

[0201] 当用作聚合物时，PEG通常包括许多($OCH_2CH_2$)单体(或($CH_2CH_2O$)单体，取决于PEG的定义)。如在整个描述中所使用的，重复单元的数量由$(OCH_2CH_2)_n$中的下标"n"标识。因此，(n)的值通常落在约50至约2000内，例如约60至约1800、约70至约1500、约80 至约1500、约100至约1500、约500至约1200、约500至约1000、约100至约1000、约100至约500、约50至约100、或约600至约800中的任何一个。

[0202] 修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2R亚基的结合亲和力

[0203] 本文描述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的结合亲和力可以通过上述"与包含工程化的 Q残基的修饰IL-2蛋白的IL-2R亚基的结合亲和力"部分中描述的任何方法来测量。

[0204] 在一些实施方案中，与未进行聚乙二醇化的相同修饰IL-2蛋白相比，聚乙二醇化(PEG 部分的偶联)减少或略微影响修饰IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基的结合。在一些实施方案中，与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)相比，聚乙二醇化减少或轻微影响修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基的结合。在一些实施方案中，与未聚乙二醇化的相同修饰IL-2蛋白进行比较，聚乙二醇化不影响或仅轻微影响修饰的IL-2 蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基和/或$\gamma_c$亚基的结合。在一些实施方案中，与亲本IL-2 蛋白(例如，野生型IL-2或IL-2阿地白介素)相比较，聚乙二醇化不影响或仅轻微影响修饰的IL-

2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基和/或γc亚基的结合。

[0205] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基之间的结合亲和力,比亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间的结合亲和力降低了约10至约2000倍。因此,在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基的结合$K_D$,约为亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2 Rα亚基之间的结合$K_D$的约10～2000倍,例如为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间的结合$K_D$的约10至约50倍、约10至约100倍、约100 至约500倍、约100至约1000倍、约500至约1000倍、约200至约1500倍、约400至约1200倍、约600至约800倍或约1000至约2000倍任一种。因此,在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基之间的结合$K_D$为约100nM-40000nM,例如约100nM-500nM、约500nM-1000nM、约100nM-1000nM、约1000nM-5000nM、约 5000nM-10000nM、约10000nM-40000nM、约500nM-30000nM、或约1000nM-20000nM中的任一种。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基的结合$K_D$约为100～1000nM,如约245nM或约835nM。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG 偶联物不结合或不能被检测(例如,通过SPR)到结合IL-2Rα亚基。

[0206] 在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基之间的结合$K_D$与相同的未聚乙二醇化修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基之间的结合$K_D$类似(例如,等于,或约1 至约2倍)或为其约2至约500倍,如等于未经聚乙二醇化的同一修饰IL-2蛋白与IL-2Rα亚基之间的结合$K_D$的约1-约1.1倍、约1-约2倍、约2-约400倍、约10-约300倍、约 50-约250倍、或约100-约200倍。

[0207] 在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rαβγ复合物的结合亲和力也降低了。在一些实施方案中,与未经聚乙二醇化的相同修饰的IL-2蛋白相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与 IL-2Rαβγ复合物的结合亲和力也降低。

[0208] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基之间的结合亲和力与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间的结合亲和力是相似(例如相等)的或降低约1至约30倍(例如约1至约10倍)。因此,在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$,类似于(例如,等于)或为亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$的约1至约30倍(例如,约1至约10倍,或约8至约11倍);例如为亲本IL-2 蛋白(如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$的约1至约1.1倍,约1至约2倍,约2至约9倍,约3至约8倍,约4至约7倍,约1至约10倍,约8至约11倍,约10至约30倍,约5至约20倍,约6至约15倍,或约5至约6倍。因此,在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基的结合$K_D$约为100nM～ 10μm,例如约100nM到约5000nM、约100nM至约500nM、约100nM至约1000nM、约500nM至约1000nM、约200nM至约3500nM、约1000nM至约5000nM、约1000nM至约4000nM、约2000nM至约4000nM、约1μM至约10μM、约1μM至约9μM、约2μM 至约8μM、约3μM至约7μM、约4μM至约6μM,或约1500nM至约3500nM中的任何一种。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$约为200nM-4000nM(例如,约1000nM-4000nM),或约4μM-6μM。

[0209] 在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$类似于

(例如等于)相同的未聚乙二醇化修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$,或为未聚乙二醇化的相同修饰IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$的约1至约10倍,例如为未聚乙二醇化相同修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基的结合$K_D$的约1-约1.1倍、约1-约2倍、约2-约9倍、约3-约8倍、约4-约7倍、或约5-约6倍。

[0210] 在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$类似于(例如,等于) 相同的经PEG化修饰的IL-2蛋白(即修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物)与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$,或为经聚乙二醇化相同修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基的结合$K_D$的约1至约 10倍,例如为聚乙二醇化相同修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基的结合$K_{D的}$约1-约1.1倍、约1.4-约1.9倍、约1-约2倍、约2-约9倍、约3-约8倍、约4-约7倍、或约5-约6倍。

[0211] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα和/或IL-2Rβ亚基的结合亲和力,随着PEG部分大小的增加而降低。例如参见实施例7中的DP006-A-20、 DP006-A-30、DP006-A-40。

[0212] 修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的生物活性

[0213] 本文描述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的生物活性可以通过上述“包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白的生物活性”部分中描述的任何方法来测量。

[0214] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物能够激活免疫细胞,例如诱导IL-2 依赖性免疫细胞增殖,和/或诱导STAT5磷酸化。在一些实施方案中,免疫细胞选自下组:杀伤T细胞($T_c$,细胞毒性T淋巴细胞,或CTL),辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK)细胞。

[0215] 修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物(与未进行聚乙二醇化的相同/亲本修饰的IL-2蛋白相反),可能具有或可能不具有可测量程度的IL-2活性。也就是说,根据本发明的修饰的IL-2 蛋白-PEG偶联物可以具有未聚乙二醇化的亲本修饰的IL-2蛋白的约0.1%至约100%的生物活性。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物可具有大于未聚乙二醇化亲本修饰的IL-2蛋白的100%(例如,大于105%、110%、120%、130%、140%、150%、200%、250%、300%或400%中的约任何一种)的生物活性。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的特征在于,相对于未聚乙二醇化的亲本修饰的IL-2蛋白具有满足以下一个或多个百分比的生物活性:至少约2%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约97%(当在合适的模型中测量时,例如在本领域公知的模型中测量时)。优选地,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物具有至少一定程度的未聚乙二醇化亲本修饰的IL-2蛋白的生物活性。

[0216] 在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物具有类似的(例如,等)或与未聚乙二醇化的相同修饰IL-2蛋白相比约2至约200倍降低的激活(例如,诱导增殖)Treg的能力,例如与未聚乙二醇化的相同修饰IL-2蛋白相同,或约1至约1.1倍、约1至约2倍、约2 至约10倍、约2至约20倍、约5至约50倍、约10至约100倍、约100至约200倍、约 50至约150倍降低的激活Treg的能力。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物具有类似的(例如,等于)或与未聚乙二醇化的相同修饰IL-2蛋白相比约1至约10倍的降低的活化CTL/a NK细胞的能力,例如与未聚乙二醇化的相同修饰IL-2蛋白相比相同的,或降低约1至约1.1倍、约1至约2倍、约2至约10倍、约3至约9倍、约4至约8倍、约5至约7倍或约4至约6倍的活化CTL/a NK细胞

的能力。在一些实施例中,修饰的IL-2 蛋白具有类似的(例如,等于)或与聚乙二醇化的相同修饰IL-2蛋白(即,修饰的IL-2蛋白 -PEG偶联物)相比,降低激活CTL/a NK细胞的能力约1至约10倍,例如与聚乙二醇化的相同修饰的IL-2蛋白相比,其激活CTL/a NK细胞的能力是相同或降低了约1至约1.1 倍、约1至约2倍、约2至约10倍、约3至约9倍、约4至约8倍、约5至约7倍或约 4至约6倍。

[0217] 在一些实施方案中,修饰IL-2蛋白-PEG偶联物与未聚乙二醇化的相同的修饰IL-2蛋白相比,在激活Treg方面的能力是相似(例如相等)的或具有约2至约200倍的降低,并且与未聚乙二醇化的相同的修饰IL-2蛋白相比,在激活CTL细胞和/或NK细胞方面具有相似(例如相等)的能力或约1至约10倍降低的能力。在一些实施方案中,修饰IL-2蛋白-PEG偶联物与未聚乙二醇化的相同的修饰IL-2蛋白相比,在激活Treg方面的能力相似(例如相等,或约1至约2倍)或具有约2至约200倍的降低,并且与未聚乙二醇化的相同的修饰IL-2蛋白相比,在激活CTL细胞和/或NK细胞方面具有相似(例如相等)的能力或约1至约20倍(例如约1至约10倍)提高的能力。在一些实施方案中,与未聚乙二醇化的亲本修饰的IL-2蛋白相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物对NK细胞和/或CTL的激活能力强于对Treg细胞的激活。例如,参见图6B。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG 偶联物可激活NK细胞和/或CTL,而在Treg细胞中很少被激活或没有激活。

[0218] 在一些实施例中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2,或IL-2 Aldesleukin)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物激活Treg细胞的能力降低了约2至约5000倍,例如激活Treg细胞的能力与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2,或IL-2 Aldesleukin)相比降低了约2至约20倍、约2至约100倍、约100至约500倍、约500至约1000倍、约1000至约2000 倍、约100至约1000倍、约1000至约5000倍、约2000至约3000倍、约3000至约4000 倍或约4000至约5000倍中任一种。在一些实施例中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2 或IL-2 Aldesleukin)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物具有类似(例如,相等)的或约1至约50倍降低的激活CTL(或NK)细胞的能力,例如激活CTL(或NK)细胞的能力与亲本IL-2 蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2 Aldesleukin)相比是类似的,或降低了约1至约1.1倍、约 1至约2倍、约2至约10倍、约10至约50倍、约20至约40倍、约20至约30倍或约 30至约50倍中任一种。在一些实施例中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2 Aldesleukin)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物具有类似的(例如,相等)的或约1至约20 倍(例如,约1至约10倍)提高的激活CTL(或NK)细胞的能力,例如激活CTL(或NK)细胞的能力与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2 Aldesleukin)是相同的,或提高的能力(约1至约1.1倍、约1至约2倍、约2至约10倍或约5至约20倍中的任一种)。

[0219] 在一些实施方案中,与野生型IL-2蛋白相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物激活Treg 细胞的能力具有约2至约5000倍的降低,并且与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2 阿地白介素)相比,在激活CTL细胞和/或NK细胞方面具有相似(例如,相等)的或约1至约50倍降低的能力。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与野生型IL-2蛋白相比,在激活Treg细胞方面具有约2至约5000倍的能力的降低,并且与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2阿地白介素)相比,具有相似(例如,相等)的或约1至约20 倍(例如,约1至约10倍)提高的激活CTL细胞和/或NK细胞的能力。在一些实施例中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2 Aldesleukin)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG 偶联物对CTL和/或

NK细胞上的激活是类似(例如相等)于或优先于对Treg细胞激活,例如与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2 Aldesleukin)相比,具有类似(例如相等)的或约1至约20倍(例如约1至约10倍)更高的能力来增加CTL与Treg的比率或NK 细胞与Treg的比率。

[0220] 在一些实施方案中,本文描述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的生物活性,可通过IL-2 依赖性CTLL-2细胞增殖测定来测量。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的EC50为约1000nM至约15000nM,例如约1000nM至约5000nM、约5000nM至约 10000nM、约10000nM至约15000nM、约2000nM至约4000nM、或约2642nM。

[0221] 在一些实施方案中,与亲本IL-2(例如野生型IL-2,hIL-2或IL-2 Aldesleukin)相比,本文描述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物具有降低的能力(例如,降低约1至约200倍的能力)来刺激IL-2Rα+T细胞(例如,Treg细胞)中的STAT5磷酸化。在一些实施方案中,与亲本IL-2(例如野生型IL-2,hIL-2或IL-2 Aldesleukin)相比,本文描述的修饰IL-2蛋白 -PEG偶联物具有降低的能力(例如,降低约1至约200倍的能力)来刺激IL-2Rα+T细胞(例如,Treg细胞)中的PERK1/ERK2信号传导。在一些实施方案中,IL-2Rα+T细胞是Treg 细胞。

[0222] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的生物活性(例如,激活CTL或NK细胞的能力,或者优先激活CTL和/或NK细胞而不是Treg细胞的能力)随着PEG部分大小的增加而降低。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的生物活性(例如,激活CTL或NK细胞的能力,或者优先激活CTL和/或NK细胞而不是Treg细胞的能力) 随着PEG部分大小的增加而增加。

[0223] 修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的药代动力学研究

[0224] PEG部分可以改善多肽的药代动力学和/或生物学特性,例如,增加血清半衰期和生物活性,增强$C_{max}$(给药期间最大血药浓度),增加$AUC_{0-inf}$(曲线下的总面积或给药后随时间的总药物暴露量),和/或延长体内半衰期。

[0225] 在一些实施方案中,本文描述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物具有约1小时至约30小时的半衰期(例如消除半衰期或分布半衰期),例如约1小时至约10小时、约4小时至约 30小时、约5小时至约20小时、约10小时至约30小时、约8小时至约25小时、约2 小时至约10小时、约20小时至约30小时或约10小时至约20小时。在一些实施方案中,本文描述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的半衰期约为11.7小时,或约为18.1小时。在一些实施方案中,本文描述的修饰IL-2蛋白以单次静脉注射(例如,以约2mg/kg)或单次皮下注射(例如,以约2mg/kg)方式给药。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的血清半衰期随着PEG部分大小的增加而增加,例如,见实施例6和8。

[0226] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物在单次静脉注射给药时,提供比单次皮下注射时更短的$T_{max}$,如缩短约5分钟至约1000分钟,或缩短约50分钟至100分钟。

[0227] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物在单次静脉注射或单次皮下注射给药(例如,以约2mg/kg)时,提供约0.05μg/mL至约100μg/mL,例如约1μg/mL 至约10μg/mL,或约10μg/mL至约100μg/mL的最大血清浓度($C_{max}$)。在一些实施方案中,本文所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物在单次静脉注射给药时,提供了比单次皮下注射给药时更高的$C_{max}$,如高出约5倍至约500倍,或高出约90倍至100倍。

[0228] 在一些实施方案中,在单次静脉注射或单次皮下注射(例如,约2mg/kg)中给药时,

本文所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物提供的$AUC_{0-last}$或$AUC_{0-inf}$在约1小时·μg/mL至约500小时·μg/mL之间,如约1小时·μg/mL至约50小时·μg/mL,约10小时·μg/mL至约 100小时·μg/mL,约5小时·μg/mL至约20小时·μg/mL,约50小时·μg/mL至约200小时·μg/mL,约100小时·μg/mL至约500小时·μg/mL,或约100小时·μg/mL至约300小时·μg/mL之间。在一些实施例中,本文所述的修饰IL-2蛋白的$AUC_{0-last}$或$AUC_{0-inf}$为约 200小时·μg/mL至约300小时·μg/mL,例如约227.5小时·μg/mL(例如,在单次静脉注射后)。在一些实施例中,本文所述的修饰IL-2蛋白的$AUC_{0-last}$或$AUC_{0-inf}$为约10小时·μg/ml 至20小时·μg/ml,例如约16.9小时·μg/ml(例如,在单次皮下注射之后)。在一些实施方案中,本文所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物在单次静脉注射中给药时,提供了比单次皮下注射时更高的总暴露量($AUC_{0-last}$),如高出约2倍至约200倍,或高出约5倍至20倍。

[0229] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的循环半衰期,与不含PEG部分的的相同修饰的IL-2蛋白和/或亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2阿地白介素)的循环半衰期相比,是其至少约1.5倍,例如至少约1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、 3倍、4倍、5倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍或40倍。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的循环半衰期比不含PEG部分的相同修饰IL-2蛋白和/ 或亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)长约1.5至2倍,长约1.5至约5 倍、约3至约20倍、约10至约20倍、约15至约30倍、约10至约15倍、约3至约10 倍、约6至约18倍、约8至约15倍或约10至约12倍。在一些实施方案中,本文描述的亲本IL-2蛋白和/或修饰的IL-2蛋白的循环半衰期约为80分钟。

[0230] 在一些实施例中,修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的总暴露量($AUC_{0-last}$或$AUC_{0-inf}$)比不含 PEG部分的相同修饰IL-2蛋白和/或亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)高至少约1.5倍,例如至少约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、 15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、100倍。在一些实施例中,修饰IL-2蛋白-PEG 偶联物总暴露量(AUC0-last或AUC0-inf)比不含PEG部分的相同修饰IL-2蛋白和/或亲本 IL-2蛋白(例如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)高约1.5至约5倍、约2至约10倍、约5 至约20倍、约10至约100倍、约20至约50倍或约43倍。

[0231] 修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的药代动力学性质可以如下确定(也可参见例如,实施例6和8)。例如,成对的大鼠或小鼠可以接受静脉注射试验蛋白。通过在所需的时间点从动物身上取出少量血液样本,在24小时内测量蛋白的循环水平。试验蛋白的循环水平可以用ELISA测定来定量。另外的实验可以使用皮下途径来给药蛋白。类似的实验应该用非聚乙二醇化的蛋白作为对照。这些实验将揭示PEG试剂附着在蛋白上是否会改变其药代动力学特性。与未聚乙二醇化的蛋白相比,用聚乙二醇共价修饰蛋白应该增加蛋白的循环半衰期。较大的PEG分子和/或多个PEG分子的附着,应该比较小的PEG分子延长更长的循环半衰期。

[0232] III.修饰IL-2蛋白及修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的制备方法

[0233] 本申请提供制备本文所述的任一修饰的IL-2蛋白的方法,以及制备本文所述的任一修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的方法。包含本文所述的工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白或其组合物,可以通过任何基于重组的制备蛋白的方法来制备,例如以下章节中修饰IL-2 蛋白的重组生产中所描述的任何方法,或参见实施例1。

[0234] 因此,在一些实施方案中,提供了一种制备包含本文描述的工程化的Q残基的修饰

IL-2蛋白的方法。在一些实施方案中,提供了一种制备组合物的方法,所述组合物包括多种修饰的IL-2蛋白,所述修饰的IL-2蛋白包括本文所述的工程化的Q残基。在一些实施方案中,提供了一种制备修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的方法,包括:在TGase存在下,在足以使PEG部分通过修饰的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联的条件下,使包含本文所述的修饰的Q残基的修饰的IL-2蛋白与PEG部分接触。在一些实施方案中,该方法进一步包括:产生包含本文所述的工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白。在一些实施方案中,在包含本文所述的多种修饰IL-2蛋白的组合物中,只有一部分(例如,至少约70%、80%、90%、 95%、96%、97%、98%、99%中的任何一种)修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG 部分结合。在一些实施方案中,组合物中所有修饰的IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG 部分结合。因此,在一些实施方案中,提供了一种制备修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的方法,包括:在TGase存在下,在足以使PEG部分通过修饰的Q残基偶联到修饰的IL-2 蛋白的条件下,使包含多个修饰的IL-2蛋白的组合物与PEG部分接触,所述修饰的IL-2 蛋白包含在此描述的修饰的Q残基。在一些实施方案中,所述方法进一步包括:产生包含多个含有工程化Q残基的修饰的IL-2蛋白的组合物。在一些实施方案中,组合物中至少约70%(例如,至少约75%、80%、90%或95%)的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG部分偶联。在一些实施方案中,组合物中至少约90%(例如,至少约91%、92%、 93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任何一种)的修饰IL-2蛋白通过工程化的 Q残基与PEG部分结合。在一些实施方案中,该组合物包含本文所述的修饰IL-2蛋白的同质群体。在一些实施方案中,所述组合物包含在此描述的修饰IL-2蛋白的异质性群体,即修饰IL-2蛋白包含不同的工程化的Q残基。

[0235] 本申请还提供了用于克隆和表达本文所述的任何一种修饰的IL-2蛋白的分离的核酸和载体,包含此类核酸或载体的宿主细胞。修饰的IL-2蛋白和修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物可以使用本领域中已知的任何方法或如本文所述的方法制备。例如参见实施例1-2。

[0236] 在一些实施方案中,IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、IL-2阿地白介素或修饰的IL-2蛋白)可以在细菌(例如,大肠杆菌,参见,例如Fischer等人.(1995)Biotechnol.Appl.BioIL-2m. 21(3):295-311),哺乳动物(例如见Kronman等人.(1992)基因121:295-304),酵母(例如毕赤酵母(Pichia pastoris),例如参见Morel等人.(1997)Biochem.J.328(1):121-129),和植物(参见,例如,Mor等.(2001)Biotechnol.Bioeng.75(3):259-266)的表达系统中表达。表达可以通过外源表达(当宿主细胞自然包含所需的遗传编码时)或通过内源性表达发生。

[0237] 尽管用于制备蛋白的基于重组的方法可能不同,但重组方法通常包括:构建编码所需多肽或片段的核酸,将核酸克隆到表达载体中,转化宿主细胞(例如,植物、细菌、酵母、转基因动物细胞或哺乳动物细胞,如中国仓鼠卵巢细胞或幼仓鼠肾细胞),并表达核酸以产生所需多肽或片段。在原核和真核的宿主细胞中,重组多肽的体外生产和表达方法是本领域普通技术人员已知的。

[0238] 在一些实施方案中,该载体适合于在真核细胞中复制和整合,例如哺乳动物细胞(例如CHO细胞)。在一些实施方案中,载体是病毒载体。病毒载体的实例包括但不限于:腺病毒载体、腺相关病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、单纯疱疹病毒载体及其衍生病毒载体。在一些实施方案中,所述载体适于在原核细胞中复制和表达,例如大肠杆菌。分子克隆技术和载体在本领域中是众所周知的,并且例如在Sambrook等人.(2001年,分子克隆:实

验室手册,冷泉港实验室,纽约),以及其他分子生物学手册中描述。

[0239] 在一些实施方案中,本发明的多肽是合成的,或者是通过表达重组核酸分子产生的。如果多肽是嵌合体(例如,包含至少在此描述的修饰IL-2蛋白和异源多肽的融合蛋白),它可以由包含编码全部或部分修饰IL-2蛋白的第一序列和编码全部或部分异源多肽的第二序列的杂交核酸分子编码。例如,本文所述的修饰的IL-2蛋白可与六组氨酸标签融合以利于细菌表达的蛋白的纯化,或与血凝素标签融合以利于真核细胞中表达的蛋白的纯化。

[0240] 构建编码本文描述的修饰IL-2蛋白的DNA序列并在适当转化的宿主中表达这些序列的方法,包括但不限于使用PCR辅助突变技术。由IL-2多肽的氨基酸残基的缺失或添加组成的突变也可以用标准重组技术进行。在缺失或添加的情况下,编码IL-2的核酸分子任选地用适当的限制性内切酶消化。所得片段既可以直接表达,也可以通过将其连接到第二片段来进一步操作。如果核酸分子的两端含有相互重叠的互补核苷酸,则可以促进连接,但平末端片段也可以连接。PCR产生的核酸也可用于产生各种突变体序列。

[0241] 可以合成含有编码修饰的IL-2蛋白的核苷酸序列的DNA寡聚物。例如,可以合成几个编码所需多肽一部分的小片段的寡核苷酸,然后连接。单个寡核苷酸通常含有5'或3' 的突出部分(overhang),用于互补组装。

[0242] 除了通过表达已被重组分子生物学技术改变的核酸分子来产生修饰的IL-2蛋白外,还可以通过化学合成被修饰的IL-2蛋白。化学合成的多肽通常由本领域技术人员生成。

[0243] 一旦组装(通过合成、定点诱变或其他方法),编码修饰的IL-2蛋白的DNA序列可被插入表达载体,并可操作地连接于适合修饰的IL-2蛋白在所需转化宿主中表达的表达控制序列。正确的组装可以通过核苷酸测序、限制性酶切图谱和生物活性多肽在合适宿主中的表达来确认。如本领域所熟知的,为了在宿主中获得转染基因的高表达水平,该基因必须可操作地连接至在所选择的表达宿主中有功能的转录和翻译表达控制序列。

[0244] 编码修饰IL-2蛋白的DNA序列,无论是通过定点诱变、化学合成或其他方法制备,也可以包括编码信号序列的DNA序列。这样的信号序列,如果存在,应该是被选择表达修饰的IL-2蛋白的细胞识别的信号序列。其可以是原核生物,也可以是真核生物,也可以是两者的组合。也可以是天然IL-2的信号序列。信号序列的包含,取决于是否希望从制备修饰的IL-2蛋白的重组细胞中分泌修饰的IL-2蛋白。如果所选择的细胞是原核的,通常优选DNA序列不编码信号序列。如果所选择的细胞是真核的,通常优选编码信号序列,并且最优选使用野生型IL-2信号序列。

[0245] 重组原核细胞生产修饰的IL-2蛋白

[0246] a)载体构建

[0247] 可以使用标准重组技术获得编码本申请的修饰IL-2蛋白的多核酸序列。所需的多核酸序列可以从产生IL-2的细胞例如T细胞中分离和测序。或者,多核苷酸可以使用核苷酸合成仪或PCR技术来合成,例如,定点突变。一旦获得,编码多肽的序列被插入能够在原核宿主中复制和表达异源多核苷酸的重组载体。为了本发明的目的,可以使用本领域中可用的和已知的许多载体。选择合适的载体主要取决于插入载体中的核酸的大小和用载体转化的特定宿主细胞。每个载体包含不同的元件,这取决于它的功能(扩增或表达异源多核苷酸,或兼而有之)及其与它所在的特定宿主细胞的相容性。载体元件一般包括但不限于:复制起点、选择标记基因、启动子、核糖体结合位点(RBS)、信号序列、异源核酸插入物和转录终止

序列。

[0248] 通常,含有源自与宿主细胞相容的物种的复制子和控制序列的质粒载体,是与这些宿主结合使用的。该载体通常携带一个复制位点,以及能够在转化细胞中提供表型选择的标记序列。

[0249] 此外,含有与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体,可以作为转化载体与这些宿主结合使用。例如,噬菌体如GEM™-11可用于制造重组载体,其可用于转化易感宿主细胞,如大肠杆菌LE392(E.coli LE392)。

[0250] 本申请的表达载体可以包括两个或更多个启动子-顺反子对,编码每个多肽组分。启动子是位于顺反子上游(5')的非翻译调节序列,用于调节其表达。原核启动子通常分为两类,诱导型和组成型。诱导型启动子是一种对于培养条件的变化作出响应,,例如营养物质的存在或缺乏或温度的变化,并在其控制下启动更高的顺反子转录水平的启动子。

[0251] 大量的启动子被各种潜在的宿主细胞识别是众所周知的。通过限制性内切酶从源DNA中去除启动子并将分离的启动子序列插入本申请的载体中,所选择的启动子可操作地连接到编码修饰的IL-2蛋白的顺反子DNA上。天然启动子序列和许多异源启动子都可以用来直接扩增和/或表达目的基因。在一些实施方案中,使用异源启动子,因为与天然靶多肽启动子相比,它们通常允许更大的转录和更高的表达靶基因产量。

[0252] 适用于原核宿主的启动子包括PhoA启动子、半乳糖酶和乳糖启动子系统、色氨酸(trp) 启动子系统、以及如tac或trc启动子之类的杂交启动子。然而,在细菌中起作用的其他启动子(如其他已知的细菌或噬菌体启动子)也是合适的。它们的核酸序列已经公布,因此本领域技术人员能够将使用可提供任何所需的限制性位点的接头或适配子,将它们可操作地连接到编码修饰的IL-2蛋白的顺反子上。

[0253] 在一个方面,重组载体内的每个顺反子包括分泌信号序列元件,其引导所表达的多肽发生跨膜易位。一般来说,信号序列可能是载体的一个元件,也可能是插入载体的目标多肽DNA的一部分。为本发明的目的选择的信号序列,应该是可被宿主细胞识别和处理的信号序列(即被信号肽酶切割)。对于不识别和不处理来自异源多肽的信号序列的原核宿主细胞,该信号序列被选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳定性肠毒素II(STII)前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA和MBP的原核信号序列所取代。在一些实施例中,信号序列是STII信号序列或其变体。

[0254] 在一些实施方案中,根据本申请的修饰IL-2蛋白的产生可以发生在宿主细胞的细胞质中,因此不需要在每个顺反子中存在分泌信号序列。在一些实施方案中,多肽元件在细胞质内被表达、折叠和组装,形成功能性IL-2。某些宿主菌株(例如,大肠杆菌trxB⁻菌株)提供有利于二硫键形成的细胞质条件,从而允许表达的蛋白亚基适当折叠和组装。Proba和Pluckthun,基因,159:203(1995)。

[0255] b)原核宿主细胞

[0256] 适于表达本申请的修饰IL-2蛋白的原核宿主细胞包括:古细菌和真细菌,例如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物。有用细菌的例子包括:大肠杆菌属(例如,大肠杆菌)、杆菌属(例如,枯草杆菌)、肠杆菌属、假单胞菌属(例如,铜绿假单胞菌)的种类、鼠伤寒沙门氏菌、粘质沙雷氏菌、克雷伯氏菌、变形杆菌、志贺氏菌、根瘤菌、透明颤菌,或者副球菌。在一些实施例中,使用革兰氏阴性细胞。在一些实施例中,本发明中使用大肠杆菌细胞作为宿主。大

肠杆菌菌株的实例包括:菌株W3110及其衍生菌株,包括具有基因型W3110 AfhuA(AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompT A(nmpc-fepE)degP41 kan$^{R}$(美国专利号5,639,635) 的菌株33D3。其它菌株及其衍生菌株,如大肠杆菌294(ATCC 31,446),大肠杆菌B,大肠杆菌1776(ATCC 31,537)和大肠杆菌RV308(ATCC 31,608)也是合适的。这些例子是说明性的,而不是限制性的。考虑到复制子在细菌细胞中的可复制性,选择合适的细菌通常是必要的。例如,当使用众所周知的质粒如pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410 来提供复制子时,大肠杆菌、沙雷氏菌或沙门氏菌可适当用作宿主。

[0257] 通常,宿主细胞应分泌最少量的蛋白水解酶,并且额外的蛋白酶抑制剂可以有利地被加入在细胞培养物中。

[0258] c)蛋白生产

[0259] 用上述表达载体转化宿主细胞,并在常规营养培养基中培养,所述营养培养基可按需要适当改良,以便诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的基因。转化是指将DNA 导入原核宿主,使其可以作为染色体外的元件或通过染色体整合体而进行复制。根据所使用的宿主细胞,转化是使用适合这些细胞的标准技术进行的。使用氯化钙的钙处理通常用于含有大量细胞壁屏障的细菌细胞。另一种转化方法采用聚乙二醇/DMSO。还有一种技术是电穿孔。

[0260] 用于生产本申请的修饰IL-2蛋白的原核细胞在本领域已知的适合于培养选定的宿主细胞的培养基中生长。合适的培养基包括luria肉汤(LB)和必要的营养补充剂。在一些实施方案中,培养基还包含基于表达载体的构建而选择的选择剂,以选择性地允许含有表达载体的原核细胞生长。例如,将氨苄青霉素添加到培养基中,用于表达氨苄青霉素耐药基因的细胞的生长。

[0261] 除碳、氮和无机磷酸盐源外,任何必要的补充剂也可以以适当的浓度单独引入或作为与另一补充剂或介质如复合氮源的混合物引入。任选地,培养基可含有选自下组的一种或多种还原剂:谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、巯基乙酸酯、二硫代赤藓糖醇和二硫代苏糖醇。原核宿主细胞在适宜的温度下培养。对于大肠杆菌的生长,例如,优选的温度范围为约20℃至约39℃,更优选约25℃至约37℃,甚至更优选约30℃。培养基的pH值可以是从约5到约9的任何pH值,这主要取决于宿主生物。对于大肠杆菌,pH优选为约6.8～ 7.4,更优选为约7.0。

[0262] 如果在本申请的表达载体中使用可诱导的启动子,则在适合启动子激活的条件下诱导蛋白表达。在本申请的一个方面,PhoA启动子用于控制多肽的转录。因此,将转化的宿主细胞培养在磷酸盐限制培养基中进行诱导。优选地,磷酸盐限制培养基是C.R.A.P培养基。根据所采用的载体结构,可以使用多种其他诱导剂,这是本领域已知的。

[0263] 本发明的表达的修饰IL-2蛋白被分泌到宿主细胞的周质中,并从宿主细胞的周质中回收。蛋白回收通常包括:裂解微生物,通常通过渗透冲击,超声或裂解等手段。一旦细胞被破坏,细胞碎片或整个细胞可以通过离心或过滤去除。所述蛋白可进一步纯化,例如通过亲和树脂层析。或者,蛋白可以运输到培养基中并从其中分离。可以从培养物中取出细胞,并过滤和浓缩培养物上清液,以进一步纯化所产生的蛋白。用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)和Western blot等已知的方法,可以进一步分离和鉴定表达的多肽。

[0264] 或者,通过发酵过程进行大量蛋白生产。各种大规模的补料分批发酵程序,可用于

生产重组蛋白。大规模发酵至少有1000升的容量,最好是大约1000至10万升的容量。这些发酵罐使用搅拌器叶轮来分配氧气和营养物质,特别是葡萄糖(优选的碳源/能源)。小规模发酵通常指在发酵罐中的发酵,其容量不超过大约100升,范围可以从大约1升到大约 100升。

[0265] 在发酵过程中,蛋白表达的诱导通常是在细胞在合适的条件下已经生长到所需的密度 (例如,$OD_{550}$为约180～220)后开始的,在此阶段细胞处于早期稳定期。根据所采用的载体结构,可以使用各种诱导剂,如本领域中已知的和上面描述的。细胞可以在诱导前生长较短的时间。细胞通常诱导约12-50小时,尽管可以使用较长或较短的诱导时间。

[0266] 为了提高本发明的修饰IL-2蛋白的产量和质量,可以改变各种发酵条件。例如,为了改善分泌的多肽的正确组装和折叠,可以使用额外的载体来共同转化宿主原核细胞,如Dsb蛋白(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD和或DsbG)或FkpA(一种具有伴侣活性的肽酰脯氨酰顺式、反式异构酶)。该伴侣蛋白已被证明有助于细菌宿主细胞中产生的异源蛋白的适当折叠和溶解。

[0267] 为了使表达的异源蛋白(尤其是那些对蛋白水解敏感的)的蛋白水解最小化,某些缺乏蛋白水解酶的宿主菌株可用于本发明。例如,可以修饰宿主细胞株以在编码已知细菌蛋白酶,例如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI 或其组合的基因中实现基因突变。

[0268] 缺乏蛋白水解酶并用过表达一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的大肠杆菌菌株可用作编码本申请的修饰的IL-2蛋白的表达系统中的宿主细胞。

[0269] d)蛋白纯化

[0270] 进一步纯化本文中产生的修饰IL-2蛋白,以获得用于进一步分析和应用的基本均质的制剂。可以采用本领域已知的标准蛋白纯化方法。以下步骤是合适的纯化步骤的示例:在免疫亲和柱或离子交换柱上分馏、乙醇沉淀、反相HPLC、在硅胶或阳离子交换树脂(如DEAE)上色谱、色谱聚合反应、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀和使用凝胶过滤(如Sephadex G-75)。

[0271] 修饰IL-2蛋白在真核细胞中的重组表达

[0272] 对于真核表达,载体成分通常包括但不限于以下一个或多个:信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0273] a)载体

[0274] 许多以病毒为基础的系统已经被开发出来用于将基因转移到哺乳动物细胞中。例如,逆转录病毒为基因传递系统提供了一个方便的平台。使用本领域已知的技术可以将异源核酸插入载体并将其包装成逆转录病毒颗粒。然后可以在体外或离体分离重组病毒并将其输送到工程哺乳动物细胞。本领域已知许多逆转录病毒系统。在一些实施方案中,使用腺病毒载体。本领域已知许多腺病毒载体。在一些实施方案中,使用慢病毒载体。在一些实施方案中,使用自失活慢病毒载体。例如,携带修饰的IL-2蛋白编码序列的自失活慢病毒载体可以用本领域已知的方案包装。所得慢病毒载体可用于使用本领域已知的方法转导哺乳动物细胞(如CHO细胞)。由慢病毒等逆转录病毒衍生的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因长期稳定地整合并在子代细胞中繁殖。慢病毒载体也具有较低的免疫原性,可以转导非增殖细胞。

[0275] 在一些实施方案中,载体是非病毒载体。在一些实施方案中,载体是转座子,例如睡美人(SB)转座子系统,或PiggyBac转座子系统。在一些实施方案中,载体是基于聚合物的

非病毒载体,包括例如聚(乳酸-羟基乙酸共聚物)(PLGA)和聚乳酸(PLA)、聚(乙烯亚胺)(PEI)和树状聚合物。在一些实施方案中,载体是基于阳离子脂质的非病毒载体,例如阳离子脂质体、脂质纳米乳液和固体脂质纳米颗粒(SLN)。在一些实施方案中,载体是基于肽的基因非病毒载体,例如聚L-赖氨酸。任何已知的适用于基因组编辑的非病毒载体可用于将修饰的IL-2编码核酸引入宿主细胞(例如T细胞)。例如,参见Yin H.等人, Nature Rev.Genetics(2014)15:521-555;Aronovich EL.等人,睡美人转座子系统:用于基因治疗的非病毒载体.Hum.Mol.Genet.(2011)R1:R14-20;和Zhao S.等人,PiggyBac转座子载体:人类基因编辑的工具,Transl.Lung Cancer Res.(2016)5(1):120-125,其通过引用并入于此。在一些实施方案中,通过物理方法将编码本文描述的修饰IL-2蛋白的任何一种或多种核酸引入宿主细胞(例如,T细胞),物理方法包括但不限于电穿孔、声穿孔、光穿孔、磁转染、水穿孔。

[0276] 在一些实施方案中,载体(如病毒载体,如慢病毒载体)包括编码本文描述的修饰IL-2 蛋白的任何一种核酸。可以使用本领域中任何已知的分子克隆方法,包括例如使用限制性内切酶位点和一个或多个选择性标记,将核酸克隆到载体中。在一些实施方案中,核酸可操作地连接到启动子。已经探索了多种启动子用于哺乳动物细胞中的基因表达,本领域中已知的任何启动子都可以用于本发明。

[0277] 本文描述的宿主细胞(例如,CHO细胞)可包含任何数目(例如1、2、3、4、5、10、 50、100、1000中的一种,或更多)编码本文所述修饰的IL-2蛋白的核酸。

[0278] 本文描述的核酸可以存在于异源基因表达盒中,所述异源基因表达盒包括一个或多个蛋白编码序列和任选的一个或多个启动子。在一些实施方案中,异源基因表达盒包括单个蛋白编码序列。在一些实施方案中,异源基因表达盒包括由单个启动子驱动的两个或多个蛋白编码序列(即,多顺反子)。在一些实施方案中,异源基因表达盒还包括一个或多个调控序列(例如5'UTR、3'UTR、增强子序列、IRES、转录终止序列)、重组位点、一个或多个选择标记(例如抗生素抗性基因、报告基因,等等)、信号序列或其组合。

[0279] 编码本文描述的修饰IL-2蛋白的核酸可以瞬时或稳定地整合在宿主细胞(例如CHO 细胞)中。在一些实施方案中,核酸在宿主细胞中瞬时表达。例如,所述核酸可以存在于包含异源基因表达盒的染色体外阵列(array)中的宿主细胞(例如,CHO细胞)的细胞核中。可以使用本领域已知的任何转染或转导方法,包括病毒或非病毒方法,将异源核酸引入宿主细胞(例如CHO细胞)。示例性的非病毒转染方法包括但不限于基于化学的转染,例如使用磷酸钙、树枝状聚合物、脂质体或阳离子聚合物(例如,DEAE-葡聚糖或聚乙烯亚胺);非化学方法,例如电穿孔、细胞挤压、声穿孔、光学转染、穿刺、原生质体融合、流体动力传递或转座子;基于粒子的方法,例如使用基因枪、磁转染或磁体辅助转染、粒子轰击;和混合方法,如核转染。在一些实施方案中,所述核酸是DNA。在一些实施方案中,所述核酸是RNA。在一些实施方案中,所述核酸是线性的。在一些实施方案中,所述核酸是圆形的。

[0280] 在一些实施方案中,所述编码本文描述的修饰IL-2蛋白的核酸存在于宿主细胞(例如 CHO细胞)的基因组中。例如,核酸可以通过本领域已知的任何方法整合到宿主细胞(例如CHO细胞)的基因组中,包括但不限于病毒介导整合、随机整合、同源重组方法和定点整合方法,例如使用定点特异性重组酶或整合酶、转座酶、转录激活剂样效应核酸酶(TALEN®)、CRISPR/Cas9和锌指核酸酶。在一些实施方案中,所述核酸整合在宿主细胞 (例

如CHO细胞)基因组的特定设计位点中。在一些实施方案中,所述核酸整合在宿主细胞(例如CHO细胞)基因组的整合热点中。在一些实施方案中,所述核酸整合在宿主细胞(例如CHO细胞)基因组的随机位点中。

[0281] b)信号序列组件

[0282] 一般来说,信号肽是将多肽靶定位到细胞中所需位置的肽序列。在一些实施方案中,信号肽将修饰的IL-2蛋白靶向到细胞的分泌途径并允许其分泌到宿主细胞外。信号肽包括天然存在的蛋白质的信号序列或合成的、非天然存在的信号序列,其适用于本文所述的修饰的IL-2蛋白质,对于本领域技术人员来说是显而易见的。

[0283] 用于真核宿主的载体也可以是编码信号序列或在成熟蛋白或多肽的N-末端具有特定切割位点的其它多肽的插入物。所选择的异源信号序列优选是被宿主细胞识别和加工(即被信号肽酶切割)的序列。在哺乳动物细胞表达中,可以使用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列,例如单纯疱疹gD信号。

[0284] 该前体区的DNA在阅读框中与编码本申请的修饰的IL-2蛋白的DNA连接。

[0285] c)复制起点

[0286] 通常,复制组分的起点对于哺乳动物表达载体是不需要的(通常使用SV40起点,因为它包含早期启动子)。

[0287] d)选择基因组分

[0288] 在一些实施方案中,所述载体含有选择标记基因或报告基因以从通过载体(例如慢病毒载体)转染的宿主细胞群中选择表达本文所述的修饰的IL-2蛋白的细胞。选择标记和报告基因的两侧都可能有适当的调控序列,使其能够在宿主细胞中表达。例如,所述载体可以包含转录和翻译终止子、起始序列和用于调节核酸序列表达的启动子。

[0289] 选择典型的编码蛋白质的基因:(a)对抗生素或其他毒素的抗性产生耐药性,例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素,(b)补充营养缺陷,或(c)提供复杂培养基无法提供的关键营养素。

[0290] 选择方案的一个例子是利用药物来阻止宿主细胞的生长。那些用异源基因成功转化的细胞会产生一种具有抗药性的蛋白,从而在选择方案中存活下来。这种优势选择的例子有药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0291] 适合哺乳动物细胞的可选择标记的另一个例子是那些能够鉴定有能力摄取编码本申请的修饰IL-2蛋白的核酸的细胞的标记,例如DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白-I和-II,优选灵长类金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0292] 例如,用DHFR选择基因转化的细胞首先通过在含有甲氨蝶呤(Mtx),DHFR的竞争拮抗剂的培养基中培养所有转化体来鉴定。当使用野生型DHFR时,一个合适的宿主细胞是缺乏DHFR活性的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系(例如,ATCC CRL-9096)。

[0293] 或者,用多肽编码DNA序列、野生型DHFR蛋白和另一种选择标记如氨基糖苷3'- 磷酸转移酶(APH)转化或共转化的宿主细胞(特别是含有内源性DHFR的野生型宿主) 可以通过细胞在含有选择标记选择剂的培养基中的生长来选择,例如氨基糖苷类抗生素,例如卡那霉素、新霉素或G418。

[0294] e)启动子组分

[0295] 表达和克隆载体通常含有被宿主生物识别的启动子,并可操作地连接到编码所需

多肽序列的核酸。事实上,所有真核基因都有一个富含AT的区域,位于转录起始位置上游约25-30碱基处。在许多基因转录起点上游70到80个碱基处发现的另一个序列是 CNCAAT区域,其中N可以是任何核苷酸。大多数真核生物的3'端是AATAAA序列,它可能是将多聚A尾添加到编码序列3'端的信号。这些序列都可以插入到真核表达载体中。

[0296] 哺乳动物宿主细胞中载体的多肽转录受到启动子控制,例如,通过从多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(如腺病毒2)、牛乳头状瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和最优选的猿猴病毒40(SV40),其来自异源哺乳动物启动子,例如来自热休克启动子肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子,前提是这些启动子与宿主细胞系统相容。

[0297] SV40病毒的早期和晚期启动子可以方便地作为SV40限制性片段获得,该片段也包含SV40病毒的复制原点。人巨细胞病毒的直接早期启动子可方便地作为HindIII E限制性片段获得。使用牛乳头状瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达DNA的系统公开于美国专利第4,419,446号。该系统的修改在美国专利第4,601,978号中有所描述。另参见Reyes等人,自然297:598-601(1982),报道了人干扰素cDNA在单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子控制下在小鼠细胞中的表达。另外,也可以用Rous肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

[0298] 在一些实施方案中,编码本文描述的修饰IL-2蛋白的核酸可操作地连接至组成型启动子。组成型启动子允许异源基因(也称为转基因)在宿主细胞中组成型表达。本文设想的示例性启动子包括但不限于,巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)、人类延伸因子 -1α(HEF1α)、泛素C启动子(UbiC)、磷酸甘油激酶启动子(PGK)、猿猴病毒40早期启动子(SV40)、鸡β-肌动蛋白启动子与CMV早期启动子(CAGG)、肉瘤病毒(RSV)启动子、多瘤增强子/单纯疱疹胸苷激酶(MC1)启动子、β-肌动蛋白(β-Act)启动子、"骨髓增生性肉瘤病毒增强子、阴性对照区删除、d1587rev引物结合位点取代(MND)启动子"。在大量的研究中,这些组成型启动子在驱动转基因表达方面的效率已经得到了广泛的比较。例如, Michael C.Milone等人比较了CMV、HEF1α、UbiC和PGK在原代人T细胞中的效率,得出hEF1α启动子不仅诱导了最高水平的转基因表达,而且在CD4和CD8人T细胞中得到最佳维持(分子疗法,17(8):1453-1464(2009))。在一些实施方案中,编码本文描述的修饰IL-2蛋白的核酸可操作地连接到HEF1α启动子或PGK启动子。在一些实施例中,所述启动子选自下组:EF-1启动子、CMV IE基因启动子、EF-1a启动子、泛素C 启动子、磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子、肉瘤病毒(RSV)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子、巨细胞病毒即刻早期基因启动子(CMV)、延伸因子1α启动子(EF1-α)、磷酸甘油酸激酶-1启动子(PGK)、泛素-C启动子(UBQ-C)、巨细胞病毒增强子/鸡β-肌动蛋白启动子 (CAG)、多瘤增强子/单纯疱疹胸苷激酶启动子(MC1)、β-肌动蛋白启动子(β-ACT)、猿猴病毒40启动子(SV40)和骨髓增殖性肉瘤病毒增强子、阴性对照区删除、d1587rev引物结合位点取代(MND)启动子、NFAT启动子、TETON®启动子和NFκB启动子。

[0299] 在一些实施方案中,编码本文描述的修饰IL-2蛋白的核酸可操作地连接到诱导型启动子。诱导型启动子属于调控型启动子的范畴。诱导型启动子可由一个或多个条件诱导,如物理条件、宿主细胞的微环境或宿主细胞的生理状态、诱导剂(即,诱导剂),或其组合。在一些实施方案中,诱导条件不诱导内源性基因在宿主细胞中和/或在接受包含这种宿主细胞的药物组合物的受试者中的表达。在一些实施方案中,诱导条件选自诱导剂、照射(例如电离辐射、光)、温度(例如热)、氧化还原状态、肿瘤环境和宿主细胞的激活状态。在一些实施方案中,可诱导启动子可以是NFAT启动子、TETON®启动子,或NFκB启动子。

[0300] f)增强子元件组分

[0301] 通过在载体中插入增强子序列,可以提高高级真核生物对编码本发明的修饰IL-2蛋白的DNA的转录。许多增强子序列现在已知来自哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、α-胎儿蛋白和胰岛素)。然而,通常会使用来自真核细胞病毒的增强子。例如,包括复制起点后期(100-270bp)的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点后期的多瘤增强子和腺病毒增强子。增强子可以在多肽编码序列的5'或3'处被剪接到载体中,但优选位于启动子的5'处。

[0302] g)转录终止组分

[0303] 真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人类或其他多细胞生物的有核细胞)使用的表达载体也将包含终止转录和稳定mRNA所必需的序列。这些序列通常可从真核或病毒的DNA或cDNA的5'和偶尔3'的非翻译区获得。这些区域含有在编码多肽mRNA 的非翻译部分转录为聚腺苷酸化片段的核苷酸片段。一个有用的转录终止组分是牛生长激素多聚腺苷酸化区。参见WO94/11026和其中公开的表达载体。

[0304] h)宿主细胞的选择和转化

[0305] 用于在本文所述载体中克隆或表达DNA的合适宿主细胞包括本文所述的高等真核生物细胞,包括脊椎动物宿主细胞。脊椎动物细胞的培养(组织培养)繁殖已成为常规程序。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子是SV40(COS-7,ATCC CRL 1651)转化的猴肾CV1 系;人胚胎肾系(为悬浮培养生长而亚克隆的293或293细胞,Graham等,J.Gen Virol. 36:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO,Urlaub等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));小鼠支持细胞(TM4,Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);水牛大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TR1细胞 (Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;和人类肝癌细胞系(Hep G2)。

[0306] 用上述表达或克隆载体转化宿主细胞用于修饰的IL-2蛋白生产,并在常规营养培养基中培养,所述营养培养基被适当地修饰以诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的基因。

[0307] 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法(例如CHO细胞)包括磷酸钙沉淀、脂质体化、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。制备包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域公知的。例如,请参见Sambrook等人(2001年,分子克隆:实验室手册,冷泉港实验室,纽约)。在一些实施方案中,通过磷酸钙转染将多核苷酸引入宿主细胞。

[0308] 将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体,尤其是逆转录病毒载体,已成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物的方法,例如人类,细胞。其它病毒载体可以来源于慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒1、腺病毒和腺相关病毒等。参见例如,美国专利第5,350,674号和第5,585,362号。

[0309] 将多核苷酸引入宿主细胞的化学方法包括胶体分散系统,例如高分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和脂质系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。一种用作体外和体内递送载体的示例性胶体系统是脂质体(例如,人工膜囊泡)。

[0310] 在一些实施方案中,编码本文描述的修饰IL-2蛋白的RNA分子可以通过常规方法制备(例如,体外培养转录),然后通过mRNA电穿孔等已知方法导入宿主细胞(例如CHO细胞)。参见,例如Rabinovich等人,人类基因疗法17:1027-1035。

[0311] 在使用非病毒递送系统的情况下,示例性递送载体是脂质体。脂类制剂的使用可用于将核酸引入宿主细胞(体外,离体或在体内)。在另一方面,所述核酸可以与脂质相关联。与脂质相关的核酸可以被包裹在脂质体的水性内部,散布在脂质体的脂质双层内,通过与脂质体和寡核苷酸相关的连接分子连接到脂质体,包裹在脂质体中,与脂质体复合,分散在含有脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质结合,作为悬浮液包含在脂质中,包含或与胶束复合,或以其他方式与脂质缔合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体相关组合物不限于溶液中的任何特定结构。例如,它们可能以双层结构、胶束或"折叠"结构存在。它们也可能只是穿插在溶液中,可能形成大小或形状不一致的聚合体。脂质是脂肪物质,可以是天然的或合成的脂质。例如,脂类包括天然存在于细胞质中的脂肪滴,以及含有长链脂肪烃及其衍生物的一类化合物,如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛。

[0312] 在一些实施方案中,所述转导或转染的宿主细胞(例如,CHO细胞)在引入本文所述的载体或分离的核酸后离体增殖。在一些实施方案中,所述转导或转染的宿主细胞(例如CHO细胞)被培养以增殖至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天或14天。在一些实施方案中,进一步评估或筛选转导或转染的宿主细胞(例如CHO细胞) 以选择工程宿主细胞。

[0313] 不管用于将外源核酸引入宿主细胞的方法如何,为了确认宿主细胞中重组DNA序列的存在,可以进行各种测定。这种分析包括,例如,本领域技术人员熟知的"分子生物学"分析,如Southern和Northern印迹、RT-PCR和PCR;"生化"分析,如检测某一特定肽的存在或不存在,例如,通过免疫学手段(ELISA和Western印迹)或通过本文所述分析的鉴定试剂也落入本发明范围内。

[0314] 报告基因可用于鉴定潜在转染细胞和评估调控序列。一般说来,报告基因是指不存在于受体生物或组织中或由受体组织表达的基因,它编码一种多肽,这种多肽的表达表现为一些容易检测的特性,例如酶活性。在DNA导入受体细胞后的适当时间检测报告基因的表达。合适的报告基因可包括荧光素酶、β-半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌性碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因(例如,Ui-Tei等人.FEBS Letters479:79-82(2000))。合适的表达系统是众所周知的,可以使用已知的技术制备或商业获得。

[0315] i)培养宿主细胞

[0316] 用于生产本申请的修饰IL-2蛋白的宿主细胞可以在各种培养基中培养。市售培养基如Ham's F10(Sigma)、最小必需培养基(MEM)、(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)和Dulbecco的改良Eagle's培养基(DMEM)、Sigma)适合于宿主细胞的培养。培养基可以根据需要补充激素和/或其他生长因子(如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如庆大霉素™药物)、微量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)和葡萄糖或等效能源。也可以以本领域技术人员已知的适当浓度包括任何其他必要的补充剂。培养条件,例如温度、 pH等,是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些条件,对于普通技术人员来说是显而易见的。

[0317] j)蛋白纯化

[0318] 为了便于鉴定和纯化重组多肽,可以将编码表位标签或其它亲和结合序列的核酸序列插入或添加到编码序列的框架内,从而产生由所需多肽和适于结合的多肽组成的融合蛋白。融合蛋白可以首先通过亲和柱模拟含有融合蛋白的混合物来鉴定和纯化,所述亲和柱带有针对融合蛋白中的表位标签或其他结合序列的结合部分(例如抗体),从而在柱内结合融合蛋白。此后,可以通过用适当的溶液(例如酸)洗涤柱来回收融合蛋白,以释放结合的融合蛋白。重组多肽也可以通过裂解宿主细胞、分离多肽(例如,通过离子交换层析、亲和结合方法、疏水相互作用方法)来纯化,然后通过MALDI或western印迹进行鉴定,并收集多肽。这些和其他用于鉴定和纯化重组多肽的方法是本领域普通技术人员已知的。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白不是融合蛋白的形式。

[0319] 当使用重组技术时,蛋白可以在细胞内产生,在周质空间产生,或直接分泌到培养基中。如果蛋白是在细胞内产生的,宿主细胞或裂解片段的颗粒碎片,作为第一步去除,例如通过离心或超滤。简而言之,细胞糊在乙酸钠(pH3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF) 存在下解冻约30分钟。细胞碎片可通过离心除去。当蛋白被分泌到培养基中时,通常首先使用市售的蛋白浓缩过滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元浓缩来自这种表达系统的上清液。在上述任何步骤中可包括蛋白酶抑制剂如PMSF以抑制蛋白水解,并且可包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0320] 从细胞制备的蛋白组合物可以使用例如羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析、亲和层析或阳离子交换层析来纯化。蛋白A作为亲和配体的适用性取决于任何免疫球蛋白Fc域的种类和同种型。蛋白A可用于纯化IL-2-Fc融合蛋白。亲和配体附着的基质通常是琼脂糖,但也有其他基质。机械稳定的基质,如可控孔玻璃或聚苯乙烯-二乙烯基苯,比琼脂糖具有更快的流速和更短的处理时间。其它蛋白纯化技术,如离子交换柱上的分馏、乙醇沉淀、反相HPLC、硅胶层析、阴阳离子交换树脂上的肝素琼脂糖™层析(如聚天冬氨酸柱)、色谱聚焦、SDS-PAGE,根据要回收的蛋白,也可以使用硫酸铵沉淀

[0321] 在任何初步纯化步骤之后,包括修饰的IL-2蛋白和污染物的混合物可以使用pH在约 2.5-4.5之间的洗脱缓冲液进行低pH疏水相互作用色谱,优选在低盐浓度下进行(例如,约为0-0.25M的盐)。

[0322] PEG片段与工程化的Q残基的偶联

[0323] 一个方面,本申请提供了使用野生型(wt)或工程化谷氨酰胺转胺酶(TGase)制备本文描述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的方法。在一些实施方案中,经工程化的TGases(例如 WO2015191883中描述的任何经工程化的TGase)可以特异性地将PEG片段偶联到修饰的IL-2蛋白上的受体谷氨酰胺残基上,该受体谷氨酰胺残基两侧是糖基化位点。与先前认为带有两侧糖基化位点的谷氨酰胺残基无法被TGase所控制的观点相反,发明人惊奇地发现,通过利用特定的反应条件(例如TGase酶的特定浓度),野生型TGase还能够以位点特异性和化学计量方式将PEG片段结合到修饰的IL-2蛋白受体谷氨酰胺残基的两侧糖基化位点上。

[0324] 许多方法已经被用来将聚合物部分如PEG和相关聚合物连接到蛋白上发现的反应基团上。参见例如,美国专利,第4179337号;美国专利第4002531号;Abuchowski等,1981,载于“酶作为药物”,J.S.Holcerberg和J.Roberts,(编辑),第367-383页;Zalipsky,S.,1995年,生物偶联化学,6:150-165。讨论了PEG和其他聚合物修饰蛋白的用途。参见例如,Cheng,

T.-L.等人,1999年,生物偶联化学,10:520-528;Belcheva,N.等人,1999年,生物偶联化学,10:932-937;Bettinger,T.等人,1998年,生物偶联化学,9:842-846;Huang,S.-Y,等人,1998,生物偶联化学,9:612-617;Xu,B.等人,1998,Langmuir,13:2447-2456; Schwarz,J.B.等人,1999年,J.Amer.Chem.Soc.121:2662-2673;Reuter,J.D.等人,1999年,生物偶联化学,10:271-278;Chan,T.-H.等人,1997年,J.Org.Chem.,62:3500-3504。蛋白中典型的连接位点包括伯氨基,如赖氨酸残基或N端的连接位点;巯基,如半胱氨酸侧链上的连接位点;以及羧基,如谷氨酸或天冬氨酸残基或C端的连接位点。常见的连接位点是糖蛋白的糖残基、半胱氨酸或目标多肽的N端和赖氨酸。

[0325] 在一些实施例中,本文描述的方法涉及单个偶联步骤(参见,例如,图8)。例如,当偶联产率在约20-98%之间足以产生大量修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物时,这种方法特别适合。当修饰的IL-2蛋白供应充足,并且节省时间比获得高产量更重要时,一步法也很有用。

[0326] 在一些实施例中,该方法包括两个步骤(参见,例如图9)。首先,通过TGase将一个小分子柄与修饰的IL-2蛋白的工程化的Q残基偶联,产生一个中间体偶联物。随后,PEG 片段通过小分子手柄以共价或非共价方式与中间偶联物偶联。小分子手柄可以被专门设计以适应PEG片段的偶联。当修饰的IL-2蛋白和/或PEG片段的供应有限时,以及当PEG 片段诱导多肽聚集时,两步法特别有用。通过使用小分子手柄,第一个酶偶联步骤可以实现高的偶联产率。然后,第二个化学选择性偶联步骤只需要PEG片段:修饰的IL-2蛋白的反应物比例在约1.2-1.5之间。这可能获得比一步法更高的总偶联产率。

[0327] 因此,在一些实施方案中,提供了一种制备包括含有与PEG片段特异性结合的工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的方法,其中所述方法包括:在TGase(野生型或工程化TGase)存在下,在足以产生修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的条件下,使修饰IL-2蛋白与PEG片段接触,并且其中所述PEG片段通过所述工程化的Q残基与修饰IL-2蛋白结合。在一些实施例中,提供了一种制备包括含有特异性结合到PEG 片段的工程化的Q残基修饰的IL-2蛋白的IL-2蛋白-PEG偶联物的方法,其中所述方法包括:在TGase存在下,在足以生成所述修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的条件下,使包含多种修饰IL-2蛋白的组合物与所述PEG片段接触,其中所述组合物中至少有约30%(例如至少约40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或约100%中的任何一种)的修饰IL-2蛋白通过所述工程化的Q残基与所述PEG片段结合。在一些实施方案中,该方法还包括生成包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白(例如参见上述重组生产方法,也参见实施例1-2)。在一些实施例中,组合物中至少有约70%(例如至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或约100%中的任何一个) 的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG片段偶联(即,修饰IL-2蛋白中至少有一个工程化的Q残基与一个PEG片段偶联,或修饰IL-2蛋白中的每个工程化的Q残基与一个PEG片段结合,这样的PEG偶联修饰IL-2蛋白占修饰IL-2蛋白组合物总量的至少约 70%)。在一些实施方案中,修饰IL-2蛋白中至少有约20%(例如至少约30%、40%、50%、 60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或约100%中的任何一个)的工程化的Q残基分别与一个PEG片段偶联。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白内的所有工程化的Q残基均与一个PEG片段偶联。在一些实施方案中,组合物中修饰的IL-2蛋白是相同的。在一些实施方案中,组合物中的修饰IL-2蛋白是不同的,例如,包括本文所述的不同工程化的Q残基。在一些实施方案中,组合物中的修饰IL-2蛋白在

工程化的Q残基的不同位置被聚乙二醇化,例如,当修饰IL-2蛋白中存在多个工程化的 Q残基时。在一些实施方案中,组合物中的修饰IL-2蛋白在工程化的Q残基的相同位置被聚乙二醇化,例如,当修饰IL-2蛋白中有多个工程化的Q残基时,或者当修饰IL-2蛋白中只有一个工程化的Q残基时。在一些实施例中,在本文描述的方法中使用各种PEG 片段。因此,在一些实施方案中,通过本文所述方法获得的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物是均质的,例如,包含在相同工程化的Q残基处与相同PEG片段偶联的相同修饰IL-2蛋白。在一些实施例中,通过本文所述方法获得的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物是异质的,例如,包括未聚乙二醇化和聚乙二醇化的修饰IL-2,包括在不同Q残基处与相同PEG片段偶联的相同修饰IL-2蛋白,包括在不同Q残基处与不同PEG片段偶联的相同修饰IL-2蛋白,包括在相同Q残基处与不同PEG片段偶联的相同修饰IL-2蛋白,包括与相同PEG片段偶联的不同修饰IL-2蛋白,或包括与不同PEG片段偶联的不同修饰IL-2蛋白。在一些实施方案中,PEG片段包括-$NH_2$基团。在一些实施方案中,PEG片段是甲氧基-PEG-胺。在一些实施例中,PEG片段包括接头,例如,PEG片段是$NH_2$-接头-PEG。

[0328] 在一些实施例中,提供了一种制备包括含有特异性结合到PEG片段的工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的方法,其中所述PEG片段和所述工程化的Q残基通过小分子柄偶联,其中所述方法包括:a)在TGase(野生型或工程化的 TGase)存在下,在足以产生包含通过所述工程化的Q残基特异性偶联到所述小分子柄的修饰IL-2蛋白的中间偶联物的条件下,使所述修饰IL-2蛋白与所述小分子柄接触,以及 b)使所述中间偶联物与所述PEG片段接触,从而获得所述修饰IL-2-PEG偶联物,其中所述PEG片段通过所述小分子柄偶联。在一些实施例中,提供了一种制备包括含有特异性结合到PEG片段的工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的方法,其中所述PEG片段和所述工程化的Q残基通过小分子柄偶联,其中所述方法包括: a)在TGase(野生型或工程化的TGase)存在下,在足以产生包含与小分子柄特异性结合的修饰IL-2蛋白的中间体偶联物的条件下,使包含多种修饰IL-2蛋白的组合物与小分子柄接触,其中组合物中至少约30%(例如至少约40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、 90%、95%、96%、97%、98%或99%或约100%中的任何一种)的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与小分子柄结合,以及b)使中间体偶联物与PEG片段接触,从而获得修饰 IL-2-PEG偶联物,其中组合物中至少约30%(例如至少约40%、50%、60%、70%、75%、 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或约100%中的任何一种)的中间体偶联物通过小分子柄与PEG片段偶联。在一些实施方案中,该方法还包括生成包含工程化的 Q残基的修饰IL-2蛋白(例如参见上述重组生产方法,也参见实施例1-2)。在一些实施例中,该组合物中至少约70%(例如至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或约100%中的任何一个)的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与小分子柄结合 (即,修饰IL-2蛋白中的至少一个工程化的Q残基与一个小分子柄结合,或修饰IL-2蛋白中的每个工程化的Q残基与一个小分子柄结合,这样的小分子柄结合的修饰IL-2蛋白占修饰IL-2蛋白组合物总量的至少约70%)。在一些实施方案中,修饰IL-2蛋白内至少有约20%(例如至少约30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、 97%、98%或99%或约100%中的任何一个)的工程化的Q残基分别与一个小分子柄结合。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白内的所有工程化的Q残基均与一个小分子柄结合。在一些实施例中,所述组合物中至少有约70%(例如75%、80%、85%、90%、95%、

96％、97％、98％或99％或约100％中的至少约任何一种)的中间体偶联物通过小分子柄与PEG 片段结合(即,所述中间体偶联物中的至少一个小分子柄与一个PEG片段结合,或者所述中间体偶联物中的每个小分子柄与一个PEG片段结合,这样的PEG-小分子柄偶联修饰的IL-2蛋白占所述中间体偶联物组合物的至少约70％)。在一些实施方案中,中间体偶联物内至少有约20％(例如至少约30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％或约100％中的任一个)的小分子柄分别与一个PEG片段结合。在一些实施方案中,中间体偶联物内的所有小分子柄均与一个PEG片段偶联。在一些实施例中,组合物中的至少约50％(例如至少约60％、70％、80％、90％、95％、96％、 97％、98％,或99％,或约100％中的任何一个)的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与小分子柄和PEG片段偶联(即,修饰IL-2蛋白中的至少一个工程化的Q残基与一个小分子柄和PEG片段偶联,或者修饰IL-2蛋白中的每个工程化的Q残基与一个小分子柄和一个PEG片段偶联,这样的PEG-小分子柄-偶联的修饰IL-2蛋白占修饰IL-2蛋白组合物总量的至少约50％(例如至少约60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％或99％或约100％中的任何一个)。在一些实施方案中,修饰IL-2蛋白内至少有约20％(例如至少约 30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％或约100％中的任何一个)的工程化的Q残基分别与一个小分子柄和一个PEG部分偶联。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白内的所有工程化的Q残基均与一个小分子柄和一个 PEG片段偶联。在一些实施方案中,组合物中修饰的IL-2蛋白是相同的。在一些实施方案中,组合物中的修饰IL-2蛋白是不同的,例如,包括本文所述的不同工程化的Q残基。在一些实施方案中,组合物中的修饰IL-2蛋白在工程化的Q残基的不同位置被聚乙二醇化,例如,当修饰IL-2蛋白中存在多个工程化的Q残基时。在一些实施方案中,组合物中的修饰IL-2蛋白在工程化的Q残基的相同位置被聚乙二醇化,例如,当修饰IL-2蛋白中有多个工程化的Q残基时,或者当修饰IL-2蛋白中只有一个工程化的Q残基时。在一些实施例中,在本文描述的方法中使用各种PEG片段。在一些实施方案中,在本文描述的方法中使用各种小分子柄。因此,在一些实施方案中,通过本文所述方法获得的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物是均质的,例如,包含在相同工程化的Q残基处与相同PEG片段和相同小分子柄偶联的相同修饰IL-2蛋白。在一些实施例中,通过本文所述方法获得的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物是异质的,例如,包括未聚乙二醇化和聚乙二醇化的修饰IL-2,包括在不同Q残基处与相同PEG片段(和相同或不同的小分子柄)偶联的相同修饰IL-2蛋白,包括在不同Q残基处与不同PEG片段(和相同或不同的小分子柄)偶联的相同修饰IL-2 蛋白,包括在相同Q残基处与不同PEG片段(和相同或不同的小分子柄)偶联的相同修饰 IL-2蛋白,包括与相同PEG片段(和相同或不同的小分子柄)偶联的不同修饰IL-2蛋白,或包括与不同PEG片段(和相同或不同的小分子柄)偶联的不同修饰IL-2蛋白。在一些实施方案中,PEG片段包括-$NH_2$基团。在一些实施方案中,PEG片段是甲氧基-PEG-胺。在一些实施例中,PEG片段包括接头,例如,PEG片段是$NH_2$-接头-PEG。在一些实施方案中,小分子柄可以是这里描述的任何小分子柄(参见下面的“小分子柄”小节)。

[0329] 聚乙二醇部分可以改善多肽的药代动力学或生物学特性,如增加血清半衰期和生物活性,增强$AUC_{0-inf}$和/或延长体内半衰期。因此,本发明还提供了增加IL-2蛋白(例如,野生型IL-2,或本文描述的任何修饰的IL-2蛋白)循环半衰期(或总暴露$AUC_{0-INF}$)的方法)。在一些实施例中,提供了一种增加IL-2蛋白循环半衰期(或总暴露$AUC_{0-INF}$)的方法,包括: a)

将工程化的Q残基引入IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2阿地白介素)中,以产生包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白(例如本文所述的任何修饰IL-2蛋白);b)在TGase存在下,在足以产生修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的条件下,使修饰的IL-2蛋白与PEG片段接触,其中PEG片段通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白结合,并且其中PEG片段的长度与IL-2蛋白相比(或与不含PEG部分的相同修饰IL-2蛋白相比)足以增加循环半衰期(或总暴露$AUC_{0-inf}$)。在一些实施例中,提供了一种增加IL-2蛋白(例如,野生型IL-2 或IL-2阿地白介素)循环半衰期(或总暴露$AUC_{0-INF}$)的方法,包括:a)将工程化Q残基引入IL-2蛋白中,以生成包含多个包含工程化Q残基的修饰IL-2蛋白(例如本文所述的任何修饰IL-2蛋白)的组合物;b)在TGase存在下,在足以产生修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的条件下使组合物与PEG片段接触;其中组合物中至少有约30%(例如至少约40%、 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或约100%中的任何一种)修饰的IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG片段结合;并且其中PEG片段的长度与IL-2蛋白相比(或与不含PEG片段的相同修饰IL-2蛋白相比)足以增加循环半衰期(或总暴露$AUC_{0-inf}$)。在一些实施例中,组合物中至少有约70%(例如至少约75%、80%、 85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或约100%中的任何一个)的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG片段偶联(即,修饰IL-2蛋白中的至少一个工程化的Q残基与一个PEG片段偶联,或修饰IL-2蛋白中的每个工程化的Q残基与一个PEG片段结合,这样的PEG-偶联修饰IL-2蛋白至少约占修饰IL-2蛋白组合物总量的70%)。在一些实施方案中,PEG偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期比IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2 阿地白介素)长,和/或比不含PEG部分的相同修饰的IL-2蛋白约长至少1.5倍(例如至少约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍或更多)。在一些实施例中,PEG偶联修饰IL-2蛋白的循环半衰期约比IL-2蛋白长,和/或比不含 PEG片段的相同修饰IL-2蛋白长约1.5-2倍,约1.5-5倍,约3-20倍,约3-10倍,约4-18 倍,约5-16倍,约8-13倍,约8-20倍,约10-20倍,约15-20倍,约15-30倍,约10-15 倍,约6-18倍,约8-15倍,或约10-12倍。在一些实施方案中,本文描述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物具有约1小时-30小时的半衰期(例如消除半衰期或分布半衰期),例如约1 小时-10小时、约4小时-30小时、约5小时-20小时、约10小时-30小时、约8小时-25 小时、约2小时-10小时、约20小时-30小时或约10小时-20小时。在一些实施方案中,当单次静脉注射或单次皮下注射(例如,约2mg/kg)给药时,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物提供约1小时·μg/mL-500小时·μg/mL,如约1小时·μg/mL-50小时·μg/mL,约10小时·μg/mL-100小时·μg/mL,约5小时·μg/mL-20小时·μg/mL,约50小时·μg/mL-200小时·μg/mL,约100小时·μg/mL-500小时·μg/mL,或约100小时·μg/mL-300小时·μg/mL的 $AUC_{0-last}$或$AUC_{0-inf}$。在一些实施例中,修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的总暴露量($AUC_{0-last}$或$AUC_{0-inf}$)约比不含PEG片段的相同修饰IL-2蛋白和/或亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2 或IL-2阿地白介素)高至少1.5倍,例如至少约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、 9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、100倍。在一些实施例中,修饰IL-2蛋白-PEG偶联物总暴露量($AUC_{0-last}$或$AUC_{0-inf}$)约比不含PEG片段和/或亲本IL-2 蛋白(例如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)的相同修饰IL-2蛋白高1.5-5倍、约2-10倍、约5-20倍、约10-100倍、约20-50倍或约43倍。在一些实施方案中,修饰IL-2蛋白中至少有约20%(例如至少约30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、 96%、97%、98%或99%或约100%中的任何一个)的工程化的Q残基分别与一个PEG片段偶联。在一些实施方案中,修饰

的IL-2蛋白内的所有工程化的Q残基均与一个PEG片段偶联。在一些实施方案中,组合物中修饰的IL-2蛋白是相同的。在一些实施方案中,组合物中的修饰IL-2蛋白是不同的,例如,包括本文所述的不同工程化的Q残基。在一些实施方案中,组合物中的修饰IL-2蛋白在工程化的Q残基的不同位置与PEG片段偶联,例如,当修饰IL-2蛋白中存在多个工程化的Q残基时。在一些实施方案中,组合物中的修饰IL-2蛋白与工程化的Q残基在相同位置与PEG片段偶联,例如,当修饰IL-2蛋白中有多个工程化的Q残基时,或者当修饰IL-2蛋白中只有一个工程化的Q残基时。在一些实施例中,在本文描述的方法中使用各种PEG片段。因此,在一些实施方案中,通过本文所述方法获得的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物是均质的,例如,包含在相同工程化的Q 残基处与相同PEG片段偶联的相同修饰IL-2蛋白。在一些实施例中,通过本文所述方法获得的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物是异质的,例如,包括未聚乙二醇化和聚乙二醇化的修饰IL-2,包括在不同Q残基处与相同PEG片段偶联的相同修饰IL-2蛋白,包括在不同Q残基处与不同PEG片段分偶联的相同修饰IL-2蛋白,包括在相同Q残基处与不同PEG 片段偶联的相同修饰IL-2蛋白,包括与相同PEG片段偶联的不同修饰IL-2蛋白,或包括与不同PEG片段偶联的不同修饰IL-2蛋白。因此,对于本文所述的多种修饰IL-2蛋白的组合物,本文所述的方法增加PEG偶联修饰的IL-2蛋白中的循环半衰期(或总暴露 $AUC_{0-inf}$),而非没有PEG偶联修饰的IL-2蛋白中的循环半衰期(或总暴露$AUC_{0-inf}$)。在一些实施方案中,PEG片段包括-$NH_2$基团。在一些实施方案中,PEG片段是甲氧基-PEG- 胺。在一些实施例中,PEG片段包括接头,例如,PEG片段是$NH_2$-接头-PEG。

[0330] 在一些实施例中,提供了一种增加IL-2蛋白循环半衰期(或总暴露$AUC_{0-INF}$)的方法,包括:a)将工程化的Q残基引入IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2阿地白介素)中,以产生包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白(例如本文所述的任何修饰IL-2蛋白);b)在 TGase(野生型或工程TGase)存在下,在足以产生包含经工程化的Q残基特异性地与小分子柄结合的修饰IL-2蛋白的中间体偶联物的条件下,使修饰IL-2蛋白与小分子柄接触,以及c)使中间体偶联物与PEG片段接触,从而获得修饰IL-2-PEG偶联物,其中PEG片段通过小分子柄偶联,并且其中PEG片段的长度与IL-2蛋白相比(或与不含PEG片段的相同修饰IL-2蛋白相比)足以增加循环半衰期(或总暴露$AUC_{0-inf}$)。在一些实施例中,提供了一种增加IL-2蛋白的循环半衰期(或总暴露$AUC_{0-inf}$)的方法,包括:a)将工程化的Q 残基引入IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2阿地白介素)中,以生成包含多个包括工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白(例如本文所述的任何修饰IL-2蛋白)的组合物;b)在TGase(野生型或工程TGase)存在下,在足以产生中间体偶联物的条件下使组合物与小分子柄接触,所述中间体偶联物包含经工程化的Q残基特异性结合到小分子柄上的修饰IL-2蛋白,其中至少约30%(例如至少约40%,50%,60%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%, 97%,98%,或者99%,或约100%中的任何一种)组合物中的修饰IL-2蛋白通过工程化的 Q残基与小分子柄结合,和c)使包含所述中间体偶联物的组合物与PE片段接触,从而获得修饰的IL-2-PEG偶联物,其中所述PEG片段通过所述小分子柄结合,其中所述组合物中至少约30%(例如至少约40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、 97%、98%或99%或约100%中的任何一种)的中间体偶联物通过所述小分子柄与所述PEG 片段结合,并且其中所述PEG片段的长度与IL-2蛋白相比(或与不含PEG片段的相同修饰IL-2蛋白相比)足以增加循环半衰期(或总暴露量$AUC_{0-inf}$)。在一些实施例中,该组合物中至少约70%(例如至少约75%、80%、85%、90%、

95％、96％、97％、98％或99％或约100％中的任何一个)的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与小分子柄结合(即,修饰 IL-2蛋白中的至少一个工程化的Q残基与一个小分子柄结合,或修饰IL-2蛋白中的每个工程化的Q残基与一个小分子柄结合,这样的小分子柄结合的修饰IL-2蛋白占修饰IL-2 蛋白组合物总量的至少约70％)。在一些实施方案中,修饰IL-2蛋白内至少约20％(例如至少约30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％或约100％中的任何一个)的工程化的Q残基分别与一个小分子柄结合。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白内的所有工程化的Q残基均与一个小分子柄结合。在一些实施例中,所述组合物中至少约70％(例如75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％或约100％中的至少约任何一种)的中间体偶联物通过小分子柄与PEG片段结合(即,所述中间体偶联物中的至少一个小分子柄与一个PEG片段结合,或者所述中间体偶联物中的每个小分子柄与一个PEG片段结合,这样的PEG-小分子柄偶联修饰的IL-2蛋白至少约占所述中间体偶联物组合物的70％)。在一些实施方案中,中间体偶联物内至少有约20％(例如至少约30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、 97％、98％或99％或约100％中的任一个)的小分子柄分别与一个PEG片段结合。在一些实施方案中,中间体偶联物内的所有小分子柄均与一个PEG片段偶联。在一些实施例中,组合物中至少有约50％(例如至少约60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、 97％、98％,或99％,或约100％中的任何一个)的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与小分子柄和PEG片段偶联(即,修饰IL-2蛋白中的至少一个工程化的Q残基与一个小分子柄和PEG片段偶联,或者修饰IL-2蛋白中的每个工程化的Q残基与一个小分子柄和一个PEG片段偶联,这样的PEG-小分子柄-偶联的修饰IL-2蛋白至少约占修饰IL-2蛋白组合物总量的50％)。在一些实施方案中,修饰IL-2蛋白内至少有约20％(例如至少约30％、 40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％或约 100％中的任何一个)的工程化的Q残基分别与一个小分子柄和一个PEG片段偶联。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白内的所有工程化的Q残基均与一个小分子柄和一个PEG 部分偶联。在一些实施例中,组合物中至少有约70％(例如至少约75％,80％,85％,90％, 95％,96％,97％,98％,或99％或约100％中的任何一个)的修饰IL-2蛋白通过工程化的 Q残基与PEG片段和小分子柄偶联(即,修饰IL-2蛋白中的至少一个工程化的Q残基与一个PEG片段和一个小分子柄偶联,或修饰IL-2蛋白中的每个工程化的Q残基与一个 PEG片段和一个小分子柄偶联,这样的PEG-偶联的修饰IL-2蛋白占总修饰IL-2蛋白组合物的至少约70％)。在一些实施方案中,PEG偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期比IL-2 蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2阿地白介素)长,和/或比不含PEG片段的相同修饰的IL-2 蛋白长至少约1.5倍(例如至少约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、 15倍、20倍、30倍或更多)。在一些实施例中,PEG偶联修饰IL-2蛋白的循环半衰期比 IL-2蛋白长,和/或比不含PEG片段的相同修饰IL-2蛋白长约1.5-2倍,约1.5-5倍,约 3-20倍,约3-10倍,约4-18倍,约5-16倍,约8-13倍,约8-20倍,约1-20倍,约15-20 倍,约15-30倍,约10-15倍,约6-18倍,约8-15倍,或约10-12倍。在一些实施方案中,本文描述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物具有约1小时至约30小时的半衰期(例如消除半衰期或分布半衰期),例如约1小时-10小时、约4小时-30小时、约5小时-20小时、约10小时-30小时、约8小时-25小时、约2小-10小时、约20小时-30小时或约10小-20 小时。在一些实施方案中,当单次静脉注射或单次皮下注射(例如,约2mg/kg)给药时,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物提供约1小时·μg/mL-500小

时·μg/mL,如约1小时·μg/mL-50 小时·μg/mL,约10小时·μg/mL-100小时·μg/mL,约5小时·μg/m-20小时·μg/mL,约50 小时·μg/mL-200小时·μg/mL,约100小时·μg/mL-500小时·μg/mL,或约100小时·μg/mL-300小时·μg/mL的$AUC_{0-last}$或$AUC_{0-inf}$。在一些实施例中,修饰IL-2蛋白-PEG 偶联物的总暴露量($AUC_{0-last}$或$AUC_{0-inf}$)至少比不含PEG片段的相同修饰IL-2蛋白和/或亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)高约1.5倍,例如至少约2倍、3倍、 4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、 100倍。在一些实施例中,修饰IL-2蛋白-PEG偶联物总暴露量(AUC0-last或AUC0-inf) 比不含PEG片段和/或亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)的相同修饰IL-2 蛋白高约1.5-5倍、约2-10倍、约5-20倍、约10-100倍、约20-50倍或约43倍。在一些实施方案中,组合物中修饰的IL-2蛋白是相同的。在一些实施方案中,组合物中的修饰 IL-2蛋白是不同的,例如,包括本文所述的不同工程化的Q残基。在一些实施方案中,组合物中的修饰IL-2蛋白在工程化的Q残基的不同位置被聚乙二醇化,例如,当修饰IL-2 蛋白中存在多个工程化的Q残基时。在一些实施方案中,组合物中的修饰IL-2蛋白在工程化的Q残基的相同位置被聚乙二醇化,例如,当修饰IL-2蛋白中有多个工程化的Q残基时,或者当修饰IL-2蛋白中只有一个工程化的Q残基时。在一些实施例中,在本文描述的方法中使用各种PEG片段。在一些实施方案中,在本文描述的方法中使用各种小分子柄。因此,在一些实施方案中,通过本文所述方法获得的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物是均质的,例如,包含在相同工程化的Q残基处与相同PEG片段和相同小分子柄偶联的相同修饰IL-2蛋白。在一些实施例中,通过本文所述方法获得的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物是异质的,例如,包括未聚乙二醇化和聚乙二醇化的修饰IL-2,包括在不同Q残基处与相同PEG片段(和相同或不同的小分子柄)偶联的相同修饰IL-2蛋白,包括在不同Q残基处与不同PEG片段(和相同或不同的小分子柄)偶联的相同修饰IL-2蛋白,包括在相同 Q残基处与不同PEG片段(和相同或不同的小分子柄)偶联的相同修饰IL-2蛋白,包括与相同PEG片段(和相同或不同的小分子柄)偶联的不同修饰IL-2蛋白,或包括与不同PEG 片段(和相同或不同的小分子柄)偶联的不同修饰IL-2蛋白。在一些实施方案中,PEG部分包括-$NH_2$基团。在一些实施方案中,PEG片段是甲氧基-PEG-胺。在一些实施例中, PEG片段包括接头,例如,PEG片段是$NH_2$-接头-PEG。在一些实施方案中,小分子柄可以是这里描述的任何小分子柄(参见下面的“小分子柄”小节)。

[0331] TGase催化的反应可以进行几个小时到一天(例如过夜)。允许PEG片段和/或小分子柄与包含浓度在约400-600mol/L之间的工程化的Q残基的修饰的IL-2蛋白(例如,1 mg/mL)反应,提供比修饰的IL-2蛋白过量约2至约20倍的PEG片段(和/或小分子柄),或任选地较低过量的PEG片段(和/或小分子柄),例如约3-10倍,或约10-20倍。反应可在10-37℃的无钾磷酸盐缓冲盐(PBS;pH 8)中进行。1小时到几天后,达到稳态条件。然后使用常规方法,例如色谱,例如HPLC除去多余的蛋白、PEG片段和TGase。反应可以用HPLC监测。

[0332] 所得到的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物可以用任何合适的方法进行分析。例如,可以使用自上而下的方法通过液相色谱质谱(LC/MS)来表征偶联多肽的化学计量,以便评估与修饰的IL-2蛋白偶联的PEG片段和/或小分子柄的数量,特别是组合物的均匀性。在LC/MS分析前可以还原偶联物。胰蛋白酶消化和/或Glu-C消化的肽图谱分析可用于检测蛋白的一级结构。聚乙二醇化和/或聚乙二醇负载的位置可以通过比较来自已消化聚乙二醇化样品和未消化聚乙二醇化样品(例如,胰蛋白酶消化或Glu-C消化)的肽的信号强度来确定,其原

理是,添加聚乙二醇偶联物改变了肽的质荷比和保留时间,导致在保留时间信号的强度更低或丢失。因此,与未聚乙二醇化蛋白的肽图谱相比,聚乙二醇化蛋白的肽图谱中信号强度较低或丢失的肽是聚乙二醇化肽。通过比较在胰蛋白酶消化和/或Glu-C消化中鉴定的聚乙二醇化肽,可以发现和确定聚乙二醇化的位置和/或聚乙二醇负载量。通过提取的离子色谱、MS1和/或MS/MS谱进一步研究,以验证准确的聚乙二醇化位点和聚乙二醇负载量。示例性方法参见实施例9。

[0333] 在一些实施方案中,分析产物的PEG负载(例如,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物中PEG片段的数目)。在一些实施方案中,分析产物的小分子柄负载(例如,中间偶联物中小分子柄的数量)。这些方法可用于确定每个修饰IL-2蛋白的PEG片段(和/或小分子柄)的平均数目以及组合物中每个修饰IL-2蛋白的PEG片段(和/或小分子柄)数目的分布,即具有任何给定水平的PEG负载(和/或小分子柄负载)的修饰IL-2蛋白总量的百分比。可以确定具有数量(n)个工程化Q残基(例如n=1、2、3、4、5、6等)的修饰IL-2蛋白的部分。一种适用于这种测定和更一般的PEG负载技术是疏水相互作用色谱(HIC),HIC可以如Hamblett 等人.(2004)癌症研究,10:7063-7070;Wakankar等人.(2011)mAbs 3(2):161-172;和Lyon 等人.(2012)Methods in Enzymology,502卷:123-138所描述的事例进行,其公开内容通过引用并入本文。

[0334] 在PEG偶联反应中,TGase和修饰的IL-2蛋白之间的摩尔比可以被控制以允许有效的转谷氨酰胺反应。例如,在一些实施方案中,TGase和修饰的IL-2蛋白的摩尔比为约 1:10至约1:800,例如约1:10至约1:500、约1:50至约1:300、约1:100至约1:800、约1:100 至约1:500、约1:200至约1:700、或约1:10至约1:100中的任一种。

[0335] 可以控制反应混合物中谷氨酰胺转胺酶的量以允许有效的谷氨酰胺转胺酶反应,例如 PEG偶联或小分子柄偶联。例如,在一些实施方案中,反应混合物中谷氨酰胺转胺酶的浓度为约0.001mg/ml至约1mg/ml,例如约0.001mg/ml至约0.01mg/ml、约0.01mg/ml至约0.1mg/ml、约0.005mg/ml至约0.5mg/ml、约0.01mg/ml至约0.3mg/ml、约0.001mg/ml 至约0.1mg/ml、约0.003mg/ml至约1mg/ml、或约0.1mg/ml至约1mg/ml中的任一种。

[0336] 在一些实施方案中,PEG片段(和/或小分子柄)与修饰IL-2蛋白之间的浓度比为约2: 1至约100:1,包括但不限于约2:1至约1:1、约1:1至约100:1、约5:1至约80:1、约 10:1至约100:1、约10:1至约50:1、约1:1至约10:1、约20:1至约80:1、或约40: 1至约60:1中的任一种。

[0337] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白和PEG片段(和/或小分子柄)的偶联效率为至少约20%(例如约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或约100%中的任何一个)。如本文所用,术语“偶联效率”或“交联效率”是实验测得的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物量除以最大预期修饰IL-2蛋白-PEG偶联物量之间的比值,或实验测得的包含小分子柄的中间偶联物量除以包含小分子柄量的最大预期中间偶联物量之间的比值。术语“聚乙二醇化效力”是实验测量的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物量除以最大预期修饰IL-2蛋白-PEG偶联物量之间的比率。偶联效率、聚乙二醇化效率或交联效率可以通过本领域技术人员熟知的各种技术来测量,例如疏水相互作用色谱。聚乙二醇化效率也可以在不同温度下测量,如室温或37℃。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白和小分子柄的偶联效力至少约为20%-25%、25%-30%、30%-35%、35%-40%、45%-50%、50%-55%、56%-

60％、61％-65％、66％-70％、71％-75％、76％-80％、81％-85％、86％-90％、 91％-95％或96％-99％中的任何一个。在一些实施方案中,包含小分子柄和PEG部分的中间体偶联物的偶联效力至少约为20％-25％、25％-30％、30％-35％、35％-40％、45％-50％、 50％-55％、56％-60％、61％-65％、66％-70％、71％-75％、76％-80％、81％-85％、86％-90％、 91％-95％或96％-99％中的任何一个。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白和PEG部分的聚乙二醇化效力至少约为20％-25％、25％-30％、30％-35％、35％-40％、45％-50％、50％-55％、56％-60％、61％-65％、66％-70％、71％-75％、76％-80％、81％-85％、86％-90％、91％-95％或96％-99％中的任何一个。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白和PEG片段的偶联效率至少约为25％、30％、32％、34％、36％、38％、40％、42％、44％、46％、48％、50％、 55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或99％中的任何一个。

[0338] 小分子柄

[0339] 本文所述的小分子柄通常具有-$NH_2$-R的结构,其中R是允许连接PEG片段的部分。在本文所述方法中引入小分子柄显着增加了方法的灵活性。具体地说,小分子柄的结构可以适合于任何期望的PEG片段的连接。例如,在一些实施方案中,R是与结合伙伴特异性结合的配体。这允许连接包含结合伙伴的任何PEG片段。合适的配体/结合伙伴对包括但不限于抗体/抗原、抗原/抗体、亲和素/生物素、生物素/亲和素、链亲和素/生物素、生物素/链亲和素、谷胱甘肽/GST、GST/谷胱甘肽、麦芽糖结合蛋白/直链淀粉、直链淀粉/ 麦芽糖结合蛋白、纤维素结合蛋白和纤维素、纤维素/纤维素结合蛋白等。当如本文所述进行两步偶联方法时,PEG片段包含接头和PEG分子,其中接头是小分子柄内R配体的结合伙伴。

[0340] 本文描述的其他合适的小分子柄包括但不限于,$NH_2$-$CH_2$-CH(OH)-$CH_2$-$NH_2$, $NH_2$-R-$(OR')_2$,$NH_2$-R=O,$NH_2$-R-SH,$NH_2$-R-叠氮。这些小分子柄允许通过合适的接头如 $NH_2$-O-R-PEG、马来酰亚胺-R-PEG和环辛炔-R-$(R'-PEG)_2$,其中R和R'是独立的连接基团,例如包含烷基的连接基团。

[0341] 转谷氨酰胺酶(TGase)

[0342] 转谷氨酰胺酶(TGase)通过转谷氨酰胺化将具有胺供体基团的部分(如PEG片段或含有伯胺或赖氨酸供体残基的小分子柄)转移到受体谷氨酰胺残基(如修饰IL-2蛋白的工程化的Q残基),从而在胺供体基团和受体Q残基之间形成共价蛋白交联,并伴随氨的释放。在含谷氨酰胺的第一底物(受体或Q底物)与酶结合后,与TGase活性中心的半胱氨酸残基形成γ-谷氨酰硫酯,称为酰基酶中间体,并伴有氨的释放。然后第二个底物(供体或K底物)与酰基酶中间体结合并攻击硫酯键。产物(两个蛋白通过一个Nepsilon(γ-谷氨酰)赖氨酸异肽桥交联)形成并释放。这将酶的活性中心Cys残基以其原始形式重新建立,并允许它参与另一个催化循环。共价酰基酶中间体的形成被认为是这些反应的限速步骤。许多谷氨酰胺转胺酶的催化三联体是木瓜蛋白酶样的,含有Cys-His-Asp(其中His是组氨酸,Asp 是天冬氨酸),并且至关重要的是一个位于活性中心半胱氨酸36个残基的色氨酸(Trp)残基。相比之下,从Streptoverticillium sp(见上文)中分离的细菌TGase具有非典型催化三联体,并且与其他TGase的木瓜蛋白酶样催化三联体没有序列同源性。WO2015191883 中描述的任何TGase都可以用于本发明,其内容通过引用全部并入本文。

[0343] 几种类型的谷氨酰胺转胺酶已在各种生物体内被报道,包括微生物。例如来自豚鼠肝脏(GTGase)、鱼肝脏(FTGase)和微生物(mTGase)的TGase和任何重组TGase(rTGase)。

根据本发明,除了这里列出的之外,还可以使用其他TGase。有用的TGase的实例包括微生物谷氨酰胺转胺酶,例如来自在美国专利第5,156,956号中披露的莫巴兰链霉菌

[0344] (Streptomyces mobaraense),肉桂链霉菌(Streptomyces cinnamoneum)和灰泥链霉菌 (Streptomyces griseocarneum),和在美国专利第5,252,469号中披露的淡黄色链霉菌(Streptomyces lavendulae),和公开于JP2003199569的拉达卡链霉菌(Streptomyces ladakanum)。其它有用的微生物谷氨酰胺转胺酶已从枯草芽孢杆菌(在美国专利第 5,731,183中披露)和各种粘菌中分离。有用的微生物谷氨酰胺转胺酶的其他例子是在WO 96/06931(例如,来自利迪克芽孢杆菌(Bacilus lydicus))和WO 96/22366中公开的那些。有用的非微生物转谷氨酰胺酶包括豚鼠肝转谷氨酰胺酶和来自各种海洋来源的转谷氨酰胺酶,如比目鱼大白鲔(公开于EP-0555649)和日本牡蛎长牡蛎(公开于美国专利第5,736,356号)。一种典型的TGase是细菌转谷氨酰胺酶(BTG)(参见,例如EC2.3.2.13,蛋白-谷氨酰胺-γ-谷氨酰转移酶)。在另一示例性实施例中,TGase来自S.mobaraense。在另一个实施方案中,TGase是与天然TGase具有至少80％序列同源性的突变(例如,工程)TGase。一个例子是重组细菌谷氨酰胺转胺酶莫巴拉链霉菌(Streptomyces mobaraensis)(可从德国达姆施塔特Zedira获得)。

[0345] 拉达卡链霉菌(Streptomyces ladakanum)ATCC 27441或NRRL3191 mTGase表达为Pre-Pro-mTgase(GenBank访问号AY241675)。pre-pro-mTGase有410个氨基酸残基,成熟酶有331个氨基酸残基,加上pre的30个和pro的49个。前肽是成熟酶的强抑制剂。根据AY241675设计的引物用于将来自ATCC 27441DNA的pro-mTgase和成熟mTgase 克隆到pET29b(+)载体的NdeI和XhoI位点。活性mTgase可以通过Pro-mTgase的肠激酶轻链(EKL)消化或成熟mTgase的复性获得。来自Strep Ladakanum(TG_SL)的mTgase 与来自Strep.mobaraensis(TG_SM,由Ajinomoto作为ACTIVA出售®)有一些氨基酸差异。

[0346] 本文所述方法中使用的谷氨酰胺转胺酶可以从多种来源获得或制备。在一些实施方案中,谷氨酰胺转胺酶是钙依赖性的谷氨酰胺转胺酶,它需要钙来诱导酶构象变化并赋予酶活性。例如,谷氨酰胺转胺酶可以从豚鼠肝脏中提取并通过商业来源(例如, Sigma-Aldrich(密苏里州圣路易斯)和MP Biomedicals(加州尔湾))获得。在一些实施方案中,谷氨酰胺转胺酶是钙不依赖的谷氨酰胺转胺酶,它不需要钙来诱导酶构象变化并赋予酶活性。在一些实施方案中,转谷氨酰胺酶是源自微生物基因组的微生物转谷氨酰胺酶,例如来自链轮丝菌属(Streptoverticillium)或链霉菌属(例如,莫巴链霉菌(Streptomyces mobarensis)或莫巴链轮丝菌(Streptoverticillium mobarensis))的转谷氨酰胺酶。在一些实施方案中,谷氨酰胺转胺酶是哺乳动物蛋白(例如,人谷氨酰胺转胺酶)、细菌蛋白、植物蛋白、真菌蛋白(例如,卵菌纲和放线菌纲转谷氨酰胺酶),或原核蛋白。在一些实施方案中,谷氨酰胺转胺酶来自微球菌,梭状芽孢杆菌、土霉属、根霉属、红曲霉属或芽孢杆菌属。

[0347] 合适的TGase包括但不限于细菌转谷氨酰胺酶(BTG),例如具有EC参考EC 2.3.2.13 的酶(蛋白-谷氨酰胺-γ-谷氨酰转移酶)。在一些实施例中,TGase来自拉达卡链霉菌 (TG_SL,SEQ ID NO:20)。在一些实施例中,TGase来自莫巴拉链霉菌(TG_SM,SEQ ID NO:22)。在一些实施方案中,TGase是基于来自拉达卡链霉菌(TG_SL,SEQ ID NO: 21)TGase的重组蛋白TGase。

[0348] 在一些实施方案中,本文所述方法中使用的谷氨酰胺转胺酶是使用重组技术生产

的重组蛋白。

[0349] 在一些实施方案中,谷氨酰胺转胺酶是野生型的,例如具有SEQ ID NO:20的序列。在一些实施方案中,谷氨酰胺转胺酶是重组野生型TGase,包括具有SEQ ID NO:20的序列,其中所述重组野生型TGase还包括在N-末端的附加脯氨酸和任选的纯化标签(例如多组氨酸标签)。在一些实施方案中,谷氨酰胺转胺酶是重组野生型,具有SEQ ID NO:21 的序列。与本领域的一般理解相反,野生型谷氨酰胺转胺酶不能催化与糖基化位点侧边的受体谷氨酰胺的转谷氨酰胺反应,令人惊讶地发现,在本文所述的某些条件下,这种反应可以以实质性的有效性和特异性进行。

[0350] 在一些实施方案中,谷氨酰胺转胺酶是纯化的蛋白。例如,在一些实施方案中,谷氨酰胺转胺酶的纯度至少约为50%。如本文所用,“纯的”或“纯化的”蛋白是指不含其他蛋白污染物的蛋白(例如,谷氨酰胺转胺酶)。在一些实施方案中,纯化的谷氨酰胺转胺酶的纯度至少约为55%-60%、60%-65%、65%-70%、70%-75%、75%-80%、80%-85%、85%-90%、 90%-95%、95%-98%或99%。在一些实施方案中,纯化的谷氨酰胺转胺酶至少约为50%、 55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中的任何一种纯度。在一些实施方案中,TGase具有至少约90%的纯度。

[0351] 在一些实施方案中,谷氨酰胺转胺酶被工程化。在一些实施方案中,TGase是专门设计用于对糖基化位点附近的受体谷氨酰胺进行转谷氨酰化反应的工程TGase。在一些实施方案中,所述工程TGase基于来自拉达卡链霉菌(SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21)的野生型TGase。在一些实施方案中,所述工程化TGase是基于来自莫巴拉链霉菌(TG_SL, SEQ ID NO:22)的野生型TGase。从拉达卡链霉菌中分离的TGase序列具有与来自莫巴拉链霉菌序列相同的氨基酸序列,除了两个序列之间共有22个氨基酸的差异(Yi-Sin Lin等,Process Biochemical 39(5),591-598(2004)。

[0352] 在一些实施方案中,所述工程化TGase至少包含与野生型TGase约80%(例如至少约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)同一性的氨基酸序列,例如野生型TGase 包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列,其中与包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的野生型TGase相比,转谷氨酰胺酶包含选自下组的缺失:D1-E4;P244-P247;和H279-H289。在一些实施方案中,工程化的转谷氨酰胺酶包含与SEQ ID NO:20 100%相同的氨基酸序列,除了一个或多个选自下组的缺失:D1-E4;P244-P247;和H279-H289。

[0353] 在一些实施方案中,工程化转谷氨酰胺酶至少包含与SEQ ID NO:21约80%(例如至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、 94%、95%、96%、97%、98%或99%)同一性的氨基酸序列,其中转谷氨酰胺酶包含选自下组的缺失:P1-E5;P245-P248;和H280-H290。在一些实施方案中,工程化转谷氨酰胺酶包含与SEQ ID NO:21100%相同的氨基酸序列,除了一个或多个选自下组的缺失: P1-E5;P245-P248;和H280-H290。

[0354] 在一些实施方案中,工程化转谷氨酰胺酶至少包含与SEQ ID NO:20约80%(例如至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、 94%、95%、96%、97%、98%或99%)同一性的氨基酸序列,其中转谷氨酰胺酶包含选自下组的突变:D1-E4的缺失;P244-P247的缺失;N282-L285的缺失;用G取代 H279-A287;用G取代A280-H289;或其组合。在一些实施方案中,工程化转谷氨酰胺酶包含与SEQ ID NO:20具有100%

同一性的氨基酸序列,除了一个或多个选自下组的突变:D1-E4的缺失;P244-P247的缺失;N282-L285的缺失;用G取代H279-A287;用G取代A280-H289;或其组合。

[0355] 在一些实施方案中,工程化转谷氨酰胺酶至少包含与SEQ ID NO:21约80%(例如至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)同一性的氨基酸序列,其中转谷氨酰胺酶包含选自下组的突变:P1-E5的缺失;P245-P248的缺失;N283-L286的缺失;用G取代H280-A288;用G取代A281-H290;或其组合。在一些实施方案中,工程化转谷氨酰胺酶包含与SEQ ID NO:21具有100%同一性的氨基酸序列,除了一个或多个选自由下组的突变:P1-E5的缺失;P245-P248的缺失;N283-L286的缺失;用G取代H280-A288;用G取代A281-H290;或其组合。

[0356] 术语"序列同一性"或"标识性"在此处可互换使用,是指肽之间的序列相关性程度,由两个或多个氨基酸残基的字符串之间的匹配数决定。序列同一性可以被测量,例如通过特定数学模型或计算机程序(即"算法")处理的缺口比对(如果有的话)两个或多个序列中较小者之间的相同匹配的百分比。设计了一些确定同一性的方法,以给出被测序列之间的最大匹配。在公开可用的计算机程序中描述了确定同一性的方法。确定两个序列之间同一性的示例性计算机程序方法包括GCG程序包,包括GAP(Devereux等,Nucl.Acid.Res.12,387 (1984);遗传学计算机组,威斯康星大学,麦迪逊,威斯康星),BLASTP,BLASTN和FASTA(Altschul等,J.Mol.Biol.215,403-410(1990))。BLASTX程序可从国家生物技术信息中心(NCBI)和其他来源公开获得(BLAST手册,Altschul等NCB/NLM/NIH贝塞斯达,马里兰州20894;Altschul等人,同上)。著名的Smith Waterman算法也可以用来确定同一性。

[0357] 在一些实施方案中,所述工程谷氨酰胺转胺酶具有比SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21编码的TGase更高的谷氨酰胺转胺酶活性。在一些实施方案中,在相同的反应条件下,本文所述的工程化TGase的偶联至少比野生型谷氨酰胺转胺酶的活性高约10%。在一些实施方案中,所述工程化谷氨酰胺转胺酶的特异性活性至少比野生型TGase(如SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:22所示的TGase)高约1.25×、1.5×、2.0×、2.5×、3.0×、3.5×、4.0×、4.5×、5.0×、5.5×、6.0×、7.0×、7.5×、8.0×、8.5×、9.0×、9.5×或10.5×。

[0358] 在一些实施方案中,本发明的工程化TGase显示的活性超过具有SEQ ID NO.20所示氨基酸序列的S.ladakanum的TGase的活性30%、例如超过50%、例如超过70%、例如超过90%。

[0359] 在一些实施方案中,TGase是微生物TGase(mTGase)。在一些实施方案中,TGase是野生型TGase。在一些实施方案中,野生型TGase具有SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,TGase是能够在Q残基进行转谷氨酰胺化反应的工程化TGase。在一些实施方案中,所述工程化TGase包含一个氨基酸序列,该序列与SEQ ID NO:20 至少具有80%的同一性。在一些实施方案中,TGase具有至少约90%的纯度。

[0360] IV.药物组合物

[0361] 本申请还提供了药物组合物,包括本文所述的任何一种修饰的IL-2蛋白,或本文所述的任何一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物;和可选的药学上可接受的载体。

[0362] 在一些实施方案中,提供了一种药物组合物,其包含本文所述的任何修饰的IL-2蛋白和任选的药学上可接受的载体(以下也称为"修饰的IL-2蛋白药物组合物")。在一些实施方案中,药物组合物中修饰的IL-2蛋白是相同的。在一些实施方案中,药物组合物中的修

饰IL-2蛋白是不同的,例如,具有不同的工程化的Q残基(例如,插入、置换)、不同含量的工程化的Q残基。在一些实施方案中,药物组合物不包括未修饰的IL-2蛋白,即所有IL-2蛋白都带有工程化的Q残基。在一些实施方案中,药物组合物包含一些含有工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白(例如约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、 98%、99%或100%中的任何一种)和一些没有工程化的Q残基的IL-2蛋白。

[0363] 在一些实施方案中,提供了一种药物组合物,该药物组合物包括本文所述的任何修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物和任选的药学上可接受的载体(以下也称为"修饰的IL-2蛋白-PEG 偶联物药物组合物")。在一些实施方案中,药物组合物中至少有约50%(例如至少约60%、 70%、80%、90%、95%或99%或100%中的任何一种)的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物包含一个通过工程化的Q残基与修饰IL-2蛋白偶联的PEG片段。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含两个或多个(例如两个)工程化的Q残基。在一些实施方案中,药物组合物中至少有约50%(例如至少约60%、70%、80%、90%、95%或99%或100%中的任何一种) 的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物包含两个或多个(例如两个)PEG片段,其中每个PEG片段结合到修饰IL-2蛋白的两个或多个(例如两个)工程化的Q残基中的一个。在一些实施方案中,药物组合物中至少有约50%(例如至少约60%、70%、80%、90%、95%或99%或100%中的任何一种)的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物包含与修饰IL-2蛋白的每个工程化的Q残基偶联的一个PEG片段。在一些实施方案中,包含修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的药物组合物包含不超过约30%(例如不超过约25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、 4%、3%、2%或1%中的任何一种)没有PEG偶联的修饰IL-2蛋白。在一些实施方案中,包含修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的药物组合物是均质的,即所有修饰的IL-2蛋白-PEG 偶联物包含与相同工程化的Q残基上的相同PEG片段偶联的相同修饰的IL-2蛋白。在一些实施方案中,包含修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的药物组合物是异质的,例如,包含与相同PEG片段偶联的不同修饰的IL-2蛋白,与不同PEG片段偶联的不同修饰的IL-2蛋白,与不同工程化的Q残基上相同PEG片段偶联的相同修饰的IL-2蛋白,或与不同PEG 片段偶联的相同修饰的IL-2蛋白。

[0364] 术语"药学上可接受的载体"在此用于描述除本发明化合物以外的任何成分。赋形剂的选择在很大程度上取决于给药方式、赋形剂对溶解度和稳定性的影响以及剂型的性质等因素。如本文所用,"药学上可接受的载体"包括生理相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。一些药学上可接受的赋形剂是水、生理盐水、磷酸缓冲生理盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等,以及它们的组合。在一些实施方案中,药物组合物中等渗剂包括但不限于糖、多元醇(例如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。药学上可接受的物质的其他实例包括但不限于润湿剂或少量辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,它们可提高本文所述的修饰IL-2蛋白或修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的货架期或有效性。

[0365] 可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所使用的剂量和浓度下对接受者无毒,其中包括缓冲剂、抗坏血酸、蛋氨酸、维生素E、焦亚硫酸钠等抗氧化剂;防腐剂、等渗剂、稳定剂、金属络合物(例如锌-蛋白配合物);螯合剂如EDTA和/或非离子表面活性剂。用缓冲液用将pH值控制在一个优化治疗效果的范围内,尤其是当稳定性依赖于pH值时。缓冲液的浓度范围优选为约50mM-250mM。适用于本发明的缓冲剂包括有机和无机酸及其盐。例如柠檬酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、草酸盐、乳酸盐、醋酸盐。此外,缓冲液可以包括组氨酸和三甲胺盐,如Tris。

[0366] 添加防腐剂以延缓微生物生长,并且其通常以约0.2%至约1.0%(w/v)的范围存在。适用于本发明的防腐剂包括十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲铵;苯扎氯铵卤化物(例如氯化物、溴化物、碘化物)、氯化苯甲铵;硫柳汞、苯酚、丁基或苯甲醇;烷基对羟基苯甲酸,如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇、3-戊醇和间甲酚。

[0367] 张力剂,有时被称为"稳定剂",将其用来调节或维持组合物中液体的张力。当与大的、带电的生物分子如蛋白和抗体一起使用时,它们通常被称为"稳定剂",因为它们可以与氨基酸侧链的带电基团相互作用,从而减少分子间和分子内相互作用的可能性。考虑到其它成分的相对量,张力剂可在重量的约0.1%至约25%之间,优选到约1%至约5%之间。优选的张力剂包括多羟基糖醇,优选三羟基或高级糖醇,如甘油、赤藓糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露醇。

[0368] 其他赋形剂包括具有下列一种或多种用途的药剂:(1)填充剂,(2)溶解增强剂,(3)稳定剂和(4)防止变性或粘附在容器壁上的试剂。这样的赋形剂包括:多元糖醇(上面列举的);丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等氨基酸;有机糖或糖醇,例如蔗糖、乳糖、乳糖醇、海藻糖、水苏糖、甘露糖、山梨糖、木糖、核糖、核糖醇、肌肌醇、肌肌醇、半乳糖、半乳糖醇、甘油、环醇(例如肌醇)、聚乙二醇;尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、巯基乙酸钠、硫代甘油、α-单硫代甘油、硫代硫酸钠等含硫还原剂;低分子量蛋白,如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或其他免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;单糖(例如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖;二糖(例如乳糖、麦芽糖、蔗糖);三糖,例如棉子糖;以及多糖,例如糊精或葡聚糖。

[0369] 非离子表面活性剂或洗涤剂(也称为"润湿剂")有助于溶解治疗剂以及保护治疗蛋白免受搅拌诱导聚集,这也允许配方暴露于剪切表面应力而不会导致活性治疗蛋白或抗体变性。非离子表面活性剂的存在范围约为0.05mg/ml-1.0mg/ml,优选约0.07mg/ml-0.2mg/ml。

[0370] 合适的非离子表面活性剂包括聚山梨醇酯(20、40、60、65、80等)、聚氧杂(184、188等)、PLURONIC®多元醇、TRITON®、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单醚(TWEEN®-20、TWEEN® -80等)、月桂醇400、聚氧乙烯40硬脂酸酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油10、50 和60,单硬脂酸甘油酯、蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。可使用的阴离子洗涤剂包括十二烷基硫酸钠、琥珀酸二辛酯磺酸钠和磺酸二辛酯钠。阳离子洗涤剂包括苯扎氯铵或苯甲氯铵。

[0371] 在一些实施方案中,本文所述的修饰的IL-2蛋白和修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物在给药到受试者时可以使用已知的技术例如PCT出版物WO98/52976和WO00/34317中所述的技术去免疫化以降低免疫原性。

[0372] 本文所述的药物组合物可以批量制备、包装或销售,作为单一单位剂量,或作为多个单一单位剂量。如本文所用,"单位剂量"是包含预定量活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于将给予受试者的活性成分的剂量或该剂量的一个方便的分数,例如,该剂量的一半或三分之一。本领域所接受的任何给药肽、蛋白或抗体的任一方法可适用于本文所述的修饰IL-2蛋白和修饰IL-2蛋白-PEG偶联物。

[0373] 为了使药物组合物用于体内给药,它们必须是无菌的。药物组合物可以通过无菌过滤膜过滤来使其无菌。本文的药物组合物通常置于具有无菌入口的容器中,例如静脉输

液袋或静脉注射液瓶,其塞子可被皮下注射针刺穿。

[0374] 在一些实施方案中描述的药物组合物适合于胃肠外给药。药物组合物的胃肠外给药包括任何给药途径,其特征是物理破坏受试者的组织,并通过组织中的破坏给药,因此通常导致直接给药进入血流、肌肉或内脏。例如,胃肠外给药包括但不限于通过注射组合物、通过手术切口施用组合物、通过组织穿透性非手术伤口施用组合物等来施用药物组合物。特别是,胃肠外给药包括但不限于皮下、腹腔内、肌肉内、胸骨内、静脉内、动脉内、鞘内、脑室内、尿道内、颅内、腔内注射或输注;和肾透析输液技术。在一些实施方案中,胃肠外给药是经静脉或皮下途径。

[0375] 适合于胃肠外给药的药物组合物的制剂可以以适合于单次快注给药或连续给药的形式制备、包装或销售。可注射制剂可以单位剂型制备、包装或销售,例如安瓿或含有防腐剂的多剂量容器。用于胃肠外给药的制剂包括但不限于悬浮液、溶液、含油或含水载体中的乳液、糊剂等。此类制剂可进一步包含一种或多种附加成分,包括但不限于悬浮剂、稳定剂或分散剂。在用于胃肠外给药的制剂的一个实施方案中,在对所述重组组合物进行胃肠外给药之前,将所述活性成分以干燥(即粉末或颗粒状)形式提供,以便与合适的载体(例如无菌无热原游离水)进行重构。胃肠外制剂还包括可能含有盐、碳水化合物和缓冲剂等辅料的水溶液优选pH为约3-9),但是,对于某些应用,它们可能更适合配制成为无菌非水溶液或干燥形式,以合适的载体(如无菌、无热原游离水)结合使用。示例性胃肠外给药形式包括无菌水溶液中的溶液或悬浮液,例如丙二醇或葡萄糖水溶液。如果需要,这种剂型可作适当的缓冲。其他有用的胃肠外给药制剂包括含有微晶形式或脂质体制剂中的活性成分的制剂。用于胃肠外给药的制剂可以被配制为立即释放和/或工程释放。工程释放制剂包括受控释放制剂、延迟释放制剂、持续释放制剂、脉冲释放制剂、靶向释放制剂和程序释放制剂。例如,在一个方面,可将本文所述的修饰IL-2蛋白或修饰IL-2蛋白-PEG 偶联物,根据需要在上述一种或多种成分的适当溶剂中加入所需数量,然后过滤消毒,从而制备无菌注射溶液。通常,分散体是通过将活性化合物加入到含有基本分散介质和上述所需其他成分的无菌载体中来制备的。对于制备无菌可注射溶液的无菌粉末,示例性的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其从其先前无菌过滤溶液中产生具有活性成分的粉末加上任何其他所需成分的粉末。溶液的适当流动性可以通过使用诸如卵磷脂的涂层、在分散的情况下通过保持所需的粒径以及通过使用表面活性剂来保持。可注射组合物的长期吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂来实现,例如单硬脂酸盐和明胶。

[0376] 可以制备缓释制剂。合适的缓释制剂实例包括含有拮抗剂的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质为成形制品形式,例如薄膜或微胶囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)或聚乙烯醇)、聚乳酸(美国专利第3773919号),L-谷氨酸和-L- 谷氨酸乙酯的共聚物,不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯,可降解的乳酸-乙醇酸共聚物,如 LUPRON Depot™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙利组成的可注射微球),以及聚 -D-(-)-3-羟基丁酸。

[0377] 示例性地,本文所述的修饰IL-2蛋白或修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的非限制性药物组合物是作为无菌水溶液的制剂,其pH范围为约5.0至约6.5,并包含约0.5毫克/毫升 20毫克/毫升本文所述的修饰IL-2蛋白或修饰IL-2蛋白-PEG偶联物,约1-100毫摩尔组氨酸缓冲液、约0.01毫克/毫升-10毫克/毫升聚山梨酸酯80、约100毫摩尔-400毫摩尔海藻糖和约

0.01毫摩尔-1.0毫摩尔EDTA脱水二钠。

[0378] 可以调整给药方案以提供最佳的期望反应。例如,可以单次快注给药一次,可以随时间给药几次,也可以根据治疗情况的紧急情况按比例减少或增加剂量。以剂量单位形式配制胃肠外组合物特别有利,以便给药方便,剂量均匀。如本文所使用的剂量单位形式是指适合作为待治疗患者/受试者的单一剂量的物理上离散的单位;每个单位含有预定量的活性化合物,经计算与所需的药物载体相关联产生所需的治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格通常由(a)PEG片段的独特特性和要达到的特定治疗或预防效果以及(b)IL-2技术在治疗个体敏感性的内在局限性,并直接取决于(a)PEG片段的独特特性和要达到的特定治疗或预防效果。

[0379] 根据本文提供的公开内容,本领域技术人员将认识到,剂量和给药方案是根据治疗领域中公知的方法来调整的。也就是说,正如给患者提供可检测的治疗效益而给药的时间要求,技术人员可以容易地确定最大耐受剂量,并且还可以确定为患者提供可检测的治疗效益的有效剂量。因此,虽然这里举例说明了某些剂量和给药方案,但这些实例绝不限制在实施本发明时可提供给患者的剂量和给药方案。

[0380] 需要注意的是,剂量值可以随着待缓解病情的类型和严重程度而变化,并且可以包括单剂量或多剂量。应进一步理解,对于任何特定的受试者,特定的给药方案应随着时间的推移根据个人的需要和给药或监督给药的人的专业判断而调整,并且本文所述的剂量范围仅是示例性的,并不旨在限制所要求保护的组合物的范围或实践。此外,本发明组合物的给药方案可以基于多种因素,包括疾病类型、年龄、体重、性别、患者的病情、病情的严重程度、给药途径和所使用的特定抗体。因此,给药方案可能变化很大,但可以使用常规的标准方法确定。例如,剂量可基于药代动力学或药效学参数进行调整,这些参数可包括临床效应,如毒性效应和/或实验室值。因此,本发明包括由本领域技术人员确定的患者内剂量增加。确定合适的剂量和方案在相关领域中是众所周知的,并且一旦提供了本文公开的教义,本领域技术人员将被理解为包括在内。

[0381] 本文所述的药物组合物还可以包含一种以上的活性化合物或试剂,该活性化合物或制剂是所治疗的特定适应症所必需的,并优选那些具有互补性活性且彼此不产生不利影响的化合物或试剂。或者,或者另外,所述组合物可以包括细胞毒剂、化疗剂、细胞因子、免疫抑制剂或生长抑制剂。这样的分子以适当的数量组合在一起,以达到预期目的。

[0382] 还可以将活性成分包裹在微胶囊中,例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊,其分别用于胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗乳液中。此类技术在《雷明顿药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)第18版中公开。

[0383] V.治疗方法

[0384] 本申请还提供治疗个体(例如人)疾病(例如癌症)的方法,包括向个体施用有效量的本文所述药物组合物或本文所述修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物(或修饰的IL-2蛋白)中的任何一种。在一些实施方案中,本文所述的治疗个体(例如人)疾病(例如癌症)的方法包括与亲本IL-2(例如,野生型IL-2蛋白,或IL-2阿地白介素)相比,优先刺激IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。在一些实施方案中,药物组合物是静脉、瘤内、腹膜内,或皮下给药。在一些实施方案中,药物组合物(例如,修饰的IL-2蛋白药物组合物或修饰的IL-2蛋白 -PEG偶联物

药物组合物)以约1μg/kg至约100μg/kg(例如,约1微克/千克至约50微克/千克)给药。在一些实施方案中,所述药物组合物每月给药一次、每3周给药一次、每2周给药一次、每周给药一次、每周给药两次、隔天给药一次或每天给药一次。在一些实施方案中,疾病是癌症,例如肾细胞癌、转移性黑色素瘤、急性髓系白血病(AML)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、乳腺癌或膀胱癌。

[0385] 因此,在一些实施方案中,还提供了一种在个体(例如,人)中治疗疾病(例如,癌症) 的方法,包括给个体施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包括(a)包含工程化的Q 残基的修饰IL-2蛋白;和(b)任选地药学上可接受的载体。在一些实施方案中,还提供了一种在个体(例如,人)中治疗疾病(例如,癌症)的方法,包括给个体施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包括(a)包含含有工程化的Q残基和PEG部分(例如,甲氧基-PEG- 胺)的修饰的IL-2蛋白的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中PEG片段通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联;和(b)任选的药学上可接受的载体。在一些实施方案中,还提供了一种在个体(例如人)中优先刺激IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基的方法,包括给个体施用有效量的药物组合物,该药物组合物包括(a)包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白;和(b)任选的药学上可接受的载体。在一些实施方案中,还提供了一种在个体(例如人)中优先刺激IL-2Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基的方法,包括给个体施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包括(a)包含含有工程化的Q残基和PEG片段(例如,甲氧基-PEG-胺)的修饰的IL-2蛋白的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中PEG片段通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联;和(b)任选的药学上可接受的载体。在一些实施方案中,所述药物组合物每月给药一次、每3周给药一次、每2周给药一次、每周给药一次、每周给药两次、隔天给药一次或每天给药一次。在一些实施方案中,疾病是癌症,例如肾细胞癌、转移性黑色素瘤、急性髓系白血病(AML)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、乳腺癌或膀胱癌。在一些实施方案中,药物组合物以约1μg/kg至约100μg/kg给药(例如约 1微克/千克至约50微克/千克)。在一些实施方案中,药物组合物经静脉、瘤内、腹腔内或皮下给药。在一些实施方案中,工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合域内。在一些实施方案中,工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合结构域之外约1至约3个氨基酸残基(例如1、2或3个氨基酸残基中的任何一个)之间。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含一个工程化的Q残基。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含两个或多个(例如两个)工程化的Q残基。在一些实施方案中,所述工程化的Q残基是(例如,来自)相对于亲本IL-2 蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2阿地白介素)的单个氨基酸突变(例如,插入、取代)的结果。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白(例如,IL-2阿地白介素)包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,单个氨基酸突变(例如,取代)选自下组:F43Q、R37Q、F41Q、K42Q、Y44Q、T36Q、M38Q、或其组合,其中氨基酸基位置相对于包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的亲本IL-2蛋白(例如,IL-2阿地白介素)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包含SEQ ID NOs:2和4-8所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,工程化的Q残基是适合于TGase反应的外源补丁序列的一部分。在一些实施方案中,外源补丁序列取代一部分亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2或IL-2阿地白介素)。在一些实施方案中,亲本IL-2蛋白包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,外源补丁序列选自LEEQAA(SEQ ID NO:9)、IFKQTY(SEQ ID NO:10)、PKEQKY(SEQ ID NO:11)、VIQGV(SEQ ID NO:12)、REEQFN(SEQ ID NO:13)、GLLQGA(SEQ ID NO: 14),或其组合。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白

包含SEQ ID NOs:3和15-19中任一所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白进一步包含一个或多个非工程化的Q残基的额外氨基酸突变。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2 或IL-2 Aldesleukin)相比,修饰的IL-2蛋白包括至少约95%(例如至少约96%、97%、98%、 99%或100%中的任何一种)同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,PEG片段是线性的。在一些实施例中,PEG片段是分枝的。在一些实施方案中,PEG片段的分子量约在10kDa 和40kDa之间,例如约20kDa、约30kDa或约40kDa。在一些实施方案中,PEG片段被选自羟基、烷氧基、取代的烷氧基、烯氧基、取代的烯氧基、炔氧基、取代的炔氧基、芳氧基和取代的芳氧基的封端部分所封端。在一些实施方案中,PEG片段是甲氧基-PEG- 胺。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物包括含有修饰的IL-2蛋白,该修饰的IL-2蛋白包括一个工程化的Q残基和一个PEG部分,其通过一个工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括两个或更多个工程化的Q残基,其中两个或更多个工程化的Q残基中的每一个都与一个PEG部分偶联。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白包括两个或更多个工程化的Q残基,其中两个或更多个工程化的Q残基中的至少一个与一个PEG部分偶联。在一些实施方案中,PEG片段的结合是通过TGase介导的,例如微生物TGase(mTGase)。在一些实施方案中,TGase是野生型TGase,例如包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。在一些实施例中,TGase是工程化的TGase。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:20相比,所述工程化TGase包含至少约80%(例如至少约85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%中的任何一种)同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,TGase具有至少约90%(例如至少约90%、91%、92%、 93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的纯度。在一些实施例中,修饰的IL-2 蛋白与IL-2Rα亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间结合$K_D$的约2-800倍(例如,约2-50倍、约400-500倍、约 476倍、约5-6倍、约38-39倍)。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间结合$K_D$的约1-30倍(例如,约1-10倍、约10-20倍、约16倍、约1.4倍或约6.7倍)。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rα亚基之间结合$K_D$的约10-2000 倍(例如,约10-50倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物不结合或不能被检测(例如,通过SPR)到结合IL-2Rα亚基。在一些实施例中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$与亲本IL-2蛋白(如野生型IL-2或IL-2阿地白介素)与 IL-2Rβ亚基之间结合$K_D$类似(例如等于),或为约1-30倍(例如,约1-10倍、或约8-11倍)。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$与未PEG 偶联的相同修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$类似(例如等于),或为约1-10 倍。在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$与未PEG偶联化的相同修饰的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$类似(例如等于),或为约1-10倍。

[0386] 在一些实施方案中,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T 细胞($T_c$,细胞毒性T淋巴细胞,或CTL),辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白 (例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白在激活Treg细胞的能力降低(例如约2-50倍或约2 15倍降低的能力)。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白 (例如野

生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白激活CTL或NK细胞的能力相似(例如相等)或降低约1至5倍。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2 Aldesleukin)相比,修饰的IL-2蛋白在CTL和/或NK细胞上具有与Treg细胞相似(例如相等)或优先的激活能力,例如与亲本IL-2蛋白(例如野生型 IL-2、人IL-2或IL-2 Aldesleukin)相比,其具有类似(例如相等)或约1至20倍(例如约1-10 倍)更高的能力来增加CTL与Treg的比率或NK细胞与Treg的比率。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如,野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白 -PEG偶联物激活Treg细胞的能力降低了约2至5000倍。在一些实施方案中,与亲本IL-2 蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物具有类似(例如等于)或降低约1至50倍的激活CTL或NK细胞的能力。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)相比,修饰的IL-2蛋白和 /或修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物优先激活IL-2 Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。在一些实施方案中,与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2 Aldesleukin)相比,修饰的IL-2 蛋白-PEG偶联物在CTL和/或NK细胞上具有与Treg细胞相似(例如相等)或优先的激活能力,例如与亲本IL-2蛋白(例如野生型IL-2、人IL-2或IL-2 Aldesleukin)相比,其具有类似(例如相等)或约1至约20倍(例如约1至约10倍)更高的能力来增加CTL与Treg的比率或NK细胞与Treg的比率。

[0387] 在一些实施方案中,本文所述的治疗癌症的方法具有以下一种或多种生物活性:(1) 杀死癌细胞;(2)抑制癌细胞增殖;(3)缩小肿瘤大小;(4)减轻癌症患者的一种或多种症状; (5)抑制肿瘤转移(例如转移到淋巴结、肺);(6)延长生存期;(7)延长癌症进展的时间;(8) 预防、抑制或降低癌症复发的可能性;和(9)与亲本IL-2(例如,野生型IL-2蛋白、人IL-2 或IL-2阿地白介素)相比,优先刺激IL-2 Rβ亚基而不是IL-2Rα亚基。在一些实施方案中,通过本文所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物(或修饰IL-2蛋白)或其药物组合物介导的杀死癌细胞的方法可达到至少约40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高的肿瘤细胞死亡率。在一些实施方案中,通过以下方法介导的减小肿瘤大小的方法,其中本文所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物(或修饰IL-2蛋白)或其药物组合物可减少肿瘤大小至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任何一个)。在一些实施方案中,通过本文所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物(或修饰IL-2蛋白) 或其药物组合物介导的抑制肿瘤转移(例如转移到淋巴结,肺)的方法可抑制至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任何一种)的转移。转移可以通过现有技术中的任何已知方法来评估,如血液测试、骨扫描、X线扫描、CT 扫描、PET扫描和活检。在一些实施方案中,通过本文所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物 (或修饰IL-2蛋白)或其药物组合物介导的延长个体(如人)生存期的方法可以延长个体的生存期至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18、或24个月或更长。在一些实施方案中,通过本文所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物(或修饰IL-2蛋白)或其药物组合物介导的延长癌症进展时间的方法可以延长癌症进展时间至少约1、2、3、4、5、6、7、 8、9、10、11、12、18、或12周或更长。在一些实施方案中,本文所述的修饰IL-2蛋白 -PEG偶联物(或修饰IL-2蛋白)或其药物组合物可以通过激活效应细胞(例如CD8+T细胞、 NK细胞)来增加、增强或刺激受试者的免疫反应或功能。在一些实施方案中,与给药本文所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物(或修饰IL-2蛋白)或其药物组合物前相比,个体中的 NK细胞/CD8+T细胞启动、激活、增殖、细胞因子释放和/或细胞溶解活性

的能力增加或增强。在一些实施方案中,治疗效果包括药物在个体中引起客观的临床反应。在一些实施方案中,治疗效果包括在个体中获得严格的临床反应(sCR)。在一些实施方案中,治疗效果包括在个体中引起疾病缓解(部分或完全)。在某些情况下,在个体接受药物组合物后不超过6个月、5个月、4个月、3个月、2个月、1个月或更短时间内获得临床缓解。在一些实施方案中,治疗效果包括防止癌症在个体中的复发或疾病进展。在一些实施方案中,至少在大约6个月、1年、2年、3年、4年、5年或更长时间内防止复发或疾病进展。在一些实施方案中,治疗效果包括抑制实体肿瘤或淋巴肿瘤的生长或减小其大小。

[0388] 本文所述方法适用于治疗各种癌症,包括实体癌和液体癌。这些方法适用于所有阶段的癌症,包括早期、晚期和转移癌。本文描述的方法可以在辅助设置或新辅助设置中用作第一治疗、第二治疗、第三治疗或与本领域已知的其他类型的癌症治疗的组合治疗,例如化疗、手术、放疗、基因治疗、免疫治疗、骨髓移植、干细胞移植、靶向治疗、冷冻治疗、超声治疗、光动力治疗、射频消融等。

[0389] 在一些实施方案中,在一些实施方案中,本文所述的方法适用于治疗选自下组的实体癌:结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌、小肠癌、食道癌、黑色素瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌,皮肤或眼内恶性黑色素瘤,子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤,膀胱癌,肾癌或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、 T-细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症,所述癌症的组合和所述癌症的转移性病变。

[0390] 在一些实施例中,本文所述的方法适用于治疗以下的一种或多种的血液癌:急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)、 B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、慢性粒细胞白血病(CML)、B细胞幼淋巴细胞白血病、母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴组织增生性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突细胞肿瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症或白血病前期。

[0391] 药物组合物的给药可以以任何方便的方式进行,包括通过注射、摄入、输血、植入或移植。所述组合物可经动脉、皮下、皮内、瘤内、鼻腔内、髓内、肌肉内、静脉内或腹腔内给药患者。在一些实施方案中,药物组合物是系统给药的。在一些实施方案中,药物组合物通过输注例如静脉输注给药个体。用于免疫治疗的输注技术在本领域中是已知的(参见,例如,Rosenberg等人.,New Eng.J.of Med.319:1676(1988))。在一些实施方案中,药物组合物通过皮内或皮下注射给个体。在一些实施方案中,所述组合物通过静脉注射给药。在一些实施方案中,所述组合物直接注射到肿瘤或淋巴结中。在一些实施方案中,药物组合物局部给药到肿瘤部位,例如直接给药到肿瘤细胞中,或者给药到具有肿瘤细胞的组织中。

[0392] 本发明的药物组合物的剂量和所需药物浓度可根据预想的特定用途而变化。确定合适的剂量或给药途径完全在普通技术人员的技术范围内。动物实验为人体治疗有效剂量

的确定提供了可靠的指导。有效剂量的种间缩放可以按照Mordenti,J.和Chappell,W.“种间缩放在毒代动力学中的使用”,毒代动力学与新药开发,Yacobi等人编辑,Pergamon出版社,纽约,1989年,第42-46页中规定的原则进行。在本申请的范围内,不同的制剂将对不同的治疗和不同的疾病有效,并且旨在治疗特定器官或组织的给药可能需要以与另一器官或组织不同的方式递送。

[0393] 在一些实施方案中,本文所述的修饰IL-2蛋白、本文所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物或其药物组合物通过胃肠外途径给药,例如肌肉内(IM)、皮下(SC)、静脉内(IV)、关节内或腹膜内给药中的任何一种。在一些实施方案中,本文所述的修饰IL-2蛋白、本文所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物或其药物组合物通过皮下给药。在一些实施方案中,本文所述的修饰的IL-2蛋白、本文所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物或其药物组合物通过静脉注射给药。在一些实施方案中,本文所述的修饰IL-2蛋白、本文所述的修饰IL-2 蛋白-PEG偶联物或其药物组合物通过静脉输注给药。在一些实施方案中,本文描述的修饰IL-2蛋白、本文描述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物或其药物组合物在不超过24小时、 20小时、15小时、10小时、8小时、3小时、2小时、1小时、30分钟或更短的时间内给药(例如,输注)给个体。在一些实施例中,本文描述的修饰IL-2蛋白,本文所述的修饰 IL-2蛋白-PEG偶联物,或其药物组合物在以下的任何一段时间内给药(例如,输注)给个体:约30分钟至约1小时,约1小时至约2小时,约2小时至约4小时,约4小时至约 6小时,约6小时至约8小时,约8小时至约10小时,约10小时至约12小时,约12小时至约18小时,约18小时至约24小时,约30分钟至约2小时,约2小时至约5小时,约5小时至约10小时,约10小时至约20小时,约30分钟至约10小时,或约30分钟至约20小时。本文所述的修饰IL-2蛋白、本文所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物或其药物组合物可以以任何合适的速率给药(例如,输注)给个体。在一些实施方案中,此处描述的修饰IL-2蛋白、此处描述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物或其药物组合物可以以超过0.001 μg/kg/hr、0.002μg/kg/hr、0.005μg/kg/hr、0.01μg/kg/hr、0.02μg/kg/hr、0.1μg/kg/hr、0.2 μg/kg/hr、0.6μg/kg/hr、0.7μg/kg/hr、0.9μg/kg/hr、1μg/kg/hr、1.5μg/kg/hr、2μg/kg/hr、3μg/kg/hr、4μg/kg/hr、5μg/kg/hr、10μg/kg/hr、15μg/kg/hr、20μg/kg/hr、25μg/kg/hr、 50μg/kg/hr、75μg/kg/hr、100μg/kg/hr或更高的速率给药(例如,输注)。

[0394] 在一些实施方案中,本文所述的修饰IL-2蛋白、本文所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物或其药物组合物单次给药。在一些实施方案中,本文所述的修饰IL-2蛋白、本文所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物或其药物组合物多次给药(例如2、3、4、5、6或更多次中的任何一种)。在一些实施例中,每天(每日)1次,每2天1次,每3天1次,每4天1 次,每5天1次,每6天1次,每周1次,每10天1次,每2周1次,每3周1次,每 4周1次,每2个月1次,每3个月1次,每4个月1次,每5个月1次,每6个月1次,每7个月1次,每8个月1次,每9个月1次,或每年1次给药本文所述的修饰IL-2蛋白,本文所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物或其药物组合物。在一些实施方案中,每天给药一次至每3周给药一次本文所述的修饰IL-2蛋白、本文所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物或其药物组合物。在一些实施方案中,给药间隔大约为1周至2周、2周至1个月、 2周至2个月、1个月至2个月、1个月至3个月、3个月至6个月、或6个月至一年中的任意一个。医学领域的技术人员可以容易地通过监测患者的疾病迹象并相应地调整治疗来确定特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0395] 此外,剂量可以通过一次或多次单独给药,或通过连续输注给药。在一些实施方案

中,药物组合物以拆分剂量给药,例如2、3、4、5或更多剂量中的任何一种。在一些实施方案中,拆分剂量在大约一周内施用。在一些实施方案中,剂量是等分拆分的。在一些实施方案中,拆分剂量约为总剂量的20%、30%和约50%。在一些实施方案中,连续拆分剂量之间的间隔约为1天、2天、3天或更长。对于数天或更长时间的重复给药,取决于病情,治疗持续到疾病症状出现预期的抑制为止。然而,其他剂量方案可能是有用的。这种治疗的进展很容易通过常规技术和分析来监测。

[0396] VI.试剂盒和制品

[0397] 进一步提供了包含本文所述的任何一种修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物(或修饰的IL-2 蛋白)的试剂盒、单位剂量和制品。在一些实施方案中,提供了一种试剂盒,该试剂盒包含本文所述的药物组合物中的任何一种,并且优选地提供其使用说明书,例如用于治疗本文所述的疾病。

[0398] 本发明的试剂盒包括一个或多个容器,所述容器包括本文所述的用于治疗疾病的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物(或修饰的IL-2蛋白)。例如,说明书包括使用修饰的IL-2蛋白-PEG 偶联物(或修饰的IL-2蛋白)以治疗疾病的描述,例如癌症(例如,肾细胞癌、转移性黑色素瘤、急性髓系白血病(AML)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、乳腺癌或膀胱癌)。该试剂盒还可以包括基于识别个体是否患有疾病和疾病的阶段来选择适合治疗的个体(例如,人)的描述。与修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物(或修饰的IL-2蛋白)的使用有关的说明通常包括关于预期治疗的剂量、给药时间表和给药途径的信息。容器可以是单位剂量、散装包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。本发明的试剂盒中提供的说明通常是标签或包装插页上的书面说明(例如,试剂盒中包含的纸页),但机器可读的说明(例如,携带在磁或光存储盘上的说明)也是可接受的。本发明的试剂盒采用合适的包装。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶子、广口瓶、软包装(例如密封的聚酯薄膜或塑料袋)等。还考虑了与特定装置结合使用的包装,例如吸入器、鼻给药装置(例如雾化器)或输注装置例如微型泵。试剂盒可以具有无菌的入口(例如,容器可以是静脉溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。容器可以具有无菌的入口(例如,容器可以是静脉溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中至少有一种活性剂是本文所述的工程化多肽。所述容器可进一步包括第二药学活性剂。该试剂盒可任选地提供附加组件,例如缓冲区和解释信息。通常,该试剂盒包括容器和在容器上或与容器相关的标签或包装插页。

[0399] 在一些实施方案中,试剂盒进一步包括TGase(例如本文描述的野生型或工程化TGase 中的任何一种)。在一些实施方案中,试剂盒还包括用于进行转谷氨酰化反应的其他试剂,例如PEG片段(例如,甲氧基-PEG-胺)。在一些实施例中,该试剂盒还包括关于进行本文所述的任何一种偶联方法的说明。在一些实施方案中,试剂盒还包括用于固定TGase或修饰的IL-2蛋白的固体载体。在一些实施方案中,试剂盒中的TGase固定在固体载体上。

[0400] 所述制品包括容器和在容器上或与容器相关的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可以由多种材料形成,例如玻璃或塑料。通常,容器容纳对治疗本文所述的疾病或病症(例如癌症)有效的组合物,并且可以具有无菌进入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。标签或包装插页表明该组合物用于治疗个体的特定病症。标签或包装插页将进一步包含用于向个体施用组合物的说明。标签可以指示重构和/或使用的方向。容纳药物组合物的容器可以是多用途小瓶,

其允许重构制剂的重复给药(例如2-6次给药)。包装插页是指通常包括在治疗产品商业包装中的说明,其中包含关于此类治疗产品使用的适应症、用法、剂量、给药、禁忌症和/ 或警告的信息。此外,所述制品还可以包括第二容器,所述第二容器包括药学上可接受的缓冲液,例如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。从商业和用户角度看,它还可以包括所需要的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0401] 试剂盒或制品可以包括多个单位剂量的药物组合物和使用说明,其包装量足以在药房,例如医院药房和复合药房中储存和使用。

[0402] 示例性实施方案

[0403] 实施方案1.一种修饰的白细胞介素-2(IL-2)蛋白,其中包含一个工程化的谷氨酰胺(Q) 残基。

[0404] 实施方案2.实施方案1的修饰IL-2蛋白,其中所述工程化的Q残基位于IL-2受体α(IL-2Rα)亚基结合域内。

[0405] 实施方案3.实施方案1的修饰IL-2蛋白,其中所述工程化的Q残基在IL-2Rα亚基结合结构域外约1至约3个氨基酸残基之间。

[0406] 实施方案4.实施方案1-3中任一项的修饰IL-2蛋白,其中所述修饰IL-2蛋白包含一个工程化的Q残基。

[0407] 实施方案5.实施方案1-3中任一项的修饰IL-2蛋白,其中所述修饰IL-2蛋白包含两个或更多个工程化的Q残基。

[0408] 实施方案6.实施方案1-5中任一项的修饰IL-2蛋白,其中所述工程化的Q残基是或由相对于亲本IL-2蛋白的单个氨基酸突变产生。

[0409] 实施方案7.实施方案6的修饰IL-2蛋白,其中所述亲本IL-2蛋白包括SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

[0410] 实施方案8.实施方案7的修饰IL-2蛋白,其中所述单个氨基酸突变选自下组:F43Q、R37Q、F41Q、K42Q、Y44Q、T36Q、M38Q、或其组合。

[0411] 实施方案9.实施方案8的修饰IL-2蛋白,其中所述修饰IL-2蛋白包括SEQ ID NOs:2和4-8中任一所示的氨基酸序列。

[0412] 实施方案10.实施方案1-5中任一项的修饰IL-2蛋白,其中所述工程化的Q残基是适于谷氨酰胺转胺酶(TGase)反应的外源补丁序列的一部分。

[0413] 实施方案11.实施方案10的修饰IL-2蛋白,其中所述外源补丁序列取代亲本IL-2蛋白的一部分。

[0414] 实施方案12.实施方案11的修饰IL-2蛋白,其中所述亲本IL-2蛋白包括SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列。

[0415] 实施方案13.实施方案10-12中任一项的修饰IL-2蛋白,其中所述外源补丁序列选自下组:LEEQAA(SEQ ID NO:9),IFKQTY(SEQ ID NO:10)、PKEQKY(SEQ ID NO:11), VIQGV(SEQ ID NO:12)、REEQFN(SEQ ID NO:13),GLLQGA(SEQ ID NO:14),或其组合。

[0416] 实施方案14.实施方案13的修饰IL-2蛋白,其中所述修饰IL-2蛋白包括SEQ ID NO:3和15-19中任一所示的氨基酸序列。

[0417] 实施方案15.实施方案1-8和10-13中任一项的修饰IL-2蛋白,其中所述修饰IL-2

蛋白进一步包含一个或多个非工程化的Q残基的附加氨基酸突变。

[0418] 实施方案16.根据实施方案1-15中任一项所述的修饰IL-2蛋白,其中所述修饰IL-2 蛋白包含的氨基酸序列的同一性至少约是亲本IL-2蛋白的95%,并且其中所述亲本IL-2蛋白包含SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

[0419] 实施方案17.实施方案1-16中任一项的修饰IL-2蛋白,其中修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基的结合$K_D$约为亲本IL-2蛋白与IL-2Rα亚基之间的结合$K_D$的2～800倍。

[0420] 实施方案18.实施方案1-17中任一项的修饰IL-2蛋白,其中修饰后的IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基的结合$K_D$大约为亲本IL-2蛋白与IL-2Rβ亚基之间的结合$K_D$的1-30倍。

[0421] 实施方案19.根据实施方案1-18中任一项所述的修饰的IL-2蛋白,其中所述修饰的 IL-2蛋白能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T细胞($T_c$,细胞毒性T淋巴细胞,或CTL)、辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK)细胞。

[0422] 实施方案20.实施方案19的修饰的IL-2蛋白,其中与亲本IL-2蛋白相比,修饰的IL-2 蛋白激活Treg细胞的能力大约比亲本IL-2蛋白低2至50倍。

[0423] 实施方案21.实施方案19或20的修饰IL-2蛋白,其中与亲本IL-2蛋白相比,修饰IL-2蛋白增加CTL与Treg的比率或NK细胞与Treg的比率的能力类似或高约1-20倍。

[0424] 实施方案22.一种修饰的IL-2蛋白-聚乙二醇(PEG)偶联物,包括实施方案1-21中任一项的修饰的IL-2蛋白和PEG部分,其中PEG部分通过工程化的Q残基与修饰的IL-2蛋白偶联。

[0425] 实施方案23.实施方案22的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中PEG部分是线性的。

[0426] 实施方案24.实施方案22的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中PEG部分是分枝的。

[0427] 实施方案25.实施方案22-24中任一项的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物,其中PEG部分的分子量在约10kDa和约40kDa之间。

[0428] 实施方案26.实施方案22-25中任一项的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物,其中PEG部分的分子量约为20kDa。

[0429] 实施方案27.根据实施方案22-26中任一项所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述PEG部分被选自羟基、烷氧基、取代的烷氧基、烯氧基、取代的烯氧基、炔氧基、取代的炔氧基、芳氧基和取代的芳氧基的封端部分所封端。

[0430] 实施方案28.实施方案22-27中任一项的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物,其中PEG部分是甲氧基-PEG-胺。

[0431] 实施方案29.根据实施方案22-28中任一项所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述修饰IL-2蛋白包括两个或更多个工程化的Q残基,并且其中所述两个或更多个工程化的Q残基中的至少一个分别与PEG部分结合。

[0432] 实施方案30.实施方案22-29中任一项的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中PEG部分的结合是通过TGase介导的。

[0433] 实施方案31.实施方案30的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述TGase是微生物TGase(mTGase)。

[0434] 实施方案32.实施方案30或31的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述TGase是野生型TGase。

[0435] 实施方案33.实施方案32的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述野生型TGase具有SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。

[0436] 实施方案34.实施方案30或31的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述TGase是工程化TGase。

[0437] 实施方案35.实施方案34的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述工程TGase包含与SEQ ID NO:20具有至少约80%同一性的氨基酸序列。

[0438] 实施方案36.实施方案30-35中任一项的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述TGase 具有至少约90%的纯度。

[0439] 实施方案37.根据实施方案22-36中任一项所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα亚基之间结合的$K_D$为亲本IL-2蛋白与IL-2Rα亚基之间结合$K_D$的约10-约2000倍。

[0440] 实施方案38.根据实施方案22-37中任一项所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基之间结合的$K_D$与亲本IL-2蛋白(如野生型 IL-2、人IL-2或IL-2阿地白介素)与IL-2Rβ亚基之间结合$K_D$类似,或为约1-约30倍。

[0441] 实施方案39.根据实施方案22-38中任一项所述的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物能够激活选自下组的免疫细胞:杀伤T细胞($T_c$,细胞毒性T淋巴细胞,或CTL),辅助性T细胞($T_h$)、调节性T细胞(Treg)、γδT细胞、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK)细胞。

[0442] 实施方案40.实施方案39的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中修饰的IL-2蛋白-PEG 偶联物与亲本IL-2蛋白相比,其激活Treg细胞的能力大约比亲本IL-2蛋白低2-5000倍。

[0443] 实施方案41.实施方案39或40的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述修饰的IL-2 蛋白-PEG偶联物与亲本IL-2蛋白相比,其增加CTL与Treg的比率或NK细胞与Treg的比率比亲本IL-2蛋白类似或高1-20倍。

[0444] 实施方案42.一种分离的核酸,其编码实施方案1-21中任一项的修饰IL-2蛋白。

[0445] 实施方案43.包含实施方案42的分离核酸的载体。

[0446] 实施方案44.包含实施方案42的分离核酸或实施方案43的载体的宿主细胞。

[0447] 实施方案45.一种药物组合物,包括实施方案1-21中任一项的修饰IL-2蛋白,或实施方案22-41中任一项的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物,以及任选的药学上可接受的载体。

[0448] 实施方案46.一种治疗个体疾病的方法,包括给个体施用有效量的实施方案45的药物组合物。

[0449] 实施方案47.实施方案46的方法,其中所述药物组合物是静脉内、瘤内、腹腔内或皮下给药的。

[0450] 实施方案48.实施方案46或47的方法,其中药物组合物以约1μg/kg至约100μg/kg给药。

[0451] 实施方案49.实施方案46-48中任一项的方法,其中所述药物组合物每月给药一次、每3周给药一次、每2周给药一次、每周给药一次、每周给药两次、隔天给药一次或每天给药一次。

[0452] 实施方案50.实施方案46-49中任一项的方法,其中所述疾病是癌症。

[0453] 实施方案51.实施方案50的方法,其中所述癌症是肾细胞癌、转移性黑色素瘤、急性髓系白血病(AML)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、乳腺癌或膀胱癌。

[0454] 实施方案52.一种制备包含修饰IL-2蛋白的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的方法,所述修饰IL-2蛋白包含与PEG片段特异性偶联的工程化的Q残基,其中所述方法包括:在TGase存在下,在足以生成修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的条件下,使实施方案1-21中任一项的修饰IL-2蛋白与PEG片段接触,其中所述PEG片段通过所述工程化的Q残基与修饰IL-2蛋白偶联。

[0455] 实施方案53.一种制备包含修饰IL-2蛋白的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的方法,所述修饰IL-2蛋白包含与PEG片段特异性偶联的工程化的Q残基,其中所述方法包括:a)在TGase存在下,在足以生成包含通过工程化的Q残基特异性地与小分子柄偶联的修饰IL-2蛋白中间体偶联物的条件下,使实施方案1-21中任一项的修饰IL-2蛋白与小分子柄接触,以及b)将所述中间体偶联物与PEG片段接触,从而获得所述的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物,其中所述PEG片段通过所述小分子柄偶联。

[0456] 实施方案54.实施方案52或53的方法,进一步包括产生包含工程化的Q残基的修饰IL-2蛋白。

[0457] 实施方案55.一种制备包含修饰IL-2蛋白的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的方法,所述修饰IL-2蛋白包含与PEG片段特异性偶联的工程化的Q残基,其中所述方法包括:在TGase存在下,在足以生成修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的条件下,使包含实施方案1-21 中任一项的多种修饰IL-2蛋白的组合物与PEG片段接触,其中所述组合物中至少有约 30%的修饰IL-2蛋白通过所述工程化的Q残基与PEG片段偶联。

[0458] 实施方案56.一种制备包含修饰IL-2蛋白的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的方法,所述修饰IL-2蛋白包含与PEG片段特异性偶联的工程化的Q残基,其中所述方法包括:a) 在TGase存在下,在足以产生包含与小分子柄特异性结合的修饰IL-2蛋白的中间体偶联物的条件下,使包含实施方案1-21中任一项的多种修饰IL-2蛋白的组合物与小分子柄接触,其中组合物中至少有约30%的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与小分子柄偶联,以及b)使中间偶联物与PEG片段接触,从而获得修饰IL-2蛋白-PEG偶联物,其中组合物中至少约30%的中间偶联物通过小分子柄与PEG片段偶联。

[0459] 实施方案57.实施方案55或56的方法,进一步包括生成包含多个修饰IL-2蛋白的组合物,该修饰IL-2蛋白包含工程化的Q残基。

[0460] 实施方案58.实施方案55-57中任一项的方法,其中组合物中至少有约70%的修饰IL-2 蛋白通过工程化的Q残基与PEG片段偶联。

[0461] 实施方案59.一种增加IL-2蛋白的循环半衰期$t_{1/2}$或总暴露量$AUC_{0-inf}$的方法,包括: a)将工程化的Q残基引入IL-2蛋白以生成实施方案1-21中任一项的修饰IL-2蛋白;b)在TGase存在下,在足以使PEG片段通过工程化的Q残基与修饰IL-2蛋白偶联的条件下,使修饰IL-2蛋白与PEG片段接触;以及与IL-2蛋白相比,其中PEG片段的长度足以增加PEG偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期或总暴露量$AUC_{0-inf}$。

[0462] 实施方案60.一种增加IL-2蛋白的循环半衰期或总暴露量$AUC_{0-inf}$的方法,包括:a)将工程化的Q残基引入IL-2蛋白中,以产生实施方案1-21中任一项的修饰IL-2蛋白;在TGase存在下,在足以使PEG部分通过工程化的Q残基与修饰IL-2蛋白偶联的条件下,将修饰

的IL-2蛋白与小分子柄接触;和c)在足以使PEG片段通过小分子柄与中间体偶联物偶联的条件下,将中间体偶联物与PEG片段接触;并且与IL-2蛋白相比,其中PEG 片段的长度足以增加PEG偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期。

[0463] 实施方案61.一种增加IL-2蛋白的循环半衰期或总暴露量$AUC_{0-inf}$的方法,包括:a)将工程化的Q残基引入IL-2蛋白中,以生成包含多个实施方案1-21中任一项的修饰IL-2蛋白的组合物;b)在TGase存在下,在足以使PEG部分通过工程化的Q残基与修饰IL-2 蛋白偶联的条件下使组合物与PEG片段接触;其中组合物中至少有约30%的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG片段偶联;并且与IL-2蛋白相比,其中PEG片段的长度足以增加PEG偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期或总暴露量$AUC_{0-inf}$。

[0464] 实施方案62.一种增加IL-2蛋白的循环半衰期或总暴露量$AUC_{0-inf}$的方法,包括:a)将工程化的Q残基引入所述IL-2蛋白中,以生成包含多个实施方案1-21中任一项的修饰IL-2蛋白的组合物;b)在TGase存在下,在足以使小分子柄通过工程化的Q残基与修饰IL-2蛋白偶联的条件下使组合物与小分子柄接触;其中组合物中至少有约30%的修饰 IL-2蛋白通过工程化的Q残基与小分子柄偶联;和c)将包含中间体偶联物的组合物与PEG 部分接触从而获得修饰的IL-2-蛋白-PEG偶联物,其中组合物中有约30%的中间体偶联物通过小分子柄与PEG片段偶联;并且与IL-2蛋白相比,其中PEG片段的长度足以增加 PEG偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期或总暴露量$AUC_{0-inf}$。

[0465] 实施方案63.实施方案61或62的方法,其中组合物中至少有约70%的修饰IL-2蛋白通过工程化的Q残基与PEG片段偶联。

[0466] 实施方案64.实施方案59-63中任一项的方法,其中PEG偶联修饰的IL-2蛋白的循环半衰期或总暴露量$AUC_{0-inf}$至少比IL-2蛋白长或高约1.5倍。

## 实施例

[0467] 下面的示例和示例性实施例旨在纯粹是本发明的示例,因此不应被认为以任何方式限制本发明。下面的示例和详细描述是以说明的方式提供的,而不是以限制的方式提供的。

[0468] 实施例1示例性修饰的IL-2蛋白和修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物

[0469] 本实施例描述了示例性修饰IL-2蛋白、修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的设计和制备,以及其生物活性的测试。

[0470] 1.IL-2表达质粒的构建

[0471] 化学合成人IL-2(IL-2 Aldesleukin)cDNA序列和编码IL-2修饰蛋白的核酸序列,用标准的分子克隆方法克隆到pET24a载体中。重组质粒经测序验证。IL-2A1质粒编码修饰的 IL-2蛋白(IL-2A1,以下也称为"DP006A"),包含F43Q的工程化Q残基,相对于SEQ ID NO:1的IL-2 Aldesleukin蛋白。IL-2A2质粒编码修饰的IL-2蛋白(IL-2A2),其在 IFKQTY的外源补丁序列内包含工程化Q残基,其替代了SEQ ID NO:1的亲本IL-2 Aldesleukin的一部分(图2)。

[0472] 2.IL-2构建体的表达及纯化

[0473] 重组质粒转化入化学感受态的大肠杆菌BL21(DE3)细胞。在添加100μg/ml氨苄青霉素的LB平板上选择菌落。

[0474] 通过pET24a载体使蛋白以包涵体的形式表达在大肠杆菌中。用于表达的典型配方可以在文献和在高密度摇动培养中通过自动诱导产生蛋白中找到,作者是F.William Studier,生物学系,布鲁克海文国家实验室,厄普顿,纽约11973(2007年12月20日)。

[0475] 发酵后通过离心分离获得细胞。将细胞团颗粒保存在-80℃下,以便将来匀浆。将冷冻的细胞团粒重新悬浮于细胞均质缓冲液(50mM Tris-HCl,150mM NaCl,5mM EDTA,pH8.0)中至浓度为10%(w/v),并用均质器(Panda Plus,GEA Niro Soavi)在4-15℃下均质两次。匀浆10000×g离心30min。上清液丢弃。依次用(1)50mM三氯化氢、150mM氯化钠、5mM EDTA、2M尿素、pH 8.0缓冲液;(2)50mM Tris-HCl、150mM NaCl、5mM EDTA、2M尿素、pH 8.0缓冲液;和(3)水分三步洗涤包涵体颗粒。洗涤后得到粗的IL-2包涵体。

[0476] 将粗IL-2包涵体溶于6M胍、100mM Tris、pH为8的缓冲液中。加入EDTA至终浓度2mM。然后加入二硫苏糖醇(DTT)至终浓度50mM。混合物在50℃温育30分钟。还原后,向混合物中加入水,使胍浓度降至4.8M。10000×g离心1小时后,丢弃所得凝胶状颗粒。加水使上清液中胍浓度进一步降至3.5M。混合物室温温育30分钟,以10000×g 离心30分钟。将所得颗粒悬浮于50mM Tris-HCl、150mM NaCl、5mM EDTA、3.5M GdnHCl、pH8.0缓冲液中,在10000×g下离心30min。用水将这一洗涤步骤再重复一次。

[0477] 将清洁还原后的IL-2包涵体溶于6M胍、100mM Tris pH8缓冲液中。添加100mM $CuCl_2$原料以得到最终$Cu^{2+}$浓度为0.1mM。混合物在4℃下孵育过夜。

[0478] 将表达的IL-2溶液放入透析袋中(具有3.5kDa的分子孔径)。在4℃下,将透析袋放入含有4.8M胍、0.1M Tris、pH8缓冲液的贮液池中。平衡4小时后,在4℃下,将透析袋放入含有1M胍、0.1M Tris、pH 8缓冲液的贮液池中。平衡4小时后,在4℃下,将透析袋放入含有20mM柠檬酸盐、pH 6.0缓冲液的贮液池中16小时。

[0479] 将重新折叠的IL-2在10000×g下离心40min,去除沉淀。

[0480] 将重新折叠和浓缩的IL-2负载在阳离子柱上,阳离子柱用SP-Sepharose HP树脂填充,负载缓冲液为20mM柠檬酸盐,pH为6.0。IL-2构建体在负载缓冲液中用NaCl梯度洗脱。将含有IL-2的组分合并。应当注意的是,也可以使用其他合适的纯化方法,如尺寸排阻色谱和疏水相互作用色谱(HIC色谱)。

[0481] 用SDS-PAGE和RP-HPLC检测重新折叠和纯化的IL-2。

[0482] SDS-PAGE分析

[0483] 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析样本,这种方法采用BioRad微蛋白Tetra系统和4~20%Mini-PROTEAN®TGX™预制蛋白凝胶。制备样品后,将其负载于凝胶上,在180电压下电泳约25分钟。

[0484] RP-HPLC

[0485] 用安捷伦HPLC 1100系统分析重新折叠和纯化的IL-2蛋白的HPLC。采用RP C4柱(250×4.6mm,Vydac 214TP54)。以1mL/min的流速在50℃下使用ACN(40-70%)在 0.1%TFA中的线性梯度进行洗脱30分钟。在280nm处测量吸光度。

[0486] 图3显示了不同IL-2表达和纯化样品的SDS-PAGE分析结果。每条通道加载5μg的IL-2样品。通道1含有表达自大肠杆菌的IL-2A1(DP006A)上清液。通道2含有以不溶性包涵体形式表达的纯化IL-2A1,其在大肠杆菌中以高水平表达。通道3和通道4分别包含重新折叠和纯化的IL-2A1和IL-2A2。SDS-PAGE结果表明,示例性修饰的IL-2蛋白IL-2A1和IL-2A2

已重新折叠为可溶性蛋白,并获得了较高的纯度。修饰的IL-2蛋白的大小约为153-155kDa。

[0487] 3.结合亲和力

[0488] 用表面等离子体共振法(Biacore T-200)直接测定修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα和IL-2Rβ的亲和力,并与亲本IL-2蛋白(如IL-2Aldesleukin)的亲和力进行比较。用EDC/NHS化学方法将抗人抗体偶联到CM-5传感器芯片表面。然后将人IL-2Rα-Fc或IL-2Rβ-Fc融合蛋白作为该表面的捕获配体。修饰的IL-2蛋白在pH4.5的醋酸缓冲液中进行连续稀释,起始浓度为5mM。允许这些稀释液与IL-2R配体结合5分钟,并根据浓度结合响应单位(RU) 的关系绘制曲线以确定EC50值。每个同种型对每个IL-2受体亚型的亲和力计算为相对于亲本IL-2(例如,IL-2 Aldesleukin)对相同IL-2R亚型的变化倍数。

[0489] 实施例2 mTGase催化修饰的IL-2蛋白与甲氧基-PEG-胺偶联

[0490] 将纯化的修饰IL-2蛋白(纯化的IL-2A1和IL-2A2;4mg/ml)溶于Tris缓冲液(pH7.0)。将20kDa甲氧基-PEG-胺(JenKem技术)加入IL-2溶液中,至最终浓度为0.5-1mM。将纯化的野生型TGase(TG_SL)加入IL-2和PEG混合溶液中,终浓度为0.02-0.4mg/ml。反应在25℃温育。反应后进行IEX-HPLC和SDS-PAGE分析。与20kDa甲氧基-PEG-胺偶联的IL-2A1在下文中也称为“PEG-20K-IL-2A1”或“DP006-A-20”。

[0491] 阳离子交换色谱

[0492] 用标准方法制备了柱床体积约为100毫升的SP-HP Sepharose(GE Healthcare)阳离子交换柱。该柱连接到GE Healthcare(Chalfont St.Giles,英国)AKTA AVANT以纯化制备的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物(PEG-20K-IL-2A1、PEG-20K-IL-2A2)。纯化过程的细节如下所述。

[0493] 将修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物负载在阳离子柱上,阳离子柱用SP-Sepharose HP树脂填充,负载缓冲液为20mM柠檬酸盐,pH为6.0。修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物在负载缓冲液中用NaCl梯度洗脱。将处于峰值时期的修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物组分汇集起来。应当注意的是,也可以使用其他合适的纯化方法,如尺寸排阻色谱法和疏水相互作用色谱法(HIC色谱法)。

[0494] 采用BioRad微蛋白Tetra系统和4～20％微蛋白®TGX™预制蛋白凝胶,对各种修饰的IL-2蛋白和PEG偶联物样品进行SDS-PAGE分析。制备样品后,在凝胶上加载5μg 样品,在180电压下电泳25min。经考马斯氏染色可观察蛋白条带。PEG-偶联物用碘化钡溶液染色。将凝胶在水中浸泡30分钟,然后浸入5％$BaCl_2$中溶液15分钟。然后,加入碘溶液(1.3％$I_2$+4％KI),孵育5分钟,最后将凝胶置于水中脱色30分钟。

[0495] 从图4A中可以看出,在与20kDa的甲氧基-PEG-胺偶联后,修饰的-PEG偶联物(PEG-20K-IL-2A1,DP006-A-20)的大小约为62kDa,而亲本修饰的IL-2蛋白(IL-2A1)的大小为14.8kDa。不含基因工程Q残基的亲本IL-2(IL-2 Aldesleukin),不与PEG部分偶联,表明IL-2蛋白内的内源性Q残基对TGase介导的转谷氨酰胺反应不敏感。图4B显示经阳离子交换层析纯化后得到高纯度的IL-2蛋白-PEG偶联物。

[0496] 修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的结合亲和力可以用实施例1的“3.结合亲和力”小节中描述的方法进行测量。

[0497] 类似地,也构建和纯化了与30kDa甲氧基-PEG-胺偶联的IL-2A1(以下也称为“PEG-30K-IL-2A1”或“DP006-A-30”)和与40kDa甲氧基-PEG-胺偶联的IL-2A1(以下也称为“PEG-

40K-IL-2A1”或“DP006-A-40”)(数据未显示)。

[0498] 实施例3通过体外基于细胞实验检测修饰IL-2蛋白和修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的生物活性

[0499] 用CTLL-2细胞进行细胞增殖试验,并测定IL-2A1、IL-2A2、PEG-20K-IL-2A1、PEG-20K-IL-2A2的活性。IL-2 Aldesleukin作为对照。CTLL-2是C57BL/6小鼠细胞毒T 淋巴细胞系,其中CD25和IL-2Rα在细胞表面高度表达。

[0500] CTLL-2细胞在添加2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、10％胎牛血清和50-100单位/ml的IL-2阿地白介素的完全RPMI 1640培养基中培养,在37℃,5％$CO_2$大气和85％的湿度下维持。细胞悬浮培养至分裂前细胞密度为$1\times10^6$细胞/ml。

[0501] 为了进行生物活性测定,在用测试IL-2构建体处理之前,将细胞分裂为细胞数至少为$3\times10^5$/ml。将细胞在Dulbecco's磷酸盐缓冲盐水中洗涤3次,然后以$3\times10^5$-$4\times10^5$细胞 /毫升的细胞密度重新悬浮在无IL-2(阿地白介素)的补充培养基中,并以100μL/孔接种于 96孔的黑壁透明底微孔板中。在96孔板中用不含IL-2(阿地白介素)的补充培养基配制6×浓度的测试样品的系列稀释液,然后将20μL的6×浓度的试验样品加入所有含有100μL细胞的孔中,除了阴性对照孔外,其余孔都添加20μL的不含IL-2(阿地白介素)的补充培养基。CTLL-2细胞在37℃下,5％$CO_2$大气,85％湿度环境中孵育44小时。培养44小时后,每孔加入20μL 0.03％瑞天青。将平板在定轨振荡器上混合两分钟,然后在37℃下, 5％$CO_2$气氛85％湿度下再孵育4小时。然后使用SpectraMax Geminixs(分子装置)酶标仪在$^{ex}$555nm/$^{em}$585nm处(570nM截断)读取测试板。

[0502] 使用XLFit Excel版本(4.3.2Build 11)(ID商业溶液限制)合适模型201软件,从剂量 -反应曲线分析中计算细胞增殖的EC50值(显示50％最大反应所需的测试化合物浓度)。

[0503] 使用细胞增殖试验测量的示例性修饰IL-2蛋白和修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的生物活性在图5中显示。图5表明所有IL-2构建物均能诱导CTLL-2细胞生长,且呈剂量依赖性。IL-2A1和IL-2A2均能刺激CTLL-2的生长,表明CTLL-2已被重新折叠成适当的构象。与亲本IL-2阿地白介素相比,IL-2A1诱导CTLL-2细胞生长的生物活性降低了约 4倍,IL-2A2的生物活性降低了约49倍。20kDa PEG-IL-2A1(DP006-A-20)的显示的生物活性比其亲本蛋白IL-2A1(DP006A)略有下降(约3倍),而20kDa PEG-IL-2A2的生物活性与亲本蛋白IL-2A2相似。

[0504] 由于在IL-2Rα亚基结合域内设计工程化的Q残基和PEG偶联位点,修饰后的IL-2蛋白及其聚乙二醇化形式蛋白的生物活性变化可能反映了T细胞与IL-2Rα亚基结合能力的不同。如图5所示,Q残基突变导致修饰的IL-2蛋白与IL-2Rα亚基的结合能力减弱。与IL-2A1相比,IL-2A2的生物活性受到更严重的影响,可能是因为IL-2A2中引入了更多的氨基酸突变(IFKQTY补丁替换),而IL-2A1中引入了单个氨基酸突变(F43Q单个氨基酸替换)。结果还表明,与未聚乙二醇化的亲本修饰的IL-2相比,在IL-2Rα亚基结合区的聚乙二醇偶联能进一步降低与IL-2Rα亚基的结合能力。例如,与未聚乙二醇化的亲本蛋白IL-2A1(DP006A)相比,PEG偶联导致20kDa的PEG-IL-2A1(DP006A)的生物活性降低约3倍。PEG偶联不会进一步降低PEG-IL-2A2的生物活性,可能是因为IL-2A2的补丁替换突变已经显著地消除了其与IL-2Rα亚基的结合,从而在一定程度上PEG偶联不会进一步降低PEG-IL-2A2与IL-2Rα亚基

的结合能力。

[0505] 实施例4修饰IL-2蛋白和修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的诱导淋巴细胞增殖的体内生物活性

[0506] 以C57BL/6小鼠为研究对象,比较了修饰IL-2A1、修饰IL-2A2、二者的PEG偶联物及其亲本IL-2 Aldesleukin诱导NK细胞、CD8+T细胞和Treg细胞增殖的能力。将 C57BL/6小鼠(雄性,6周龄,哈兰,印第安纳波利斯,IN)随机分为6个治疗组(每组5只):每日PBS组、每日IL-2Aldesleukin组、每日IL-2A1组(DP006A)、每日IL-2A2组以及两个单剂量组20K PEG-IL-2A1(DP006-A-20)和20K PEG-IL-2A2。每日组的小鼠每日腹腔注射(I.P.)亲本IL-2(Aldesleukin,未修饰的IL-2)、修饰的IL-2A1或修饰的IL-2A2,剂量为 20μg/只(或PBS为阴性对照),连续5天。单剂量组第0天接受单次皮下注射(S.C.)注射20K PEG-IL-2A1或20K PEG-IL-2A2,剂量为100μg/只。

[0507] 治疗5天后,采集血液和脾细胞。用histopaque(Sigma,St.Louis,MO)从血液中分离 PBMCs。PBMC和脾细胞用PE标记的抗CD19染色以鉴定B细胞,用PE标记的抗 CD335(NKp46)染色以鉴定NK细胞,用FITC标记的抗CD4染色以鉴定Treg细胞,用 FITC标记的抗CD8抗体染色以鉴定细胞毒性T细胞/CTLs(BioLegend,San Diego,CA)。使用FACScan流式细胞仪(BD Bioscience,San Jose,CA)分析染色细胞。

[0508] 从图6A中可以看出,修饰的IL-2A1(DP006A)对Treg细胞的增殖诱导作用明显低于亲本IL-2Aldesleukin;而IL-2A2、PEG-20K-IL-2A1(DP006-A-20)和PEG-20K-IL-2A2 对Treg细胞的扩增作用不大。Treg细胞与IL-2测试标本孵育后,血液中Treg细胞百分率如下:3.23%(IL-2Aldesleukin),0.52%(IL-2A1,DP006A),0.32%(IL-2A2),0.28%(20K PEG-IL-2A1,DP006-A-20),0.25%(20K PEG-IL-2A2)。Treg细胞表面IL-2与IL-2Rα(CD25) 结合可能导致Treg细胞的增殖。IL-2A1(DP006A)和IL-2A2诱导Treg细胞增殖的作用明显减弱可能是由于它们在IL-2Rα(CD25)结合域内发生突变,导致IL-2/IL-2Rα结合减弱。与IL-2A1相比,IL-2A2诱导Treg增殖的能力受到更严重的影响,可能是因为IL-2A2中引入了更多的氨基酸突变(IFKQTY补丁替换),而IL-2A1中引入了单个氨基酸突变(F43Q 单个氨基酸替换)。进一步将20kDa的PEG片段引入这两个修饰的IL-2蛋白,进一步降低了它们诱导Treg增殖的能力,可能是由于PEG-20K-IL-2/IL-2Rα结合能力的完全丧失。

[0509] 从图6B中可以看出,修饰的IL-2蛋白和修饰的IL-2蛋白-PEG 20kDa偶联物在血液和脾脏中都能显著地诱导相对于Treg细胞的CD8+T细胞增殖,与未PEG偶联的亲本修饰的IL-2蛋白相比,20kDaPEG偶联修饰的IL-2蛋白在血液中表现出更强的相对于Treg 细胞的CD8+T细胞增殖诱导作用。相对于Treg细胞的增殖,血液中修饰的IL-2蛋白可促进NK细胞的增殖;与未PEG偶联的亲本修饰的IL-2蛋白相比,无论是在血液中还是在脾脏中,相对于Treg细胞的增殖诱导作用,修饰的IL-2蛋白的PEG偶联物显著增强了NK细胞的增殖诱导作用,。

[0510] 图6A-6B表明,与IL-2 Aldesleukin相比,经修饰的IL-2蛋白及其20kDa PEG偶联物减少了对Treg细胞增殖的诱导,导致有更高比率的CD8+杀伤T细胞:Treg细胞与更高比例的NK细胞:Treg细胞在血液中;与IL-2 Aldesleukin相比,经修饰的IL-2蛋白及其20kDa PEG偶联物对Treg细胞增殖的诱导作用减弱,对CD8+细胞增殖的诱导作用增强,导致有更高比率的CD8+杀伤T细胞:Treg细胞与更高比例的NK细胞;Treg细胞在脾脏中。CD8+T细胞和NK

细胞对Treg细胞的这种优先诱导可能是由于修饰的IL-2 蛋白及其PEG偶联物与IL-2Rβ和/或IL-2Rγ的结合亲和力较高,而对CD25+细胞(IL-2Rα表达细胞,如Treg)的结合亲和力缺乏或减弱。这表明本文所述的修饰IL-2蛋白及其PEG 偶联物可以显著改变外周血淋巴细胞的组成或与肿瘤相关。考虑到PEG偶联修饰的IL-2 蛋白的单一皮下注射与未PEG偶联物的亲本修饰IL-2蛋白多次静脉注射的比较,注射 PEG偶联的亲本修饰的IL-2蛋白,结果显示PEG偶联作用延长。

[0511] 这些结果与以下实施例一致:抗肿瘤动物研究(实施例5)和药代动力学研究(实施例 6)。

[0512] 实施例5修饰IL-2蛋白和修饰IL-2蛋白-PEG偶联物在减少小鼠黑色素瘤异种移植模型中的肿瘤体积方面的体内生物活性

[0513] 在B16-F10黑色素瘤模型中评估了典型的修饰IL-2蛋白和修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的抗肿瘤活性。

[0514] B16-F10黑色素瘤细胞取自ATCC,在37℃,5%$CO_2$条件下,在含10%FBS(Gibco)和2mML-谷氨酰胺的高糖DMEM(Gibco)中培养。活力在85%或85%以上的细胞可用于接种。采用台盼蓝染色检查细胞活力,并显微镜下计数。B16-F10细胞(70%～80%融合)在 PBS中重构,将其通过皮下注射到C57BL/6小鼠(6周龄,$8\times10^4$细胞/小鼠)的左侧腹。

[0515] 肿瘤被允许生长到大约50$mm^3$的大小,随后将30只异种移植小鼠随机分为6个治疗组(每组5只):每日PBS组(阴性对照组),每日IL-2(阿地白介素)组腹腔注射,每日 IL-2A1(DP006A)组腹腔注射。每日IL-2A2组经静脉注射,和两个单剂量组20K PEG-IL-2A1(DP006-A-20)和20K PEG-IL-2A2通过皮下单剂量注射。异种移植小鼠每日腹腔注射(I.P.)IL-2阿地白介素、修饰IL-2A1或修饰IL-2A2,剂量20μg/只(或PBS阴性对照), 连续5天。单剂量组接受单次皮下注射(S.C.),第0天注射20K PEG-IL-2A1或20K PEG-IL-2A2,剂量为100μg/只。异种移植小鼠体重和肿瘤体积($mm^3$)每两天测量一次。

[0516] 从图7中可以看出,修饰的IL-2蛋白在黑色素瘤小鼠移植瘤模型中表现出抑制肿瘤生长的作用,其中IL-2A1(DP006A)与阿地白介素IL-2的作用相似,而IL-2A2的作用不如IL-2A1。PEG偶联的IL-2A1和PEG偶联的IL-2A2在单剂量注射后表现出长时间的肿瘤生长抑制作用。在当量摩尔剂量下,20kDa聚乙二醇化的IL-2-A1(DP006-A-20)和kDa 聚乙二醇化的IL-2A2在单次剂量治疗后显示出与IL-2阿地白介素和IL-2A1在五次每日剂量治疗后相似(仅略低)的治疗效果,显示出PEG偶联形式的延长效果。

[0517] 实施例6修饰IL-2蛋白和修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的半衰期检测

[0518] 研究了单次静脉给药后修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物(PEG-20K-IL-2A1(DP006-A-20)、PEG-30K-IL-2A1(DP006-A-30)和PEG-40K-IL-2A1(DP006-A-40))在大鼠体内的药代动力学效应。雄性Sprague-Dawley大鼠(3组,n=3/组,7～8周龄幼鼠)静脉注射PEG-IL-2构建物2mg/kg。在给药后的指定时间点(0,5分钟,15分钟,45分钟,2,6,24,48,72,96小时)取血,处理后得到血清。ELISA分析前血清标本保存在-20℃。对于ELISA测试,以抗IL-2抗体(R17003M2F9;Yurogen Biosystem)为捕获抗体,抗PEG抗体(Agp4-PABM-B;IBMS Sinica)为检测抗体。根据约0.1ng/ml～10ng/ml相应的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物溶液绘制的标准曲线,计算每个时间点修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的血浆浓度。在静脉给药条件下,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物比IL-2阿地白介素具有更长的血清循环半衰期。

[0519] PEG-20K-IL-2A1(DP006-A-20)、PEG-30K-IL-2A1(DP006-A-30)和

[0520] PEG-40K-IL-2A1(DP006-A-40)的平均半衰期分别为11.9小时、14.0小时和19.4小时(见图 10A-10B),而根据文献(如https://www.drugbank.ca/drugs/db00041,或

[0521] Proleukin®(Aldesleukin)FDA标签),IL-2 Aldesleukin的半衰期仅为80分钟。修饰的IL-2 蛋白-PEG偶联物的PK指标如图10B所示。结果表明:PEG偶联体的尺寸越大,半衰期越长,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的$C_{last}$值越高。

[0522] 将大鼠单次皮下注射修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物后进行PK研究。雄性 Sprague-Dawley大鼠(3组,n=3/组,7～8周龄青年)皮下注射2.0mg/kg的测试PEG-IL-2 构建物。在给药后的指定时间点(0,30min,1,2,6,8,24,48,72,96小时)取血,处理后得到血清。ELISA分析前血清标本保存在-20℃。对于ELISA测试,以抗IL-2抗体(R17003M2F9;Yurogen Biosystem)为捕获抗体,以抗PEG抗体(Agp4-PABM-B;IBMS Sinica)为检测抗体。根据用约0.1ng/ml～10ng/ml相应的修饰IL-2蛋白-PEG偶联物溶液绘制的标准曲线,计算每个时间点修饰IL-2蛋白-PEG偶联物的血浆浓度。在皮下给药条件下,修饰的IL-2 蛋白-PEG偶联物比IL-2阿地白介素有更长的血清循环半衰期。

[0523] PEG-20K-IL-2A1(DP006-A-20)、PEG-30K-IL-2A1(DP006-A-30)和

[0524] PEG-40K-IL-2A1(DP006-A-40)的平均半衰期分别为15.6小时、17.2小时和22.0小时(见图 11A-11B),而文献中IL-2阿地白介素的半衰期仅为80分钟。修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物的PK指标如图11B所示。结果表明:PEG偶联体的尺寸越大,半衰期越长,修饰的 IL-2蛋白-PEG偶联物的$C_{max}$/$C_{last}$/AUC值越高。

[0525] 生物基质如血浆中修饰的IL-2蛋白的浓度可以用ELISA方法测定,该方法使用自制的的抗修饰的IL-2蛋白。用范围从约0.1ng/ml到约200ng/ml的相应的修饰IL-2蛋白溶液从标准曲线测定血浆中修饰IL-2蛋白的浓度。

[0526] 实施例7表面等离子体共振(SPR)分析修饰IL-2蛋白及修饰IL-2蛋白-PEG偶联物

[0527] 用SPR(Biacore T-200)测定修饰IL-2蛋白或修饰IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rα或 IL-2Rβ的结合亲和力,并与Aldesleukin IL-2蛋白的结合亲和力进行比较。用EDC/NHS化学方法将抗组氨酸抗体偶联到CM-5传感器芯片表面。IL-2Rα结合试验采用人 IL-2Rα-His作为表面捕获配体。IL-2Rβ-结合试验采用人IL-2Rβ-His作为表面捕获配体。用运行缓冲液(1×HEPES,0.005％吐温-20,pH7.4)对修饰的IL-2蛋白或修饰的IL-2蛋白 -PEG偶联物进行连续稀释。这些系列稀释液与IL-2Rα-His或IL-2Rβ-His配体结合60秒。以响应单位(RU)为单位测量结合反应,并根据蛋白浓度绘制图以确定Kd值(见表1)。每个构建体与IL-2Rα或IL-2Rβ的结合亲和力进一步计算为相对于Aldesleukin IL-2蛋白对同一IL-2R亚型的倍数变化(见表1)。

[0528] 如表1所示,与阿地白介素IL-2蛋白相比,携带F43Q突变的修饰IL-2A1(DP006A),在IL-2Rα亚基结合区与IL-2Rα的结合显著降低(～476.45倍降低)(图12A-12B)。将PEG 部分与IL-2A1偶联进一步降低了与IL-2Rα的结合,在本实验中,SPR检测不到结合(图 12C-12E)。IL-2A1(DP006A)与IL-2Rβ的结合亲和力也比Aldesleukin IL-2蛋白降低了约15.65倍(图13A-13B),提示IL-2Rα亚基结合域的F43Q突变对IL-2Rβ结合也有一定的影响,可能是由于对蛋白折叠的影响。令人惊讶的是,与未偶联的IL-2A1相比,与IL-2A1 偶联的PEG(DP006A)加强了其与IL-2Rβ亚基的结合(比较图13C-13E和图13B,和表1 中的Kd),尽管修

饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基的结合仍然比阿地白介素IL-2 蛋白的结合小(~8.34～10.91倍降低)(比较图13C-13E和图13A和表1中的Kd)。PEG偶联的DP006A与IL-2Rβ的结合比未PEG偶联的DP006A强,可能是因为PEG偶联稳定了DP006A或减少了实验过程中的蛋白损失(IL-2蛋白疏水性强,易粘附在其接触的大部分表面)。结果同样显示,PEG片段越大,修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物与IL-2Rβ亚基的结合越低。如表1所示,虽然与阿地白介素IL-2蛋白相比,修饰的IL-2(DP006A)和修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物均与IL-2R亚基的结合减弱,但与IL-2Rβ亚基相比,它们与IL-2Rα亚基的结合减弱更多,反映了所需的生物活性。

[0529] 表1.SPR结合数据

[0530]

| 构建物 | 与 IL-2Rα(CD25)的结合 | | 与 IL-2Rβ(CD122)的结合 | |
|---|---|---|---|---|
| | Kd(μm) | 相对于 IL-2(wt)的倍数变化 | Kd(μm) | 相对于 IL-2(wt)的倍数变化 |
| IL-2(阿地白介素) | 0.0361 | 1 | 0.536 | 1 |

[0531]

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| DP006A | 17.2 | 476.45 | 8.39 | 15.65 |
| DP006-A-20 | 无结合 | | 4.47 | 8.34 |
| DP006-A-30 | 无结合 | | 5.41 | 10.09 |
| DP006-A-40 | 无结合 | | 5.85 | 10.91 |

[0532] 实施例8.单次静脉注射或皮下注射DP630a(DP006-A-30)和DP006-A后在大鼠体内的 DP630a(DP006-A-30)或DP006-A药代动学研究

[0533] 1.目的

[0534] 本研究的目的是测定修饰的IL-2蛋白-PEG偶联物PEG-30K-IL-2A1(“DP630A”或“DP006-A-30”)单次静脉或皮下给药后的血清药代动力学(PK)。DP630a(DP006-A-30)由IL-2A1(DP006-A)与30kDa聚乙二醇偶联获得。同时测定单次静脉注射DP006-A与 DP630a(DP006-A-30)的血清药代动力学效应。根据所获得的血清药代动力学结果,对它们的PK谱,包括半衰期和总暴露量($AUC_{0-last}$)进行了比较。

[0535] 2.研究总结

[0536] 三组大鼠,每组3只雄性大鼠(总N＝9),分别以2mg/kg的剂量水平单次静脉注射或皮下注射DP006-A或DP630a(DP006-A-30)。在指定的时间点从每只动物身上采集血液(见表2),并处理成血清。然后对所有血清标本进行ELISA分析。

[0537] 表2.分组与剂量

[0538]

| 分组 | 动物数量 | 测试制品 | 注射方式 | 剂量水平(mg/kg) | 采血时间点 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 3只雄性 | DP006-A | 静脉注射 | 2.0 | 给药前(0 min),5 min,15 min,30 min,1 h,2 h,3 h,4 h,6 h,8 h给药后 |
| 2 | 3只雄性 | DP630a(DP006-A-30) | 静脉注射 | 2.0 | 给药前(0min)、5min、30min、1h、2h、4h、8h、第1天(24h)、第2天(48h)、第3天(72h)给药后 |
| 3 | 3只雄性 | DP630a(DP006-A-30) | 皮下注射 | 2.0 | 给药前(0min)、30min、1h、2h、4h、8h、第1天(24h)、第2天(48h)、第3天(72h)、第4天(96h)给药后 |

[0539] 3.测试设施

[0540] 动物实验和样本收集在BTS研究中心(10635 Roselle Street,Suite D-H,San Diego,CA 92121)进行。

[0541] 4.测试制品

[0542] 表3显示了测试制品信息。测试制品在-20℃下储存,在给药前30分钟移至室温。

[0543] 表3.测试制品

[0544]

| 测试制品 | 批次 | 浓度(mg/ml)* |
|---|---|---|
| DP630a(DP006-A-30) | A-30-02262020 | 1.0 |
| DP006-A | A-02172020 | 1.0 |

[0545] *浓度为蛋白含量

[0546] 5.生命期

[0547] 5.1动物

[0548] 表4显示了研究中使用的动物信息。动物住房和实验室程序遵循BTS Research的研究协议#20P-DCP-002。根据BTS研究,没有观察到动物死亡或出现不良反应。

[0549] 表4.动物

[0550]

| 物种 | 大鼠 | 年龄 | 9-11周剂量 |
|---|---|---|---|
| 品种 | Sprague Dawley(SD) | 数量和性别 | 9只雄性 |
| 来源 | Envigo(加州利弗莫尔) | 识别 | 耳标,尾标,笼卡 |

[0551] 5.2样本收集

[0552] 在指定的时间点从每只动物身上采集血液(见表2),并处理成血清。血清在-20℃条件下保存在BTS Research和CSPC Dophen中。用干冰将血清运到CSPC多芬。

[0553] 5.3样品分析

[0554] • 5.3.1 DP630a(DP006-A-30)的ELISA分析

[0555] 在DP630a(DP006-A-30)的ELISA检测中,以DP630a为参考标准,其于2020年2月 26

日制备于CSPC Dophen公司。用兔抗IL-2抗体(克隆2F9)(YUROGEN, Cat#R17003M2F9,批号#201708062F9)包被Nunc Maxisorp平板(Cat#43711,黑色),在包被缓冲液(10mM Tris pH8.5)(100μL/孔)中浓度为1.0μg/ml,室温振荡培养0.5小时,然后在4℃下保温过夜。孵育后,在每个孔中加入100μl 2%的PBS牛奶,在室温下摇动孵育2小时,以阻断非特异性结合位点。洗板后,加入稀释缓冲液(PBS中1%脱脂乳,0.00005～0.2%大鼠血清)中稀释的血清样品或标准品(8个标准品,范围为0～10ng/ml),室温振荡培养2h。洗涤后,每孔加入稀释缓冲液(在PBS中0.1%BSA)制备的小鼠AGP4-生物素抗PEG IgM 抗体(IBMS Sinica,产品号AGP4-PABM-B,批次#Mae-A3,550μg/ml),室温振荡培养1h。孵育后,洗涤平板,加入稀释缓冲液(0.1%BSA在PBS中)稀释的链霉亲和素-HRP(R&D系统号321894,No.890803),摇动孵育1小时。通过在11mL 10mM Tris pH8.5中稀释100μL Amplex Red(在DMF中)、100μL 5mM 4-碘苯酚和10μL 3%$H_2O_2$来制备底物。洗涤板,并在每个孔中加入100μL制备的底物。荧光测量采用SpectraMax Gemini XS(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)酶标仪,在555nm激发,在585nm发射(570nm发射截止)。ELISA 法检测DP630a(DP006-A-30)的范围为0.041ng/ml～10ng/ml.

[0556] •5.3.2 DP006-A的ELISA分析

[0557] 在DP006-A的ELISA检测中,以DP006-A为参考标准,其由CSPC Dophen自行制备。除用兔抗IL-2抗体(克隆2F9)以2.0μg/ml(200μL/孔)包被板,用人IL-2Duose®ELISA 检测抗体(DY202;R&D系统)代替小鼠AGP4-生物素抗PEG IgM抗体外,采用5.3.1节所述的类似ELISA方法。ELISA法检测DP006-A的范围为3ng/mL～200ng/ml。

[0558] •5.3.3药代动力学分析

[0559] 采用PKSolver V2软件对DP630a(DP006-A-30)和DP006-A的浓度-时间曲线进行非室间分析。(Zhang Y.等人,"PKSolver:一个在Microsoft Excel中用于药代动力学和药效学数据分析的附加程序,"Comput Methods program Biomed。2010;99(3):306-1)。

[0560] 6.结果

[0561] 6.1单次静脉注射后血清DP630a(DP006-A-30)的药代动力学实验结果

[0562] 单次静脉注射2mg/kg后,不同给药时间后大鼠血清中DP630a(DP006-A-30)浓度总结在表5中,平均浓度-时间(每个时间点3只动物)曲线显示在图14中。PK参数汇总在表6中。结果表明,在静脉注射DP630a(DP006-A-30)后,其有一个缓慢的消除阶段,半衰期约为12小时。DP630a(DP006-A-30)的峰值浓度为56.7μg/ml。总暴露值($AUC_{0-3天}$)为 227.5μg*hr/ml。

[0563] 表5.单次静脉注射DP630a(DP006-A-30)后SD大鼠血清中DP630a(DP006-A-30)浓度(μg/ml)

[0564]

| 第二组：DP630a 剂量，2 mg/kg，单次静脉注射 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 时间(hr) | 雄性，浓度(μg/ml) | | | | |
| | 2001 | 2002 | 2003 | 平均数 | Stdev |
| 0 | ND | ND | ND | NA | NA |
| 0.08 | 40.61 | 55.74 | 73.79 | 56.71 | 16.61 |
| 0.5 | 32.51 | 38.90 | 42.43 | 37.95 | 5.03 |
| 1 | 28.62 | 27.50 | 50.63 | 35.58 | 13.04 |
| 2 | 25.52 | 20.80 | 60.82 | 35.71 | 21.87 |

[0565]

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 4 | 12.05 | 22.91 | 19.38 | 18.12 | 5.54 |
| 8 | 4.42 | 4.38 | 4.71 | 4.50 | 0.18 |
| 24 | 0.55 | 0.49 | 0.63 | 0.56 | 0.07 |
| 48 | 0.08 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.01 |
| 72 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.03 | 0.01 |

[0566] 注:ND＝未检测到;NA＝不适用

[0567] 表6.给药DP630a(DP006-A-30)的SD大鼠静脉注射PK参数

[0568]

| 分组 | 聚乙二醇化 DP006-A | | $C_{max}$ (μg/ml) | $T_{max}$ (hr)[a] | $C_{last}$ (μg/ml) | $T_{last}$ (hr) | $AUC_{0-t}$ (μg*hr/ml) | $t_{1/2}$ (hr) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 平均数 | 56.7 | 0.08 | 0.03 | 72 | 227.5 | 11.73 |
| 2 | 30K | SD | 16.62 | 0.00 | 0.01 | NA | 57.19 | 1.03 |
| | | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

[0569] 注:NA＝不适用;DN＝剂量归一化为1mg/kg;[a]:使用中值

[0570] 6.2单次皮下注射后血清DP630a(DP006-A-30)的药代动力学实验结果

[0571] 单次皮下注射2mg/kg后,不同给药时间大鼠血清中DP630a(DP006-A-30)浓度总结在表7中,平均浓度-时间(每个时间点3只动物)曲线显示在图15中。PK参数汇总在表8 中。结果表明:皮下给药后,血清中DP630a(DP006-A-30)浓度在给药后7h内达到高峰,随后进入缓慢消除阶段,半衰期约为18h。DP630a的峰值浓度为0.6μg/ml。总暴露量 ($AUC_{0-4天}$DP630a(DP006-A-30)为16.9μg*hr/ml。

[0572] 表7.SD大鼠皮下注射DP630a(DP006-A-30)后血清中DP630a(DP006-A-30)浓度 (μg/ml)

[0573]

| 第三组：DP630a 剂量为 2mg/kg，单个皮下 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 时间(hr) | 雄性，浓度(μg/ml) | | | | |
| | 3001 | 3002 | 3003 | 平均数 | Stdev |
| 0 | ND | ND | ND | NA | NA |
| 0.5 | 0.035 | 0.01 | 0.059 | 0.035 | 0.025 |
| 1 | 0.063 | 0.137 | 0.311 | 0.17 | 0.128 |
| 2 | 0.146 | 0.206 | 0.329 | 0.227 | 0.093 |
| 4 | 0.184 | 0.293 | 0.485 | 0.321 | 0.153 |
| 8 | 0.863 | 0.495 | 0.454 | 0.604 | 0.225 |

[0574]

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 24 | 0.494 | 0.225 | 0.24 | 0.319 | 0.151 |
| 48 | 0.121 | 0.075 | 0.063 | 0.086 | 0.031 |
| 72 | 0.039 | 0.029 | 0.028 | 0.032 | 0.006 |
| 96 | 0.015 | 0.015 | 0.013 | 0.014 | 0.001 |

[0575] 注:ND＝未检测到;NA＝不适用

[0576] 表8.给药DP630a(DP006-A-30)SD大鼠S.C.的PK参数

[0577]

| 团体 | 聚乙二醇化 DP006-A | | $C_{max}$ (μg/ml) | Tmax (hr)[a] | $C_{last}$ (μg/ml) | $T_{last}$ (hr) | $AUC_{0-t}$ (μg*hr/ml) | $t_{1/2}$ (hr) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 平均数 | **0.60** | **6.7** | **0.014** | **96** | **16.9** | **18.1** |
| 3 | 30K | SD | 0.20 | 2.3 | 0.001 | NA | 5.6 | 2.9 |
| | | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

[0578] 注:NA＝不适用;DN＝剂量归一化为1mg/kg;[a]:使用中位数

[0579] 6.3单次静脉注射后血清DP006-A的药代动力学实验结果

[0580] 在单次静脉注射2mg/kg后,不同给药时间大鼠血清中DP006-A浓度总结在表9中,平均浓度-时间(每个时间点3只动物)分布在图16中.PK参数汇总在表10中。结果表明,在静脉注射DP006-A后,其有一个缓慢的消除阶段,半衰期约为7.3小时。DP006-A的峰值浓度为15.6μg/ml。总暴露量($AUC_{0-8时}$)为5.3μg*hr/ml。

[0581] 表9.单次静脉注射DP006-A后SD大鼠血清中DP006-A的浓度(μg/mL)

[0582]

| 第一组：DP006-A 剂量为 2mg/kg，单次静脉注射 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 时间(hr) | 雄性，浓度(μg/ml) | | | | |
| | 1001 | 1002 | 1003 | 平均数 | STDEV |
| 0 | ND | ND | ND | NA | NA |
| 0.08 | 10.26 | 20.88 | 15.59 | 15.58 | 5.31 |
| 0.25 | 3.56 | 7.97 | 4.35 | 5.29 | 2.35 |
| 0.5 | 1.19 | 2.2 | 1.22 | 1.53 | 0.57 |
| 1 | 0.49 | 0.66 | 0.47 | 0.54 | 0.1 |
| 2 | 0.104 | 0.061 | 0.064 | 0.076 | 0.024 |
| 3 | 0.031 | 0.021 | 0.026 | 0.026 | 0.005 |
| 4 | 0.018 | 0.016 | 0.018 | 0.018 | 0.001 |
| 6 | 0.013 | 0.012 | 0.016 | 0.014 | 0.002 |

[0583]

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 8 | 0.012 | 0.011 | 0.013 | 0.012 | 0.001 |

[0584] 注:ND＝未检测到;NA＝不适用

[0585] 表10.SD大鼠静脉注射PK参数。给药DP006-A

[0586]

| 团体 | DP006-A | | $C_{max}$ (μg/ml) | Tmax (hr)[a] | $C_{last}$ (μg/ml) | $T_{last}$ (hr) | $AUC_{0-t}$ (μg*hr/ml) | $t_{1/2}$ (hr) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 平均数 | 15.6 | 0.1 | 0.012 | 8 | 5.3 | 7.3 |
| 1 | | SD | 5.3 | 0.0 | 0.001 | NA | 1.7 | 1.4 |
| | | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

[0587] 注:NA＝不适用;DN＝剂量归一化为1mg/kg;[a]:使用中位数

[0588] 7.讨论

[0589] 从图17中可以看出,静脉注射2mg/kg后,血液中DP006-A含量迅速下降并分布到体内,而携带30kDa聚乙二醇部分的DP630a(DP006-A-30)主要局限于循环血液中并缓慢消除。聚乙二醇修饰的IL-2稳定性的提高也通过药代动力学曲线得到证实:与 DP006-A(7.3h)相比,DP603a(DP006-A-30;11.7小时)的消除半衰期增加了60.3%, DP006-A-30的消除半衰期增加了11.7小时;与DP006-A(5.3μg*hr/ml)相比,总暴露量 ($AUC_{0-last}$)对DP630a(DP006-A-30;227.5μg*hr/ml)增加42倍。

[0590] 通过比较皮下给药和静脉注射给药的AUC(见图18)并计算得出,单次皮下给药2mg/kg后DP630a(DP006-A-30)的生物利用度较低,为7.4%()。

[0591] 此处用非室间分析法评估的DP006-A在静脉注射2mg/kg后的消除半衰期(~7.3小时) 远长于报告的IL-2在人类中的半衰期(例如,根据文献,IL-2阿地白介素的半衰期约为80 分钟;参见,例如,https://www.drugbank.ca/drugs/db00041,或Proleukin® (aldesleukin)FDA 标签)。这可能是由于剂量水平的差异。本研究剂量水平为2mg/kg;而在人体中,临床剂量约为0.037mg/kg。由于ELISA法检测的限制,当IL-2剂量较低(~0.037mg/kg)时,人体研究可能观察不到IL-2的消除期,因此将IL-2分布期的半衰期作为人体内的消除半衰期。在本研究中,如果将DP006-A的分布阶段作为消除阶段(即给药后1-4小时),观察

到的半衰期将小于0.5小时(见表9和图16),远短于观察到的消除半衰期时间(4至8小时;参见图16)。因此,考虑到IL-2的临床剂量较低,在分布期的半衰期可以作为功能半衰期。与未聚乙二醇修饰的IL-2(DP006-A)相比,上述聚乙二醇修饰的IL-2(DP630a或 DP006-A-30)的稳定性和PK曲线的改善更加显著。

[0592] 8.结论

[0593] 本研究表明,与DP006-A相比,在静脉或皮下给药后DP630a(DP006-A-30)具有更高的稳定性和更长的暴露时间,提示聚乙二醇化可以提高蛋白稳定性,并有助于获得修饰IL-2蛋白的首选PK谱。

[0594] 实施例9 LC-MS/MS法测定DP006-A-30的PEG偶联位点

[0595] 本研究采用液相色谱-串联质谱联用技术(LC-MS/MS)测定聚乙二醇(PEG)在DP006-A-30(PEG-30K-IL-2A1)中的结合位点。用胰蛋白酶作图和Glu-C酶切检测蛋白的一级结构。聚乙二醇结合物的加入使肽的质荷比和保留时间发生变化,导致保留时间内信号强度降低或丢失,通过比较聚乙二醇化酶消化样品和未聚乙二醇化酶消化样品中肽的信号强度来确定聚乙二醇化的位置。因此,与未聚乙二醇化蛋白的肽图谱相比,聚乙二醇化蛋白的肽图谱中信号强度较低或丢失的肽是聚乙二醇化肽。通过比较胰蛋白酶酶切和 Glu-C酶切所鉴定的聚乙二醇化肽,发现并确定了聚乙二醇化及其位置。通过对聚乙二醇修饰肽的MS/MS谱图的进一步研究,也证实了聚乙二醇偶联物的存在并确定了其偶联位点。本研究结果表明,DP006-A-30的PEG偶联位点位于Q43。

[0596] 1.研究设计

[0597] 为了确定DP006-A-30(DP006-A大小约15kDa,DP006-A-30大小约45kDa)的PEG偶联位点,对DP006-A(IL-2A1)和DP006-A-30(PEG-30K-IL-2A1)进行了胰蛋白酶酶切和 Glu-C酶切的肽图分析。比较聚乙二醇化样品酶切和未聚乙二醇化样品酶切酶切肽的信号强度。某肽信号强度较低表明该肽被聚乙二醇化。由于谷氨酰胺(Q)是聚乙二醇化的指定氨基酸,结合胰蛋白酶酶切和Glu-C酶切的结果,将聚乙二醇化定位并归属于单个谷氨酰胺。通过对聚乙二醇化肽的MS/MS谱的研究,证实了聚乙二醇偶联物的存在并确定了其位置。

[0598] 2.材料和方法

[0599] 2.1试验材料

[0600] 这项研究是在Alliance Pharma(宾夕法尼亚州马尔文)进行的。DP006-A和DP006-A-30 由CSPC Dophen提供。见表11。

[0601] 表11.材料

[0602]

| | | |
|---|---|---|
| 试验材料: | DP006-A | 未聚乙二醇化IL-2A1,0.5 mg/ml |
| | DP006-A-30 | 聚乙二醇化DP006-A,0.5mg/ml |
| 储存条件: | 测试前保持在-80℃ | |

[0603] 2.2肽图谱的样品制备

[0604] 将含有50μg DP006-A或DP006-A-30等份样品放置在Speed Vac中,以将体积降至约25μL。在每个样品中加入25μL在50mM碳酸氢铵中含量为1%RapiGest以达到每个样品中1%RapiGest的最终浓度。样品加入2.5μL的1M二硫苏糖醇(DTT)将其还原并在 60℃温育1小时。然后加入8μL 1M碘乙酰胺(IAA)将样品烷基化,并在室温黑暗中孵育30分钟。然后将

处理后的样品等分放入两个试管中,以酶与蛋白1:20的比例进行胰蛋白酶酶切或Glu-C酶切。样品在37℃温育过夜,用10%三氟乙酸酸化并进行离心终止反应。收集上清液,用LC-MS/MS进行分析。

[0605] 2.3 LC-MS/MS法

[0606] 电喷雾质谱(ESI-MS)是在安捷伦6545XT QTOF质谱仪上进行的,在正离子模式下操作,见表12-14。收集质荷比(m/z)范围为250-2000的全扫描MS数据收集。对观察到的前三种前体(潜在的聚乙二醇化肽)进行MS/MS扫描。

[0607] 表12.LC-MS/MS仪器及软件

[0608]

| | |
|---|---|
| **自动喷油器/控制器/泵:** | 安捷伦 1290 Infinity II |
| **高效液相色谱柱(s):** | Waters Acquity UPLC Peptide BEH C18 柱, 300 Å, 1.7μm, 2.1mm x 150 mm |
| **质谱仪:** | 安捷伦 6545XT AdvanceBio QTOF 质谱仪 |

[0609] 表13.洗脱程序

[0610]

| **时间(分钟)** | **流动相** | |
|---|---|---|
| | **%A** | **%B** |
| 0 | 98 | 2 |
| 1 | 98 | 2 |
| 30 | 55 | 45 |
| 40 | 5 | 95 |
| 42 | 5 | 95 |
| 42.1 | 98 | 2 |
| 52 | 98 | 2 |
| **流动相 A:** | 0.1%甲酸(FA) | |
| **流动相 B:** | 0.1%FA 在乙腈中 | |
| **HPLC 流速:** | 0.2ml/min | |

[0611] 表14.离子源和离子透镜参数

[0612]

| | | | |
|---|---|---|---|
| **质谱离子源** | 双 AJS ESI | **VCap** | 4000 伏 |
| **气体温度** | 290°C | **碎裂体** | 175 伏 |

[0613]

| | | | |
|---|---|---|---|
| **气体流量** | 13 升/分。 | **撇渣器** | 65 伏 |
| **雾化器** | 35 psi | **章鱼射频峰值** | 750 伏 |

[0614] 2.4数据分析

[0615] 使用数据库中的Protein Metrics进行肽图谱数据库搜索。使用包含DP006-A序列的数据库。有关数据库检索参数,请参见表15。其余未鉴定的序列通过全扫描质谱(MS1) 进行准确的质量提取以实现全序列覆盖。

[0616] 表15.数据库检索参数

[0617]

| | |
|---|---|
| **软件** | 蛋白计量学 |
| **裂解位点(s)** | RK 代表胰蛋白酶或 DE 代表 GluC |
| **裂解侧端** | C 端 |
| **消化特异性** | 完全**特异**(最快) |
| **未酶切位点(missed cleavages)** | 2 |
| **前体质量偏差** | 20 ppm |
| **碎片类型** | QTOF/HCD |
| **片段质量偏差** | 20 ppm |
| **重新校准(从预览)** | 无 |
| **重新校准(锁定质量)** | 无 |
| **固定和可变修饰** | 氨基甲基/+57.021464@C \|固定 |
| | 脱酰化/+0.984016@N,Q \| rare1 |
| | 氧化/+15.994915@C,M,W \| rare1 |
| **总公共最大值(Total common max)** | 2 |
| **总稀有最大值(Total rare max)** | 1 |
| **最大前体质量** | 10000 |
| **前体和电荷分配** | 从 MS1 计算 |

[0618] 3.结果和讨论

[0619] 3.1胰蛋白酶酶切DP006-A和DP006-A-30的多肽图谱

[0620] 图19显示了DP006-A和DP006-A-30在胰蛋白酶消化下的序列覆盖范围。结合MS1精确质量提取(表16),实现了100％的序列覆盖率。

[0621] 表16.用胰蛋白酶消化DP006-A和DP006-A-30的肽及其保留时间、质量和峰强度的列表

[0622]

| **从-到(aa残基)** | **序列** | **保留时间(分钟)** | **观测质量(Da)** | **理论质量(Da)** | **PPM** | **峰值强度** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | **DP006A** | **DP006A-30** |

[0623]

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1-7 | PTSSSTK (SEQ ID NO: 31) | 2.6 | 706.3515 | 706.3497 | 2.5 | 8.79E+04 | 1.85E+05 |
| 9-34 | TQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPK (SEQ ID NO: 32) | 28.6 | 3062.6577 | 3062.6587 | -0.3 | 1.49E+04 | 1.01E+05 |
| 35-37 | LTR (SEQ ID NO: 33) | 3.7 | 388.2428 | 388.2434 | -1.5 | 2.30E+05 | 8.34E+05 |
| 38-42 | MLTFK (SEQ ID NO: 34) | 14.0 | 638.3484 | 638.3462 | 3.4 | 8.42E+05 | 7.81E+05 |
| **43-47** | **QYMPK** (SEQ ID NO: 35) | **8.5** | **665.3228** | **665.3207** | **3.1** | **1.42E+06** | **4.00E+04** |
| 48-53 | KATELK (SEQ ID NO: 36) | 5.0 | 688.4152 | 688.4119 | 4.8 | 7.16E+05 | 1.23E+06 |
| 54-75 | HLQCLEEELKP LEEVLNLAQSK (SEQ ID NO: 37) | 24.2 | 2619.3644 | 2619.3578 | 2.5 | 1.51E+06 | 1.62E+06 |
| 76-82 | NFHLRPR (SEQ ID NO: 38) | 9.5 | 938.5229 | 938.5199 | 3.1 | 1.62E+06 | 1.63E+06 |
| 83-96 | DLISNINVIVLELK (SEQ ID NO: 39) | 26.6 | 1581.9372 | 1581.9342 | 1.9 | 2.42E+05 | 3.54E+05 |
| 97-119 | GSETTFMCEYA DETATIVEFLNR (SEQ ID NO: 40) | 26.4 | 2683.1637 | 2683.1782 | -5.4 | 3.34E+04 | 1.89E+04 |
| 120-132 | WITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 41) | 25.5 | 1495.7896 | 1495.7922 | -1.8 | 2.25E+05 | 6.66E+05 |

[0624] 图20显示了DP006-A和DP006-A-30在胰蛋白酶酶切下的基峰色谱图。对应于P43-47 肽,DP006-A-30色谱在8.5min处峰值缺失(见箭头),表明聚乙二醇化蛋白酶切中该肽的强度远低于未聚乙二醇化蛋白酶切。这提示该P43-47肽存在潜在的聚乙二醇化位点,该位点应位于指定氨基酸谷氨酰胺(Q43)上。每种胰蛋白酶肽的详细强度比较列于表16。在聚乙二醇化的样品酶切中,只有P43-47肽显示出较低的强度,证实聚乙二醇化的样品中 PEG与该P43-47肽结合,并且该结合仅存在于该肽中。

[0625] 通过人工调查鉴定了P43-47的聚乙二醇化形式。观察到一系列质量差为44Da(一个 PEG单位的质量)的离子。如图21所示,它们只存在于聚乙二醇化的样品中,并且由于聚乙二醇化的多肽是不均匀的,所以强度较低。它们的MS1和MS/MS光谱的例子如图22 和图23所示,其中44Da间距表明存在聚乙二醇化反应。根据MS/MS谱中鉴定的片段,聚乙二醇化的位置确定在p43-47的谷氨酰胺(Q43)上。

[0626] 3.2 Glu-C酶切DP006-A和DP006-A-30的多肽图谱

[0627] 图24显示了Glu-C消化的DP006-A和DP006-A-30的序列覆盖范围。结合MS1精确质量提取(表17),实现了100%的序列覆盖率。

[0628] 表17.用Glu-C消化DP006-A和DP006-A-30的肽及其保留时间、质量和峰强度的列表

[0629]

| 从-到 (aa 残基) | 序列 | 保留时间 (分钟) | 观测质量 (Da) | 理论质量 (Da) | PPM | 峰值强度 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | DP006A | DP006A-30 |
| 1-14 | PTSSSTKKTQLQLE (SEQ ID NO: 42) | 10.9 | 1546.8225 | 1546.8203 | 1.4 | 5.12E+05 | 7.14E+05 |
| **15-51** | **HLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKQYMPKKATE** (SEQ ID NO: 43) | **23.3** | **4417.4152** | **4417.3840** | **7.1** | **4.51E+03** | **ND** |
| 52-61 | LKHLQCLEEE (SEQ ID NO: 44) | 11.4 | 1297.6386 | 1297.6336 | 3.8 | 1.65E+06 | 1.65E+06 |
| 62-67 | LKPLEE (SEQ ID NO: 45) | 11.0 | 727.4167 | 727.4116 | 7.0 | 1.63E+06 | 1.67E+06 |
| 68-94 | VLNLAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLE (SEQ ID NO: 46) | 21.5 | 3114.7705 | 3114.7666 | 1.3 | 1.51E+05 | 1.63E+06 |
| 95-99 | LKGSE (SEQ ID NO: 47) | 3.8 | 532.2844 | 532.2857 | -2.4 | 8.84E+04 | 1.16E+05 |
| 100-105 | TTFMCE (SEQ ID NO: 48) | 13.1 | 787.2912 | 787.2881 | 3.9 | 3.25E+04 | 4.28E+04 |
| 106-109 | YADE (SEQ ID NO: 49) | 5.3 | 1265.4608 | 1265.4580 | 2.2 | 8.57E+05 | 1.06E+06 |
| 110-115 | TATIVE (SEQ ID NO: 50) | 10.8 | 632.3395 | 632.3381 | 2.2 | 1.67E+06 | 1.66E+06 |
| 116-132 | FLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 51) | 27.2 | 2026.0891 | 2026.0888 | 0.1 | 4.57E+05 | 1.65E+06 |

[0630] 图25显示了DP006-A和DP006-A-30的Glu-C酶切基峰色谱图(BPC)。虽然在BPC 中没有明显的缺失峰,但对每个Glu-C消化肽的详细强度比较(表17)显示,P15-51在聚乙二醇化的样品消化液中没有识别出来,而其他肽在聚乙二醇化和未聚乙二醇化的样品酶切中都有类似的强度。这表明该P15-51肽存在潜在的聚乙二醇化位点,与胰蛋白酶酶切鉴定的聚乙二醇化位点一致。

[0631] 4.结论

[0632] 根据DP006-A和DP006-A30的胰蛋白酶和Glu-C酶切的肽图谱数据,以及提取的离子色谱、MS1和MS/MS光谱的研究,将PEG偶联到DP006-A-30的单个谷氨酰胺(Q43) 上,如表18所示。

[0633] 表18.DP006-A-30的聚乙二醇化位点

[0634]

| | |
|---|---|
| **DP006-A-30** | PTSSSTKKTQLQLE**HLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFK*Q*YMPK**KAT ELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT** (SEQ ID NO: 2) |
| ***Q***: 聚乙二醇化位点<br>下划线：聚乙二醇化胰蛋白酶肽<br>**加粗**：聚乙二醇化 Glu-C 肽 | |

[0635] 序列表

[0636] SEQ ID NO:1(阿地白介素人重组IL-2氨基酸序列)

[0637] PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL T

[0638] SEQ ID NO:2(IL-2(A1)突变(F43Q)氨基酸序列)

[0639] PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKQYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL T

[0640] SEQ ID NO:3(IL-2(A2)突变(IFKQTY)氨基酸序列)

[0641] PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLIFKQTYPKKATELKHLQCLEEELKPL EE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

[0642] SEQ ID NO:4(IL-2(A3)突变(R37Q)氨基酸序列)

[0643] PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTQMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL T

[0644] SEQ ID NO:5(IL-2(A4)突变(F41Q)氨基酸序列)

[0645] PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTQKFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL T

[0646] SEQ ID NO:6(IL-2(A5)突变(K42Q)氨基酸序列)

[0647] PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFQFYMPKKATELKHLQCLEEELKP LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL T

[0648] SEQ ID NO:7(IL-2(A6)突变(Y44Q)氨基酸序列)

[0649] PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFQMPKKATELKHLQCLEEELKP LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL T

[0650] SEQ ID NO:8(IL-2(A8)突变(R37Q,Y44Q)氨基酸序列)

[0651] PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTQMLTFKFQMPKKATELKHLQCLEEELKP LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL T

[0652] SEQ ID NO:9(外源补丁氨基酸序列)

[0653] LEEQAA

[0654] SEQ ID NO:10(外源补丁氨基酸序列)

[0655] IFKQTY

[0656] SEQ ID NO:11(外源补丁氨基酸序列)

[0657] PKEQKY

[0658] SEQ ID NO:12(外源补丁氨基酸序列)

[0659] VIQGV

[0660] SEQ ID NO:13(外源补丁氨基酸序列)

[0661] REEQFN

[0662] SEQ ID NO:14(外源补丁氨基酸序列)

[0663] GLLQGA

[0664] SEQ ID NO:15(IL-2(A9)突变(LEEQAA)氨基酸序列)

[0665] PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLLEEQAAPKKATELKHLQCLEEELKP LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL T

[0666] SEQ ID NO:16(IL-2(A10)突变(PKEQKY)氨基酸序列)

[0667] PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKEQKYLKHLQCLEEELKP LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL T

[0668] SEQ ID NO:17(IL-2(A11)突变(VIQGV)氨基酸序列)

[0669] PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTVIQGVPKKATELKHLQCLEEELKP LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL T

[0670] SEQ ID NO:18(IL-2(A12)突变(REEQFN)氨基酸序列)

[0671] PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLREEQFNPKKATELKHLQCLEEELKP LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL T

[0672] SEQ ID NO:19(IL-2(A13)突变(GLLQGA)氨基酸序列)

[0673] PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLGLLQGAPKKATELKHLQCLEEELKP LEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL T

[0674] SEQ ID NO:20(拉达卡链霉菌TGase(TG_SL)氨基酸序列)

[0675] DSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGV TWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHDE GAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKDRNG GNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYG DPEAFRPDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPG ESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYES KFRNWSDGYSDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWP

[0676] SEQ ID NO:21(基于拉达卡链霉菌(TG_SL)氨基酸序列)

[0677] PDSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVG VTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHD EGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKDRNG GNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKY GDPEAFRPDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYES KFRNWSDGYSDFDRG AYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWPLEHHHHHHHH

[0678] SEQ ID NO:22(莫巴拉链霉菌TGase(TG_SM)氨基酸序列)

[0679] DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY GCVGV TWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDE SAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGN HDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYG DPDAFRPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESK FRNWSEGYSDFDRGAY VITFIPKSWNTAPDKVKQGWP

[0680] SEQ ID NO:23(人前体IL-2蛋白氨基酸序列)

[0681] MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKF YMP

KKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF CQSIISTLT

[0682] SEQ ID NO:24(人成熟IL-2蛋白氨基酸序列)

[0683] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELK PLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIIST LT

[0684] SEQ ID NO:25(X可以是任意氨基酸残基)

[0685] XXXXQX

[0686] SEQ ID NO:26(X可以是任意氨基酸残基)

[0687] QXXXXX

[0688] SEQ ID NO:27

[0689] 尼肯普克

[0690] SEQ ID NO:28(X可以是任意氨基酸残基)

[0691] XXX

[0692] SEQ ID NO:29(X可以是任意氨基酸残基)

[0693] QXX

[0694] SEQ ID NO:30(X可以是任意氨基酸残基)

[0695] QXXXQX

[0696] SEQ ID NO:31

[0697] PTSSSTK

[0698] SEQ ID NO:32

[0699] TQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPK

[0700] SEQ ID NO:33

[0701] LTR

[0702] SEQ ID NO:34

[0703] MLTFK

[0704] SEQ ID NO:35

[0705] QYMPK

[0706] SEQ ID NO:36

[0707] KATELK

[0708] SEQ ID NO:37

[0709] HLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK

[0710] SEQ ID NO:38

[0711] NFHLRPR

[0712] SEQ ID NO:39

[0713] DLISNINVIVLELK

[0714] SEQ ID NO:40

[0715] GSETTFMCEYADETATIVEFLNR

[0716] SEQ ID NO:41

[0717] WITFSQSIISTLT

[0718] SEQ ID NO:42

[0719] PTSSSTKKTQLQLE

[0720] SEQ ID NO:43

[0721] HLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKQYMPKKATE

[0722] SEQ ID NO:44

[0723] LKHLQCLEEE

[0724] SEQ ID NO:45

[0725] LKPLEE

[0726] SEQ ID NO:46

[0727] VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE

[0728] SEQ ID NO:47

[0729] LKGSE

[0730] SEQ ID NO:48

[0731] TTFMCE

[0732] SEQ ID NO:49

[0733] YADE

[0734] SEQ ID NO:50

[0735] TATIVE

[0736] SEQ ID NO:51

[0737] FLNRWITFSQSIISTLT

[0001] 序列表

[0002] <110> 石药集团德丰有限公司

[0003] <120> 修饰的IL-2蛋白、PEG偶联物及其用途

[0004] <130> 72069-20004.40

[0005] <150> US 62/864,372

[0006] <151> 2019-06-20

[0007] <160> 51

[0008] <170> FastSEQ for Windows Version 4.0

[0009] <210> 1

[0010] <211> 132

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0013] <220>

[0014] <223> 合成构建体

[0015] <400> 1

[0016] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

[0017] 1 5 10 15

[0018] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

[0019] 20 25 30

[0020] Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys

[0021] 35 40 45

[0022] Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

[0023] 50 55 60

[0024] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

[0025] 65 70 75 80

[0026] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

[0027] 85 90 95

[0028] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr

[0029] 100 105 110

[0030] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile

[0031] 115 120 125

[0032] Ser Thr Leu Thr

[0033] 130

[0034] <210> 2

[0035] <211> 132

[0036] <212> PRT

[0037] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0038] <220>

[0039] <223> 合成构建体

[0040] <400> 2

[0041] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

[0042] 1 5 10 15

[0043] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

[0044] 20 25 30

[0045] Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Gln Tyr Met Pro Lys Lys

[0046] 35 40 45

[0047] Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

[0048] 50 55 60

[0049] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

[0050] 65 70 75 80

[0051] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

[0052] 85 90 95

[0053] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr

[0054] 100 105 110

[0055] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile

[0056] 115 120 125

[0057] Ser Thr Leu Thr

[0058] 130

[0059] <210> 3

[0060] <211> 132

[0061] <212> PRT

[0062] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0063] <220>

[0064] <223> 合成构建体

[0065] <400> 3

[0066] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

[0067] 1 5 10 15

[0068] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

[0069] 20 25 30

[0070] Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Pro Lys Lys

[0071] 35 40 45

[0072] Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

[0073] 50 55 60

[0074] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

[0075] 65 70 75 80

[0076] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

[0077] 85 90 95

[0078] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
[0079] 100 105 110
[0080] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
[0081] 115 120 125
[0082] Ser Thr Leu Thr
[0083] 130
[0084] <210> 4
[0085] <211> 132
[0086] <212> PRT
[0087] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0088] <220>
[0089] <223> 合成构建体
[0090] <400> 4
[0091] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
[0092] 1 5 10 15
[0093] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
[0094] 20 25 30
[0095] Pro Lys Leu Thr Gln Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
[0096] 35 40 45
[0097] Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
[0098] 50 55 60
[0099] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
[0100] 65 70 75 80
[0101] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
[0102] 85 90 95
[0103] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
[0104] 100 105 110
[0105] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
[0106] 115 120 125
[0107] Ser Thr Leu Thr
[0108] 130
[0109] <210> 5
[0110] <211> 132
[0111] <212> PRT
[0112] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0113] <220>
[0114] <223> 合成构建体
[0115] <400> 5
[0116] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

[0117] 1 5 10 15

[0118] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

[0119] 20 25 30

[0120] Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Gln Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys

[0121] 35 40 45

[0122] Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

[0123] 50 55 60

[0124] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

[0125] 65 70 75 80

[0126] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

[0127] 85 90 95

[0128] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr

[0129] 100 105 110

[0130] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile

[0131] 115 120 125

[0132] Ser Thr Leu Thr

[0133] 130

[0134] <210> 6

[0135] <211> 132

[0136] <212> PRT

[0137] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0138] <220>

[0139] <223> 合成构建体

[0140] <400> 6

[0141] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

[0142] 1 5 10 15

[0143] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

[0144] 20 25 30

[0145] Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Gln Phe Tyr Met Pro Lys Lys

[0146] 35 40 45

[0147] Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

[0148] 50 55 60

[0149] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

[0150] 65 70 75 80

[0151] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

[0152] 85 90 95

[0153] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr

[0154] 100 105 110

[0155] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile

[0156] 115 120 125

[0157] Ser Thr Leu Thr

[0158] 130

[0159] <210> 7

[0160] <211> 132

[0161] <212> PRT

[0162] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0163] <220>

[0164] <223> 合成构建体

[0165] <400> 7

[0166] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

[0167] 1 5 10 15

[0168] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

[0169] 20 25 30

[0170] Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Gln Met Pro Lys Lys

[0171] 35 40 45

[0172] Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

[0173] 50 55 60

[0174] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

[0175] 65 70 75 80

[0176] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

[0177] 85 90 95

[0178] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr

[0179] 100 105 110

[0180] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile

[0181] 115 120 125

[0182] Ser Thr Leu Thr

[0183] 130

[0184] <210> 8

[0185] <211> 132

[0186] <212> PRT

[0187] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0188] <220>

[0189] <223> 合成构建体

[0190] <400> 8

[0191] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

[0192] 1 5 10 15

[0193] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

[0194] 20 25 30

[0195] Pro Lys Leu Thr Gln Met Leu Thr Phe Lys Phe Gln Met Pro Lys Lys
[0196] 35 40 45
[0197] Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
[0198] 50 55 60
[0199] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
[0200] 65 70 75 80
[0201] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
[0202] 85 90 95
[0203] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
[0204] 100 105 110
[0205] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
[0206] 115 120 125
[0207] Ser Thr Leu Thr
[0208] 130
[0209] <210> 9
[0210] <211> 6
[0211] <212> PRT
[0212] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0213] <220>
[0214] <223> 合成构建体
[0215] <400> 9
[0216] Leu Glu Glu Gln Ala Ala
[0217] 1 5
[0218] <210> 10
[0219] <211> 6
[0220] <212> PRT
[0221] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0222] <220>
[0223] <223> 合成构建体
[0224] <400> 10
[0225] Ile Phe Lys Gln Thr Tyr
[0226] 1 5
[0227] <210> 11
[0228] <211> 6
[0229] <212> PRT
[0230] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0231] <220>
[0232] <223> 合成构建体
[0233] <400> 11

[0234] Pro Lys Glu Gln Lys Tyr

[0235] 1 5

[0236] <210> 12

[0237] <211> 5

[0238] <212> PRT

[0239] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0240] <220>

[0241] <223> 合成构建体

[0242] <400> 12

[0243] Val Ile Gln Gly Val

[0244] 1 5

[0245] <210> 13

[0246] <211> 6

[0247] <212> PRT

[0248] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0249] <220>

[0250] <223> 合成构建体

[0251] <400> 13

[0252] Arg Glu Glu Gln Phe Asn

[0253] 1 5

[0254] <210> 14

[0255] <211> 6

[0256] <212> PRT

[0257] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0258] <220>

[0259] <223> 合成构建体

[0260] <400> 14

[0261] Gly Leu Leu Gln Gly Ala

[0262] 1 5

[0263] <210> 15

[0264] <211> 132

[0265] <212> PRT

[0266] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0267] <220>

[0268] <223> 合成构建体

[0269] <400> 15

[0270] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

[0271] 1 5 10 15

[0272] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

[0273] 20 25 30

[0274] Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Leu Glu Glu Gln Ala Ala Pro Lys Lys

[0275] 35 40 45

[0276] Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

[0277] 50 55 60

[0278] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

[0279] 65 70 75 80

[0280] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

[0281] 85 90 95

[0282] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr

[0283] 100 105 110

[0284] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile

[0285] 115 120 125

[0286] Ser Thr Leu Thr

[0287] 130

[0288] <210> 16

[0289] <211> 132

[0290] <212> PRT

[0291] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0292] <220>

[0293] <223> 合成构建体

[0294] <400> 16

[0295] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

[0296] 1 5 10 15

[0297] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

[0298] 20 25 30

[0299] Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Glu

[0300] 35 40 45

[0301] Gln Lys Tyr Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

[0302] 50 55 60

[0303] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

[0304] 65 70 75 80

[0305] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

[0306] 85 90 95

[0307] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr

[0308] 100 105 110

[0309] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile

[0310] 115 120 125

[0311] Ser Thr Leu Thr

[0312] 130

[0313] <210> 17

[0314] <211> 132

[0315] <212> PRT

[0316] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0317] <220>

[0318] <223> 合成构建体

[0319] <400> 17

[0320] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

[0321] 1 5 10 15

[0322] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

[0323] 20 25 30

[0324] Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Val Ile Gln Gly Val Pro Lys Lys

[0325] 35 40 45

[0326] Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

[0327] 50 55 60

[0328] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

[0329] 65 70 75 80

[0330] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

[0331] 85 90 95

[0332] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr

[0333] 100 105 110

[0334] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile

[0335] 115 120 125

[0336] Ser Thr Leu Thr

[0337] 130

[0338] <210> 18

[0339] <211> 132

[0340] <212> PRT

[0341] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0342] <220>

[0343] <223> 合成构建体

[0344] <400> 18

[0345] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

[0346] 1 5 10 15

[0347] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

[0348] 20 25 30

[0349] Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Arg Glu Glu Gln Phe Asn Pro Lys Lys

[0350] 35 40 45

[0351] Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
[0352] 50 55 60
[0353] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
[0354] 65 70 75 80
[0355] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
[0356] 85 90 95
[0357] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
[0358] 100 105 110
[0359] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
[0360] 115 120 125
[0361] Ser Thr Leu Thr
[0362] 130
[0363] <210> 19
[0364] <211> 132
[0365] <212> PRT
[0366] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0367] <220>
[0368] <223> 合成构建体
[0369] <400> 19
[0370] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
[0371] 1 5 10 15
[0372] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
[0373] 20 25 30
[0374] Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Gly Leu Leu Gln Gly Ala Pro Lys Lys
[0375] 35 40 45
[0376] Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
[0377] 50 55 60
[0378] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
[0379] 65 70 75 80
[0380] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
[0381] 85 90 95
[0382] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
[0383] 100 105 110
[0384] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
[0385] 115 120 125
[0386] Ser Thr Leu Thr
[0387] 130
[0388] <210> 20
[0389] <211> 331

[0390] <212> PRT

[0391] <213> 拉达卡链霉菌(Strep Ladakanum)

[0392] <400> 20

[0393] Asp Ser Asp Glu Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met

[0394] 1 5 10 15

[0395] Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Ile Val Asn

[0396] 20 25 30

[0397] Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg

[0398] 35 40 45

[0399] Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys

[0400] 50 55 60

[0401] Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu

[0402] 65 70 75 80

[0403] Ala Phe Ala Phe Phe Asp Glu Asp Lys Tyr Lys Asn Glu Leu Lys Asn

[0404] 85 90 95

[0405] Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val

[0406] 100 105 110

[0407] Ala Lys Asp Ser Phe Asp Glu Ala Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Asp

[0408] 115 120 125

[0409] Val Ala Ser Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Gly

[0410] 130 135 140

[0411] Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala

[0412] 145 150 155 160

[0413] Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn

[0414] 165 170 175

[0415] Thr Pro Ser Phe Lys Asp Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Lys

[0416] 180 185 190

[0417] Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg

[0418] 195 200 205

[0419] Ser Gly Ser Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Glu Ala Phe Arg

[0420] 210 215 220

[0421] Pro Asp Arg Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile

[0422] 225 230 235 240

[0423] Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Ser Phe Val Asn Phe Asp Tyr

[0424] 245 250 255

[0425] Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp

[0426] 260 265 270

[0427] Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met

[0428] 275 280 285

[0429] His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Asp Gly Tyr Ser Asp
[0430] 290 295 300
[0431] Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Val Thr Phe Val Pro Lys Ser Trp Asn
[0432] 305 310 315 320
[0433] Thr Ala Pro Asp Lys Val Thr Gln Gly Trp Pro
[0434] 325 330
[0435] <210> 21
[0436] <211> 342
[0437] <212> PRT
[0438] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0439] <220>
[0440] <223> 合成构建体
[0441] <400> 21
[0442] Pro Asp Ser Asp Glu Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg
[0443] 1 5 10 15
[0444] Met Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Ile Val
[0445] 20 25 30
[0446] Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly
[0447] 35 40 45
[0448] Arg Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly
[0449] 50 55 60
[0450] Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg
[0451] 65 70 75 80
[0452] Leu Ala Phe Ala Phe Phe Asp Glu Asp Lys Tyr Lys Asn Glu Leu Lys
[0453] 85 90 95
[0454] Asn Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg
[0455] 100 105 110
[0456] Val Ala Lys Asp Ser Phe Asp Glu Ala Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg
[0457] 115 120 125
[0458] Asp Val Ala Ser Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu
[0459] 130 135 140
[0460] Gly Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp
[0461] 145 150 155 160
[0462] Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg
[0463] 165 170 175
[0464] Asn Thr Pro Ser Phe Lys Asp Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser
[0465] 180 185 190
[0466] Lys Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp
[0467] 195 200 205

[0468] Arg Ser Gly Ser Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Glu Ala Phe
[0469] 210 215 220
[0470] Arg Pro Asp Arg Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn
[0471] 225 230 235 240
[0472] Ile Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Ser Phe Val Asn Phe Asp
[0473] 245 250 255
[0474] Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val
[0475] 260 265 270
[0476] Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala
[0477] 275 280 285
[0478] Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Asp Gly Tyr Ser
[0479] 290 295 300
[0480] Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Val Thr Phe Val Pro Lys Ser Trp
[0481] 305 310 315 320
[0482] Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Thr Gln Gly Trp Pro Leu Glu His His
[0483] 325 330 335
[0484] His His His His His His
[0485] 340
[0486] <210> 22
[0487] <211> 331
[0488] <212> PRT
[0489] <213> 莫巴拉链霉菌(Strep Mobaraensis)
[0490] <400> 22
[0491] Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met
[0492] 1 5 10 15
[0493] Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn
[0494] 20 25 30
[0495] Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg
[0496] 35 40 45
[0497] Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys
[0498] 50 55 60
[0499] Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu
[0500] 65 70 75 80
[0501] Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn
[0502] 85 90 95
[0503] Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val
[0504] 100 105 110
[0505] Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu
[0506] 115 120 125

[0507] Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser
[0508] 130 135 140
[0509] Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala
[0510] 145 150 155 160
[0511] Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn
[0512] 165 170 175
[0513] Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg
[0514] 180 185 190
[0515] Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg
[0516] 195 200 205
[0517] Ser Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg
[0518] 210 215 220
[0519] Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile
[0520] 225 230 235 240
[0521] Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr
[0522] 245 250 255
[0523] Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp
[0524] 260 265 270
[0525] Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met
[0526] 275 280 285
[0527] His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp
[0528] 290 295 300
[0529] Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn
[0530] 305 310 315 320
[0531] Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro
[0532] 325 330
[0533] <210> 23
[0534] <211> 153
[0535] <212> PRT
[0536] <213> 智人(homo sapiens)
[0537] <400> 23
[0538] Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
[0539] 1 5 10 15
[0540] Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
[0541] 20 25 30
[0542] Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
[0543] 35 40 45
[0544] Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
[0545] 50 55 60

[0546] Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
[0547] 65 70 75 80
[0548] Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
[0549] 85 90 95
[0550] Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
[0551] 100 105 110
[0552] Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
[0553] 115 120 125
[0554] Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
[0555] 130 135 140
[0556] Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
[0557] 145 150
[0558] <210> 24
[0559] <211> 133
[0560] <212> PRT
[0561] <213> 智人(homo sapiens)
[0562] <400> 24
[0563] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
[0564] 1 5 10 15
[0565] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
[0566] 20 25 30
[0567] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
[0568] 35 40 45
[0569] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
[0570] 50 55 60
[0571] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
[0572] 65 70 75 80
[0573] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
[0574] 85 90 95
[0575] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
[0576] 100 105 110
[0577] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
[0578] 115 120 125
[0579] Ile Ser Thr Leu Thr
[0580] 130
[0581] <210> 25
[0582] <211> 6
[0583] <212> PRT
[0584] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0585] <220>

[0586] <223> 合成构建体

[0587] <220>

[0588] <221> VARIANT

[0589] <222> 1, 2, 3, 4, 6

[0590] <223> Xaa = 任意氨基酸

[0591] <400> 25

[0592] Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa

[0593] 1 5

[0594] <210> 26

[0595] <211> 6

[0596] <212> PRT

[0597] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0598] <220>

[0599] <223> 合成构建体

[0600] <220>

[0601] <221> VARIANT

[0602] <222> 2, 3, 4, 5, 6

[0603] <223> Xaa = 任意氨基酸

[0604] <400> 26

[0605] Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

[0606] 1 5

[0607] <210> 27

[0608] <211> 6

[0609] <212> PRT

[0610] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0611] <220>

[0612] <223> 合成构建体

[0613] <400> 27

[0614] Asn Tyr Lys Asn Pro Lys

[0615] 1 5

[0616] <210> 28

[0617] <211> 3

[0618] <212> PRT

[0619] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0620] <220>

[0621] <223> 合成构建体

[0622] <220>

[0623] <221> VARIANT

[0624] <222> 1, 2, 3

[0625] <223> Xaa = 任意氨基酸

[0626] <400> 28

[0627] Xaa Xaa Xaa

[0628] 1

[0629] <210> 29

[0630] <211> 3

[0631] <212> PRT

[0632] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0633] <220>

[0634] <223> 合成构建体

[0635] <220>

[0636] <221> VARIANT

[0637] <222> 2, 3

[0638] <223> Xaa = 任意氨基酸

[0639] <400> 29

[0640] Gln Xaa Xaa

[0641] 1

[0642] <210> 30

[0643] <211> 6

[0644] <212> PRT

[0645] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0646] <220>

[0647] <223> 合成构建体

[0648] <220>

[0649] <221> VARIANT

[0650] <222> 2, 3, 4, 6

[0651] <223> Xaa = 任意氨基酸

[0652] <400> 30

[0653] Gln Xaa Xaa Xaa Gln Xaa

[0654] 1 5

[0655] <210> 31

[0656] <211> 7

[0657] <212> PRT

[0658] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0659] <220>

[0660] <223> 合成构建体

[0661] <400> 31

[0662] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys

[0663] 1 5

[0664] <210> 32

[0665] <211> 26

[0666] <212> PRT

[0667] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0668] <220>

[0669] <223> 合成构建体

[0670] <400> 32

[0671] Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu

[0672] 1 5 10 15

[0673] Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys

[0674] 20 25

[0675] <210> 33

[0676] <211> 3

[0677] <212> PRT

[0678] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0679] <220>

[0680] <223> 合成构建体

[0681] <400> 33

[0682] Leu Thr Arg

[0683] 1

[0684] <210> 34

[0685] <211> 5

[0686] <212> PRT

[0687] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0688] <220>

[0689] <223> 合成构建体

[0690] <400> 34

[0691] Met Leu Thr Phe Lys

[0692] 1 5

[0693] <210> 35

[0694] <211> 5

[0695] <212> PRT

[0696] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0697] <220>

[0698] <223> 合成构建体

[0699] <400> 35

[0700] Gln Tyr Met Pro Lys

[0701] 1 5

[0702] <210> 36
[0703] <211> 6
[0704] <212> PRT
[0705] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0706] <220>
[0707] <223> 合成构建体
[0708] <400> 36
[0709] Lys Ala Thr Glu Leu Lys
[0710] 1 5
[0711] <210> 37
[0712] <211> 22
[0713] <212> PRT
[0714] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0715] <220>
[0716] <223> 合成构建体
[0717] <400> 37
[0718] His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
[0719] 1 5 10 15
[0720] Asn Leu Ala Gln Ser Lys
[0721] 20
[0722] <210> 38
[0723] <211> 7
[0724] <212> PRT
[0725] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0726] <220>
[0727] <223> 合成构建体
[0728] <400> 38
[0729] Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
[0730] 1 5
[0731] <210> 39
[0732] <211> 14
[0733] <212> PRT
[0734] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0735] <220>
[0736] <223> 合成构建体
[0737] <400> 39
[0738] Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
[0739] 1 5 10
[0740] <210> 40

[0741] <211> 23
[0742] <212> PRT
[0743] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0744] <220>
[0745] <223> 合成构建体
[0746] <400> 40
[0747] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
[0748] 1 5 10 15
[0749] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg
[0750] 20
[0751] <210> 41
[0752] <211> 13
[0753] <212> PRT
[0754] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0755] <220>
[0756] <223> 合成构建体
[0757] <400> 41
[0758] Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
[0759] 1 5 10
[0760] <210> 42
[0761] <211> 14
[0762] <212> PRT
[0763] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0764] <220>
[0765] <223> 合成构建体
[0766] <400> 42
[0767] Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
[0768] 1 5 10
[0769] <210> 43
[0770] <211> 37
[0771] <212> PRT
[0772] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0773] <220>
[0774] <223> 合成构建体
[0775] <400> 43
[0776] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
[0777] 1 5 10 15
[0778] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Gln Tyr Met Pro
[0779] 20 25 30

[0780] Lys Lys Ala Thr Glu

[0781] 35

[0782] <210> 44

[0783] <211> 10

[0784] <212> PRT

[0785] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0786] <220>

[0787] <223> 合成构建体

[0788] <400> 44

[0789] Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu

[0790] 1 5 10

[0791] <210> 45

[0792] <211> 6

[0793] <212> PRT

[0794] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0795] <220>

[0796] <223> 合成构建体

[0797] <400> 45

[0798] Leu Lys Pro Leu Glu Glu

[0799] 1 5

[0800] <210> 46

[0801] <211> 27

[0802] <212> PRT

[0803] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0804] <220>

[0805] <223> 合成构建体

[0806] <400> 46

[0807] Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp

[0808] 1 5 10 15

[0809] Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu

[0810] 20 25

[0811] <210> 47

[0812] <211> 5

[0813] <212> PRT

[0814] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0815] <220>

[0816] <223> 合成构建体

[0817] <400> 47

[0818] Leu Lys Gly Ser Glu

[0819] 1 5

[0820] <210> 48

[0821] <211> 6

[0822] <212> PRT

[0823] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0824] <220>

[0825] <223> 合成构建体

[0826] <400> 48

[0827] Thr Thr Phe Met Cys Glu

[0828] 1 5

[0829] <210> 49

[0830] <211> 4

[0831] <212> PRT

[0832] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0833] <220>

[0834] <223> 合成构建体

[0835] <400> 49

[0836] Tyr Ala Asp Glu

[0837] 1

[0838] <210> 50

[0839] <211> 6

[0840] <212> PRT

[0841] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0842] <220>

[0843] <223> 合成构建体

[0844] <400> 50

[0845] Thr Ala Thr Ile Val Glu

[0846] 1 5

[0847] <210> 51

[0848] <211> 17

[0849] <212> PRT

[0850] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0851] <220>

[0852] <223> 合成构建体

[0853] <400> 51

[0854] Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu

[0855] 1 5 10 15

[0856] Thr

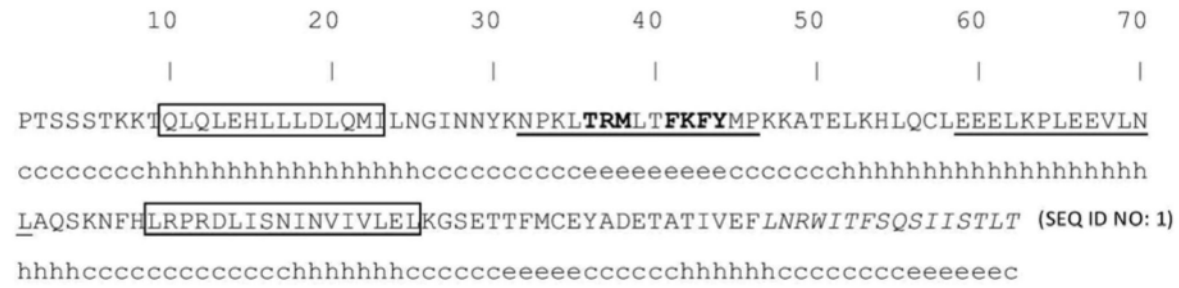

10 20 30 40 50 60 70
PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN
ccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhcccccccccceeeeeeeeecccccchhhhhhhhhhhhhhhhhh
LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 1)
hhhhccccccccccccchhhhhhhcccccceeeeecccccchhhhhhcccccccceeeeeec

图1

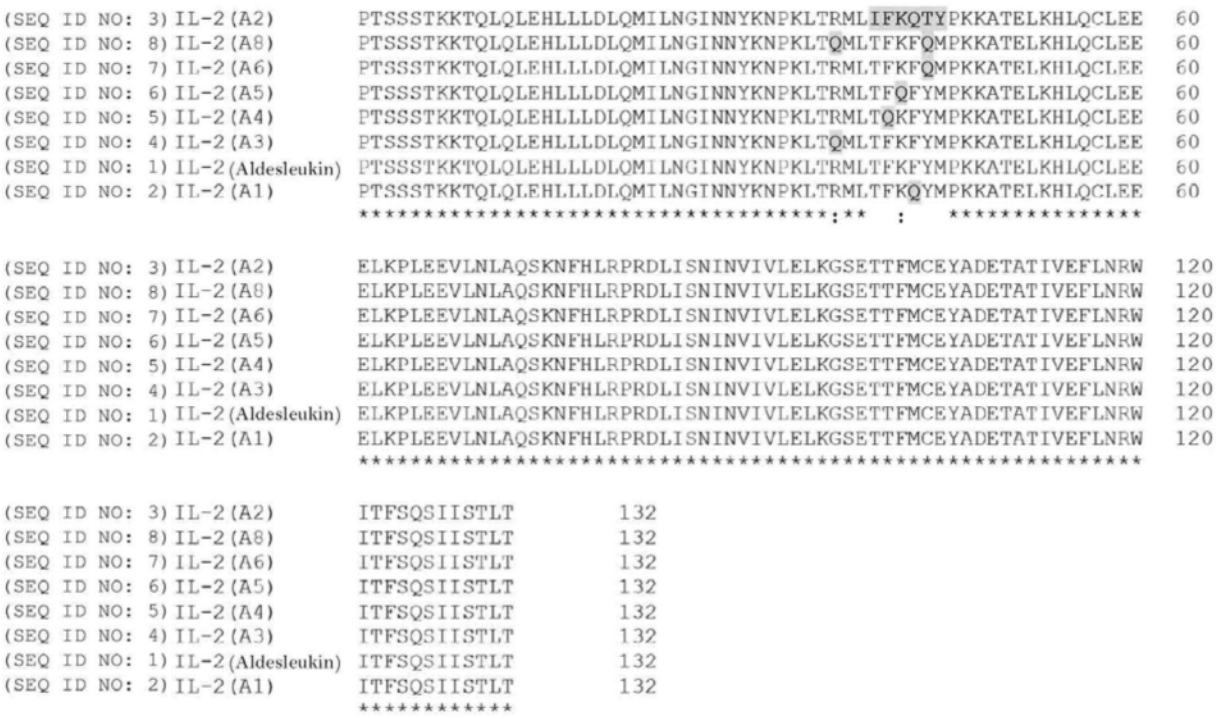
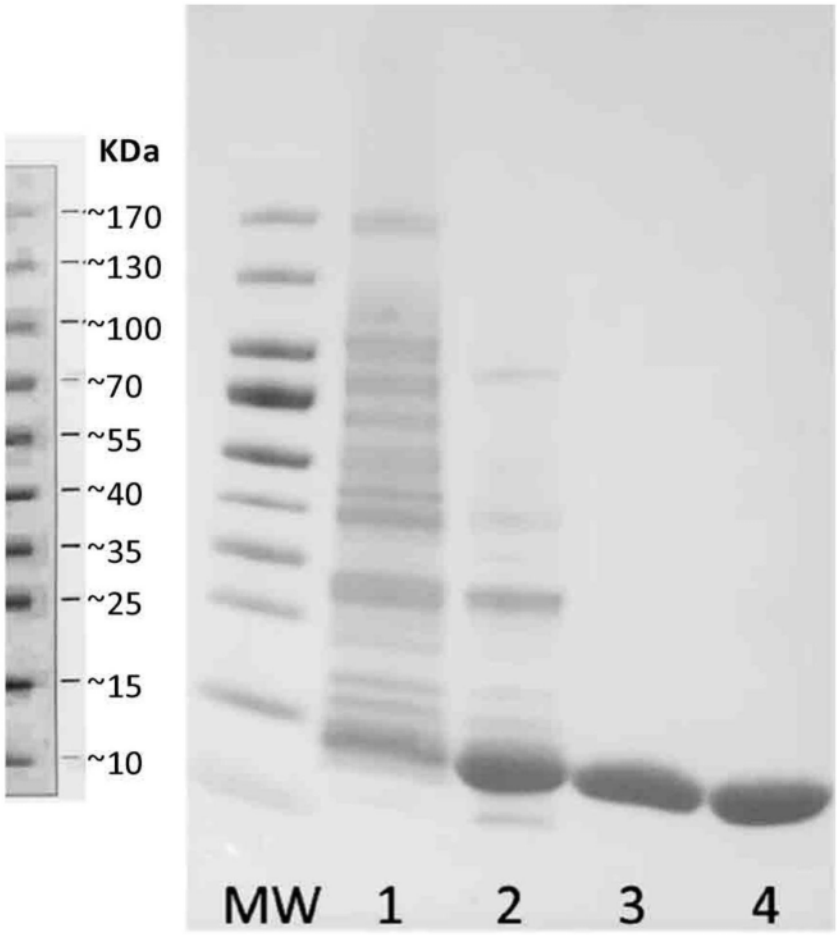
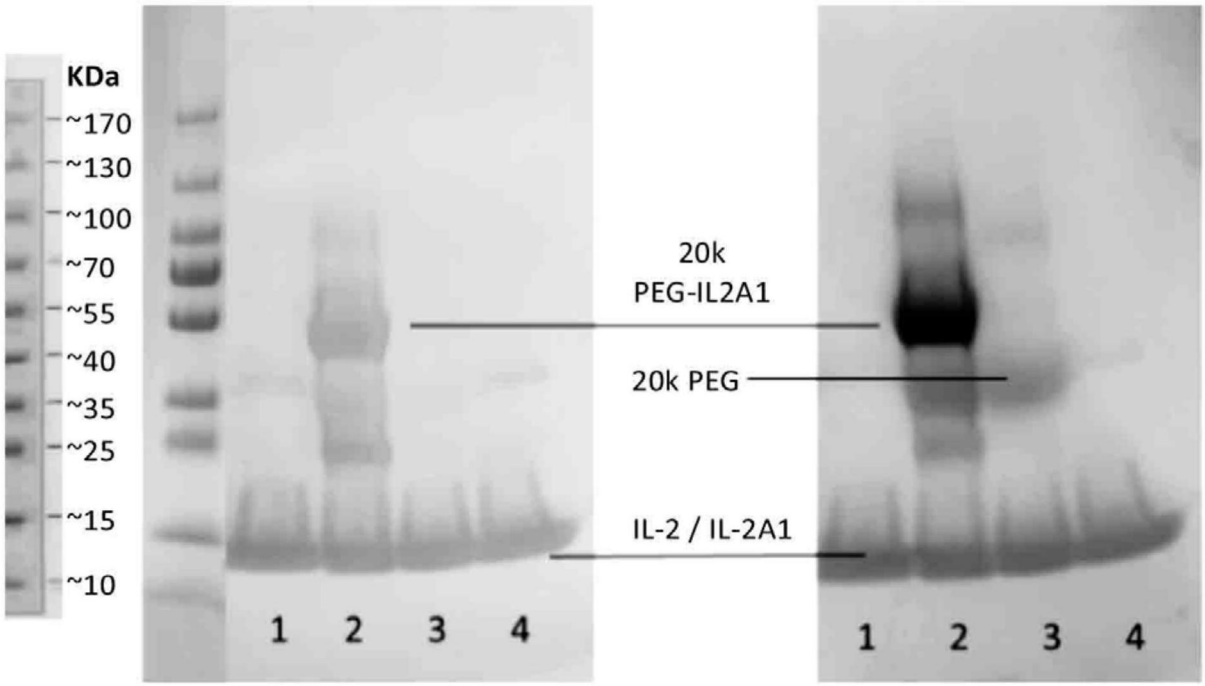

(SEQ ID NO: 3) IL-2(A2) PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLIFKQTYPKKATELKHLQCLEE 60
(SEQ ID NO: 8) IL-2(A8) PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTQMLTFKFQMPKKATELKHLQCLEE 60
(SEQ ID NO: 7) IL-2(A6) PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFQMPKKATELKHLQCLEE 60
(SEQ ID NO: 6) IL-2(A5) PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFQFYMPKKATELKHLQCLEE 60
(SEQ ID NO: 5) IL-2(A4) PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTQKFYMPKKATELKHLQCLEE 60
(SEQ ID NO: 4) IL-2(A3) PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTQMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE 60
(SEQ ID NO: 1) IL-2(Aldesleukin) PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE 60
(SEQ ID NO: 2) IL-2(A1) PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKQYMPKKATELKHLQCLEE 60
(SEQ ID NO: 3) IL-2(A2) ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW 120
(SEQ ID NO: 8) IL-2(A8) ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW 120
(SEQ ID NO: 7) IL-2(A6) ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW 120
(SEQ ID NO: 6) IL-2(A5) ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW 120
(SEQ ID NO: 5) IL-2(A4) ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW 120
(SEQ ID NO: 4) IL-2(A3) ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW 120
(SEQ ID NO: 1) IL-2(Aldesleukin) ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW 120
(SEQ ID NO: 2) IL-2(A1) ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW 120
(SEQ ID NO: 3) IL-2(A2) ITFSQSIISTLT 132
(SEQ ID NO: 8) IL-2(A8) ITFSQSIISTLT 132
(SEQ ID NO: 7) IL-2(A6) ITFSQSIISTLT 132
(SEQ ID NO: 6) IL-2(A5) ITFSQSIISTLT 132
(SEQ ID NO: 5) IL-2(A4) ITFSQSIISTLT 132
(SEQ ID NO: 4) IL-2(A3) ITFSQSIISTLT 132
(SEQ ID NO: 1) IL-2(Aldesleukin) ITFSQSIISTLT 132
(SEQ ID NO: 2) IL-2(A1) ITFSQSIISTLT 132

图2




1.大肠杆菌中 IL-2A1 的表达
2.纯化的 IL-2A1 内含体
3.纯化的 IL-2A1（DP006A）
4.纯化的 IL-2A2

图3




蛋白染色
（考马斯蓝染色）

PEG 染色
（钡-碘染色）

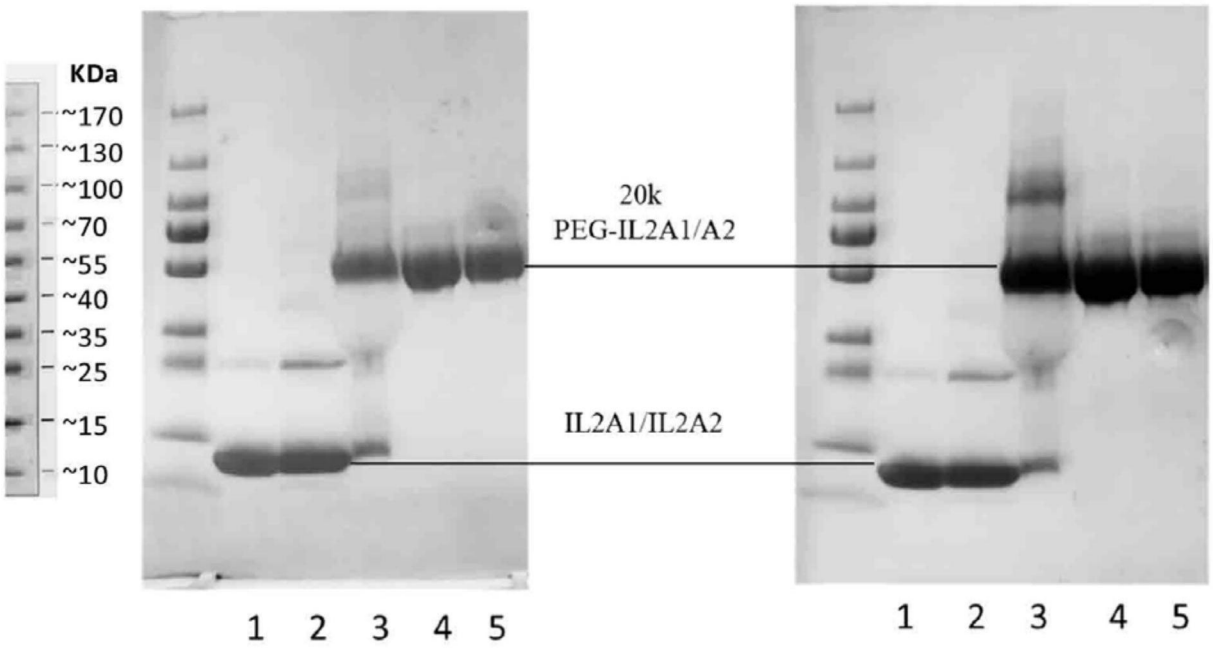
1.IL-2A1（DP006A）

2.20kDa PEG 化的 IL-2A1（DP006-A-20）

3.20kDa PEG 化的亲本 IL-2 (阿地白介素)

4.亲本 IL-2 (阿地白介素)

图4A

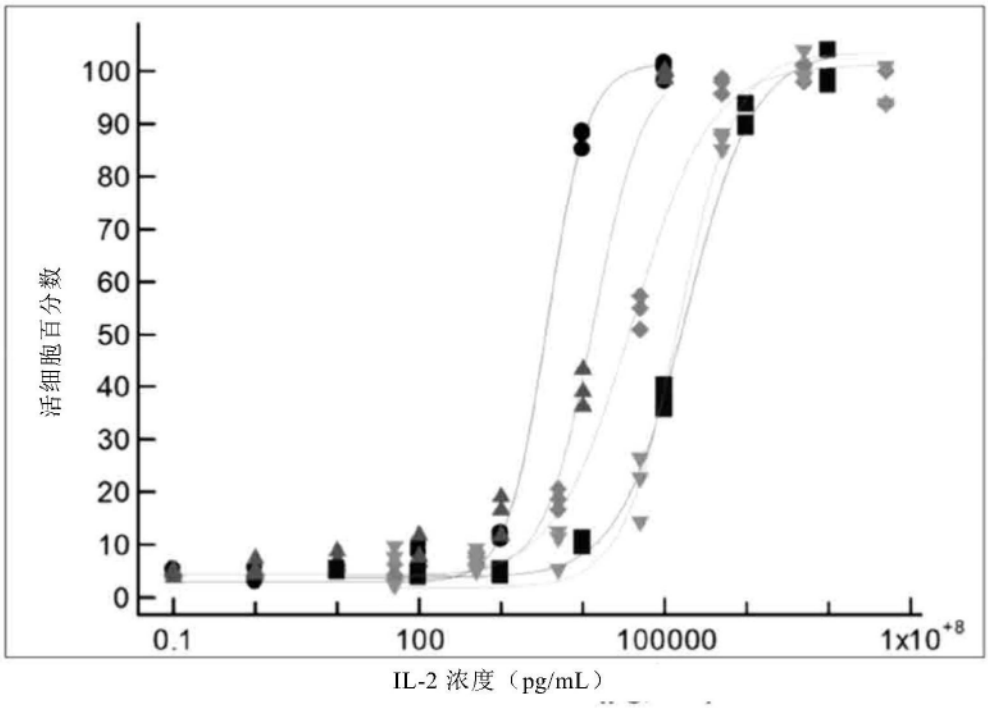



蛋白染色
（考马斯蓝染色）

PEG 染色
（钡-碘染色）

1.IL-2A1（DP006A）
2.IL-2A2
3.20kDa PEG 化的 IL-2A1 (DP006-A-20)
4.纯化的 20kDa PEG-IL-2A1 (DP006-A-20)
5.纯化的 20kDa PEG-IL-2A2

图4B




| | | EC50 (ng/mL IL-2) | EC50 (nM) | 降低倍数 对 IL-2 阿地白介素 |
|---|---|---|---|---|
| ● | IL-2 阿地白介素 | 3.7 | 242.0 | 1 |
| (DP006A) ▲ | IL-2A1 | 13.6 | 889.4 | 4 |
| (DP006-A-20) ◆ | 20k PEG-IL-2A1 | 40.4 | 2642.2 | 11 |
| ■ | IL-2A2 | 182.8 | 11955.1 | 49 |
| ▼ | 20k PEG-IL-2A2 | 150.4 | 9836.2 | 41 |

图5

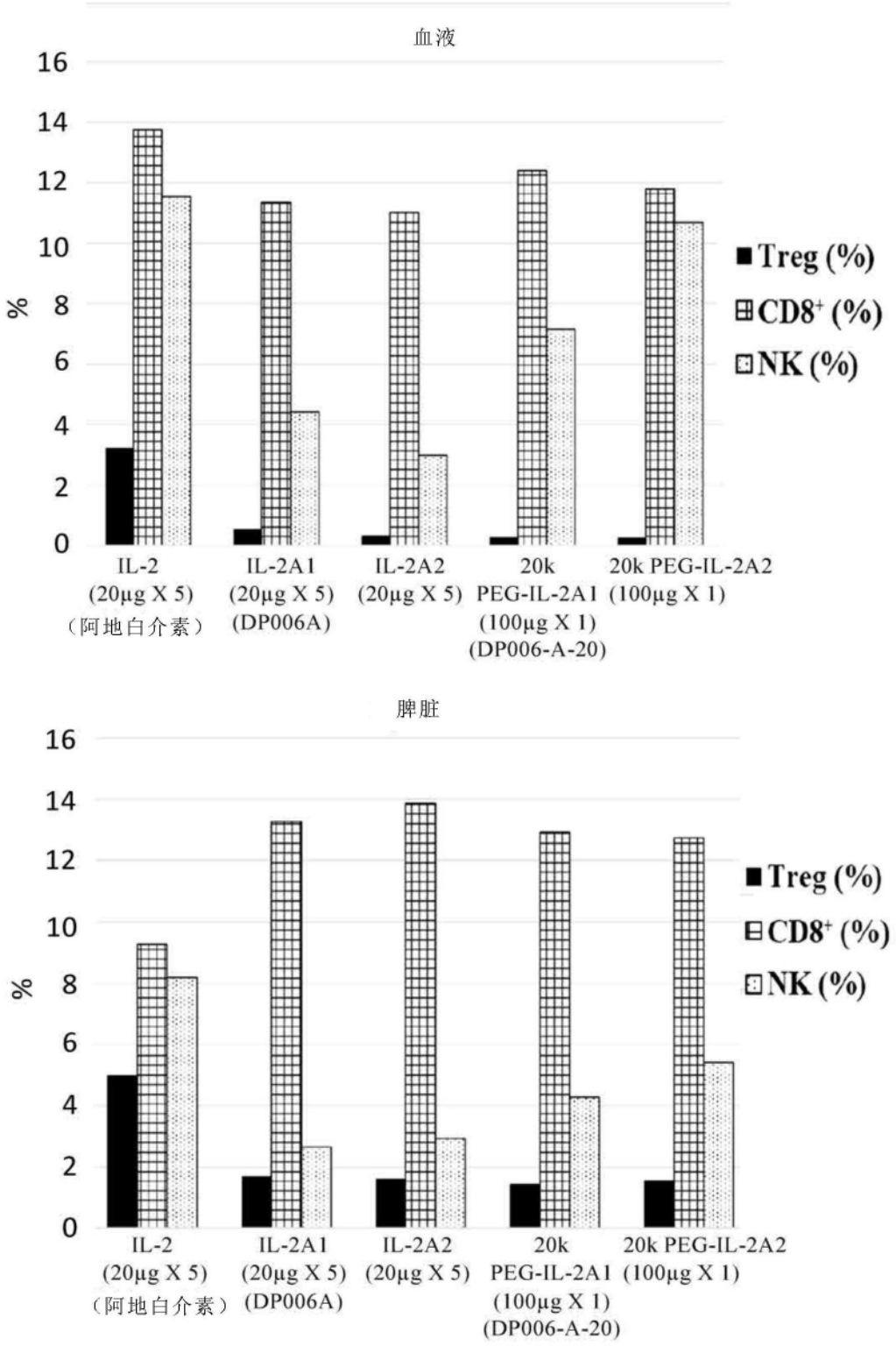

血液
16
14
12
10
8
6
4
2
0
%
Treg (%)
CD8+ (%)
NK (%)
IL-2 (20μg X 5) （阿地白介素）
IL-2A1 (20μg X 5) (DP006A)
IL-2A2 (20μg X 5)
20k PEG-IL-2A1 (100μg X 1) (DP006-A-20)
20k PEG-IL-2A2 (100μg X 1)
脾脏
16
14
12
10
8
6
4
2
0
%
Treg (%)
CD8+ (%)
NK (%)
IL-2 (20μg X 5) （阿地白介素）
IL-2A1 (20μg X 5) (DP006A)
IL-2A2 (20μg X 5)
20k PEG-IL-2A1 (100μg X 1) (DP006-A-20)
20k PEG-IL-2A2 (100μg X 1)

图6A

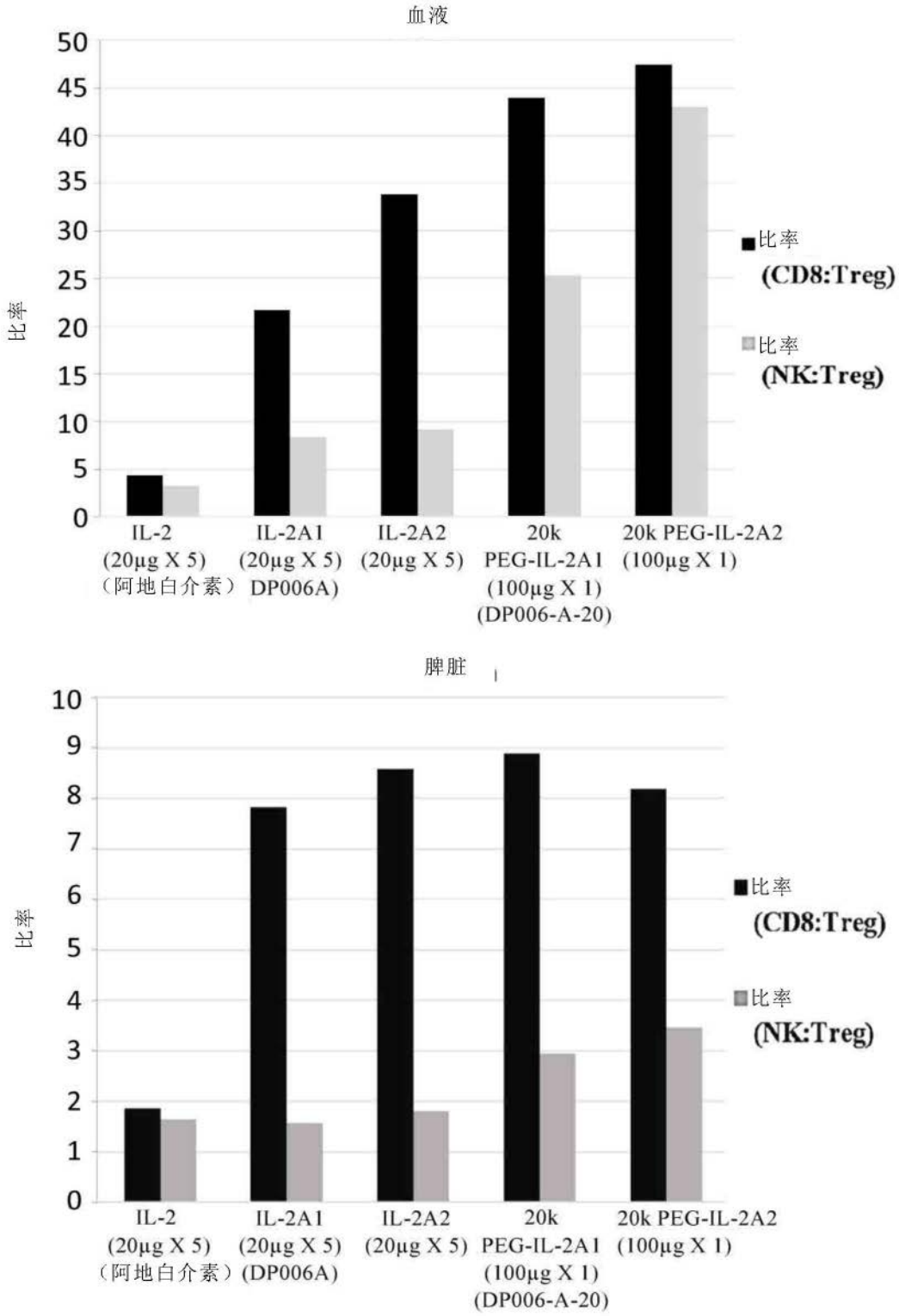

血液
比率
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
比率
(CD8:Treg)
比率
(NK:Treg)
IL-2
(20μg X 5)
（阿地白介素）
IL-2A1
(20μg X 5)
DP006A)
IL-2A2
(20μg X 5)
20k
PEG-IL-2A1
(100μg X 1)
(DP006-A-20)
20k PEG-IL-2A2
(100μg X 1)
脾脏
比率
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
比率
(CD8:Treg)
比率
(NK:Treg)
IL-2
(20μg X 5)
（阿地白介素）
IL-2A1
(20μg X 5)
(DP006A)
IL-2A2
(20μg X 5)
20k
PEG-IL-2A1
(100μg X 1)
(DP006-A-20)
20k PEG-IL-2A2
(100μg X 1)

图6B

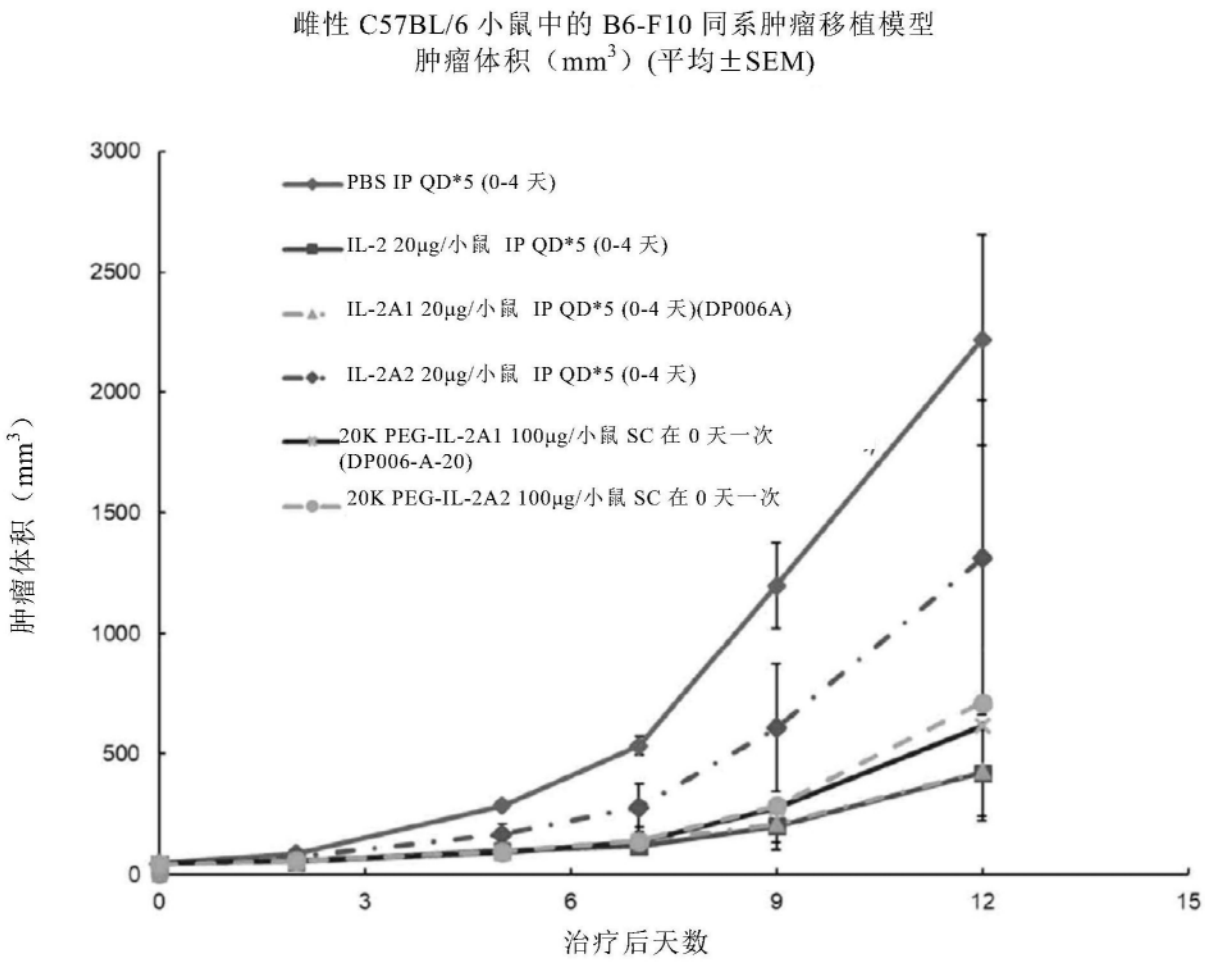

雌性 C57BL/6 小鼠中的 B6-F10 同系肿瘤移植模型
肿瘤体积（mm3）(平均±SEM)
PBS IP QD*5 (0-4 天)
IL-2 20μg/小鼠 IP QD*5 (0-4 天)
IL-2A1 20μg/小鼠 IP QD*5 (0-4 天)(DP006A)
IL-2A2 20μg/小鼠 IP QD*5 (0-4 天)
20K PEG-IL-2A1 100μg/小鼠 SC 在 0 天一次 (DP006-A-20)
20K PEG-IL-2A2 100μg/小鼠 SC 在 0 天一次
肿瘤体积（mm3）
治疗后天数
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
0
3
6
9
12
15

图7

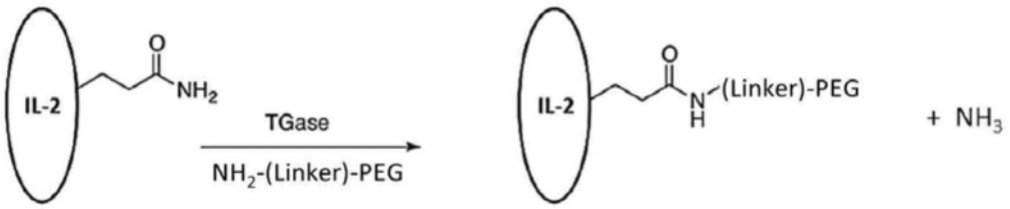

IL-2
NH2
TGase
NH2-(Linker)-PEG
IL-2
N
H
(Linker)-PEG
+ NH3

图8

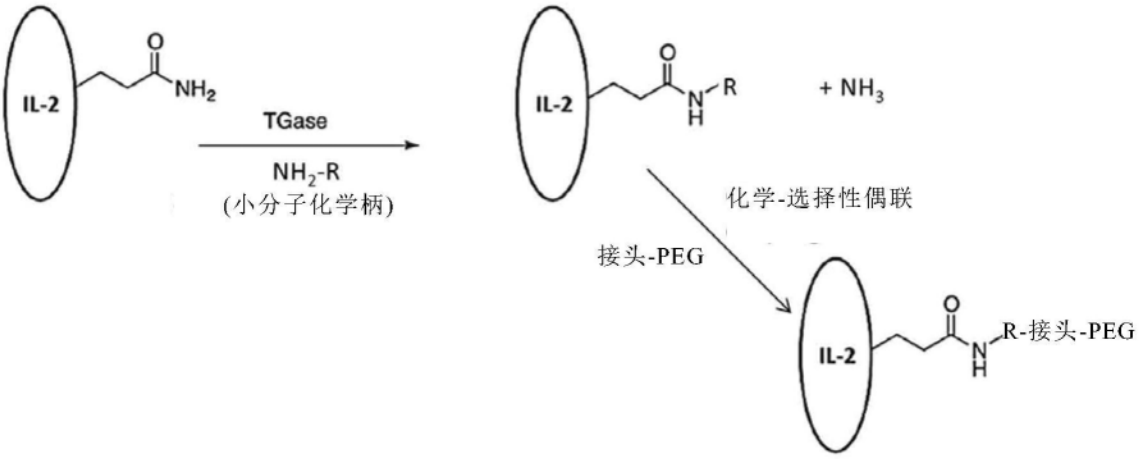



图9

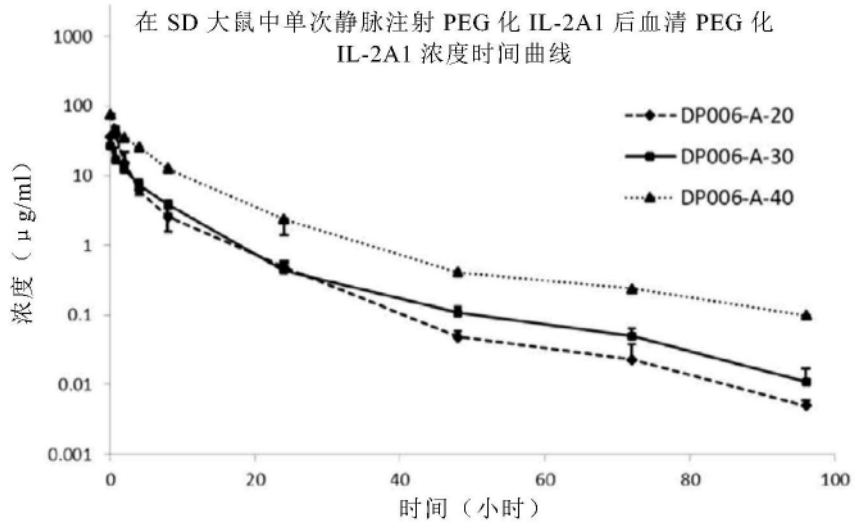



图10A

| 分组 | PEG 大小 | | $C_{max}$ (μg/mL) | $T_{max}$ (hr) [a] | $C_{last}$ (μg/mL) | $T_{last}$ (hr) | $AUC_{0-t}$ (μg*hr/mL) | $t_{1/2}$ (hr) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 20KDa | 平均 | 42.5 | 0.30 | 0.005 | 96 | 133.6 | 11.9 |
| | | SD | 9.2 | 0.39 | 0.001 | NA | 35.6 | 2.5 |
| | | N | 3 | | | | | |
| | | | | | | | | |
| 3 | 30KDa | 平均 | 26.6 | 0.08 | 0.011 | 96 | 121.5 | 14.0 |
| | | SD | 14.2 | 0.00 | 0.006 | NA | 19.6 | 4.3 |
| | | N | 3 | | | | | |
| | | | | | | | | |
| 4 | 40KDa | 平均 | 80.0 | 0.30 | 0.1 | 96 | 404.6 | 19.4 |
| | | SD | 44.4 | 0.39 | 0.03 | NA | 97.7 | 8.1 |
| | | N | 3 | | | | | |

图10B

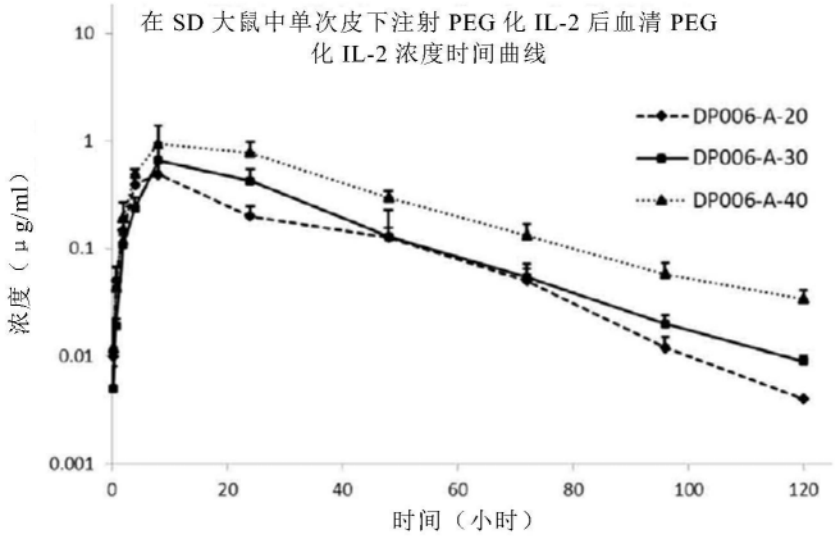



图11A

| 分组 | PEG 大小 | | $C_{max}$ (μg/mL) | $T_{max}$ (hr) [a] | $C_{last}$ (μg/mL) | $T_{last}$ (hr) | $AUC_{0-t}$ (μg*hr/mL) | $t_{1/2}$ (hr) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 20KDa | 平均 | 0.49 | 8.0 | 0.004 | 120 | 15.0 | 15.6 |
| | | SD | 0.17 | 0.0 | 0 | NA | 4.5 | 3.6 |
| | | N | 3 | | | | | |
| | | | | | | | | |
| 3 | 30KDa | 平均 | 0.66 | 8.0 | 0.009 | 120 | 21.0 | 17.2 |
| | | SD | 0.28 | 0 | 0.001 | NA | 4.8 | 1.4 |
| | | N | 3 | | | | | |
| | | | | | | | | |
| 4 | 40KDa | 平均 | 1.00 | 13.3 | 0.034 | 120 | 38.8 | 22.0 |
| | | SD | 0.40 | 9.2 | 0.007 | NA | 9.3 | 3.1 |
| | | N | 3 | | | | | |

图11B

与 IL-2Rα 的结合曲线

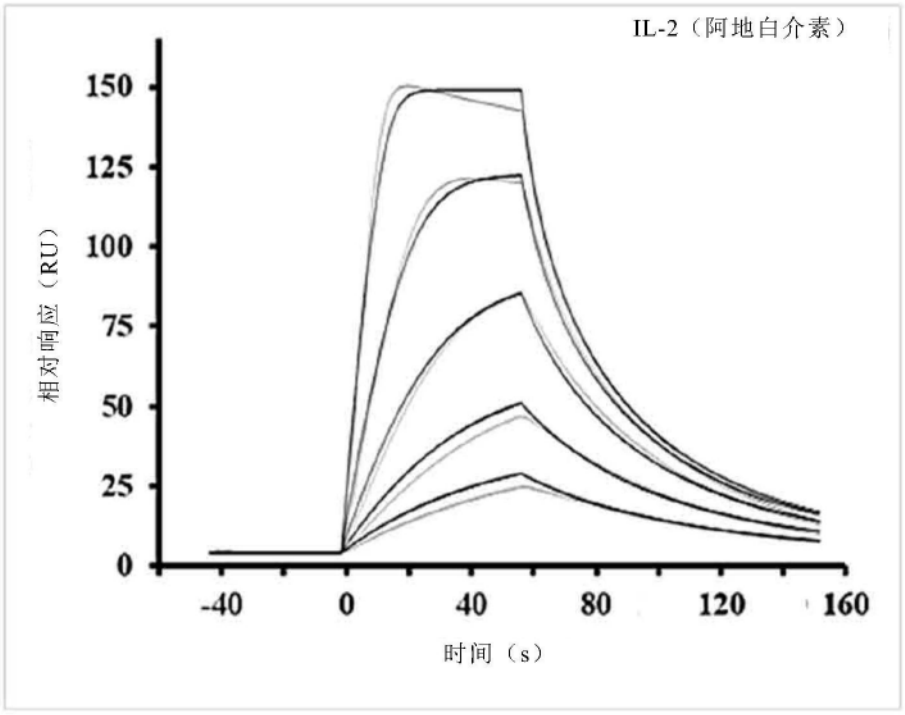



图12A

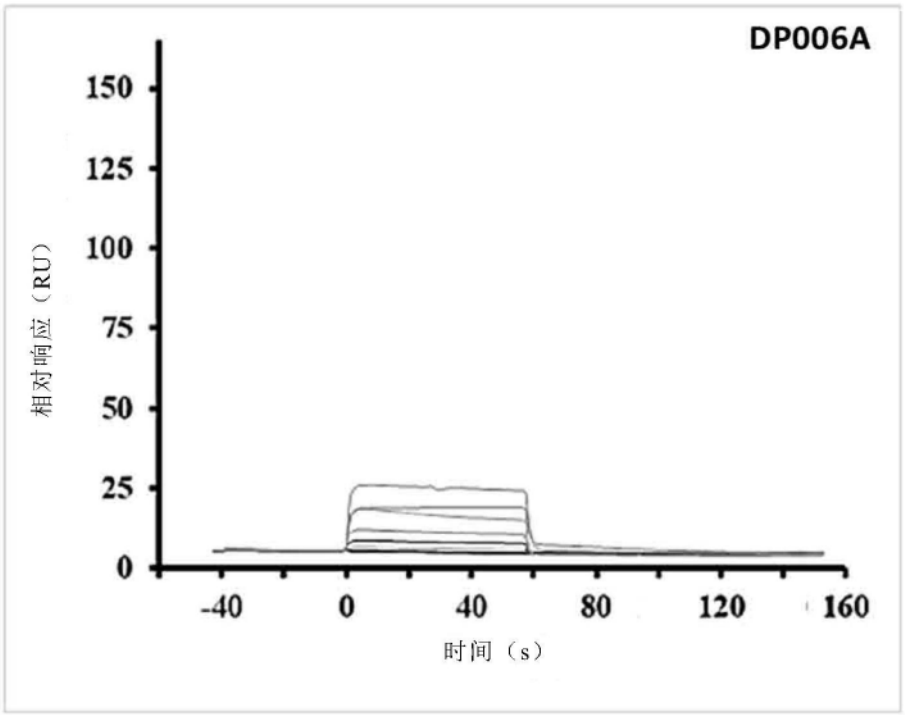



图12B

与 IL-2Rα 的结合曲线

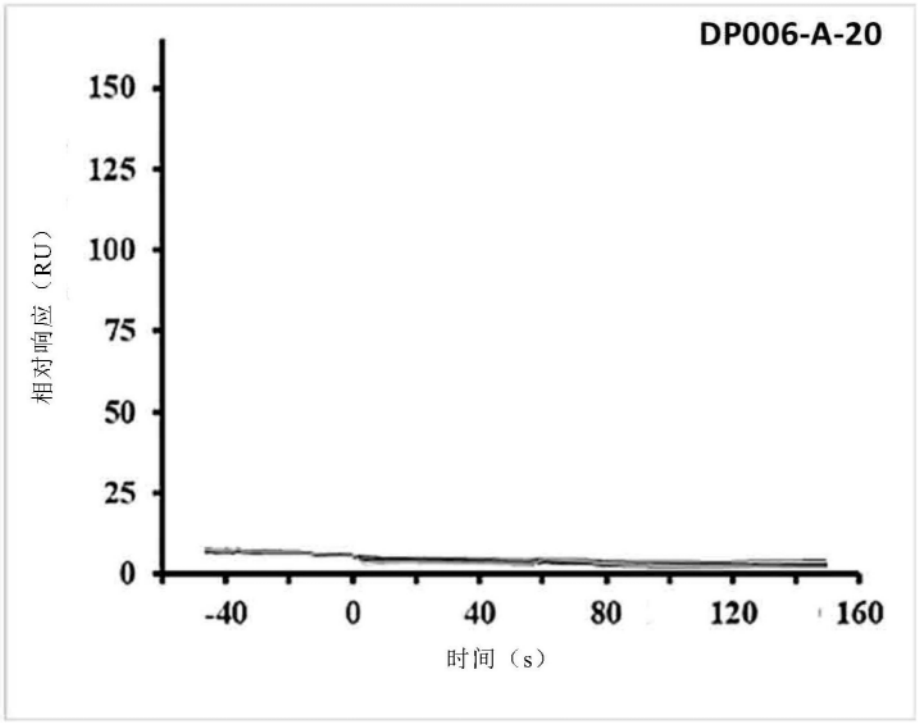



图12C

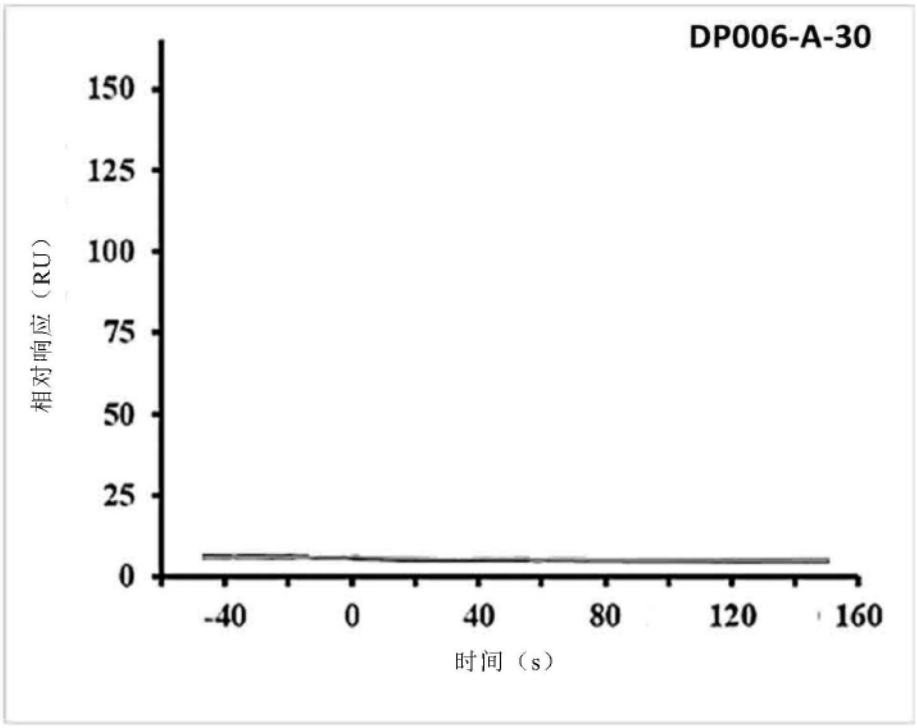



图12D

与 IL-2Rα 的结合曲线

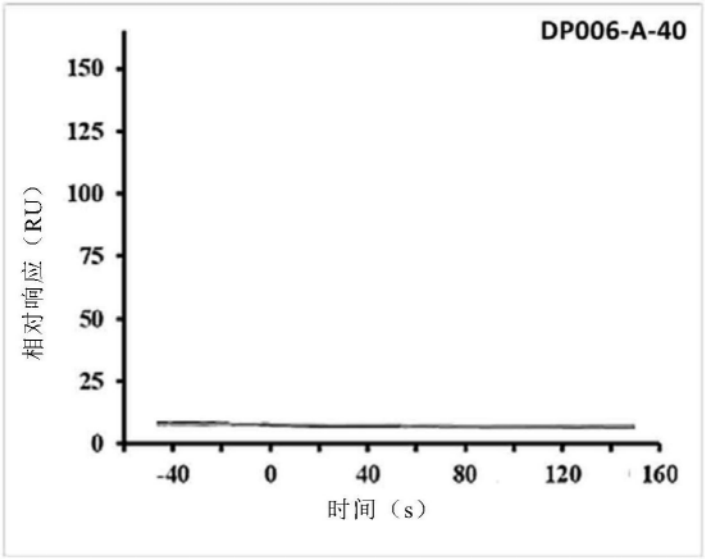



图12E

与 IL-2Rβ 的结合曲线

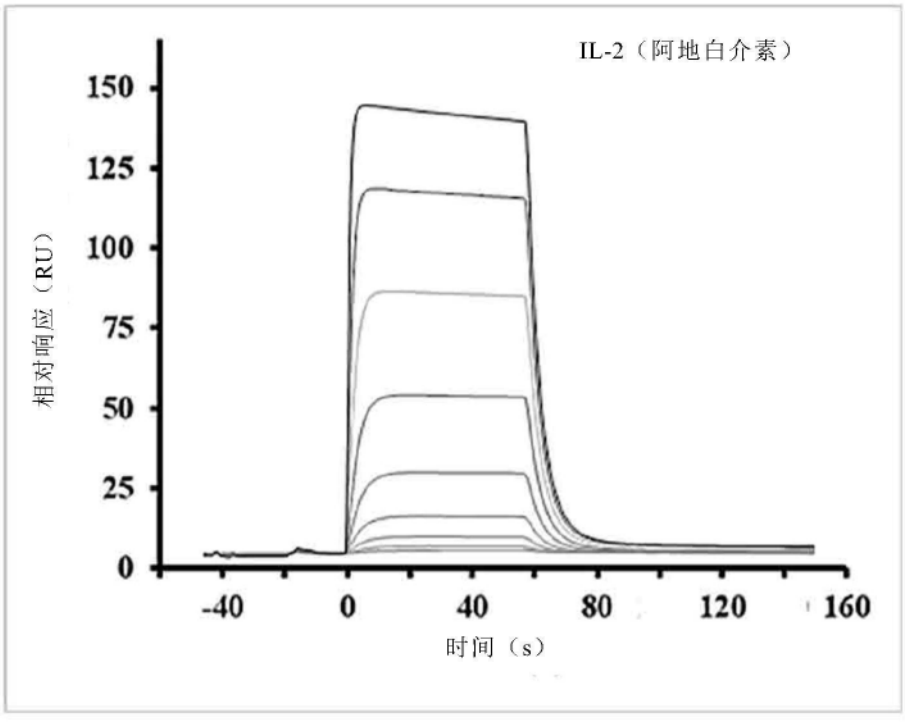



图13A

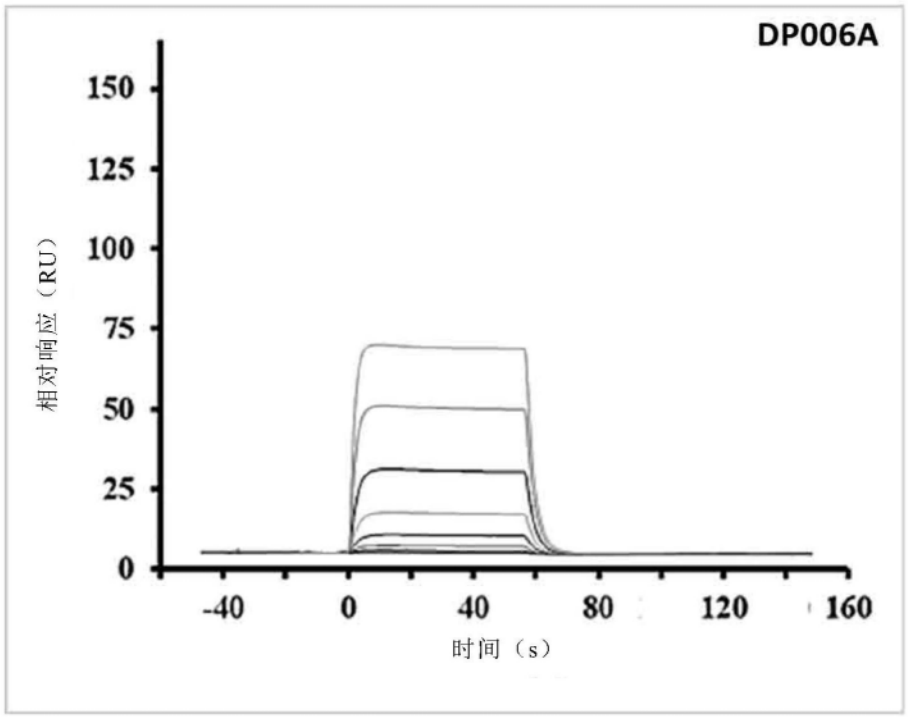



图13B

与 IL-2Rβ 的结合曲线

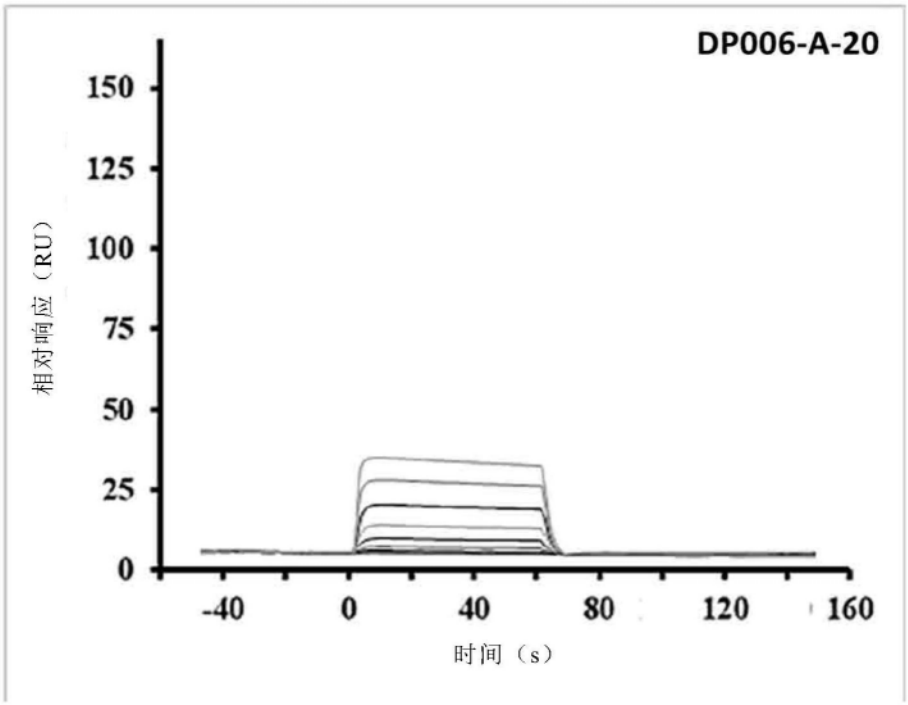



图13C

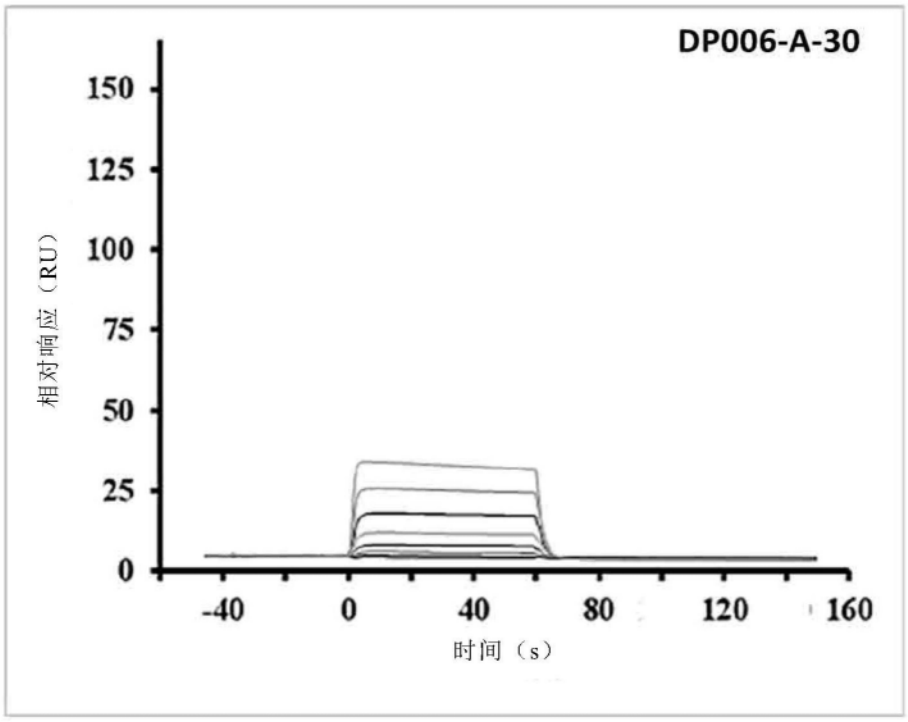



图13D

与 IL-2Rβ 的结合曲线

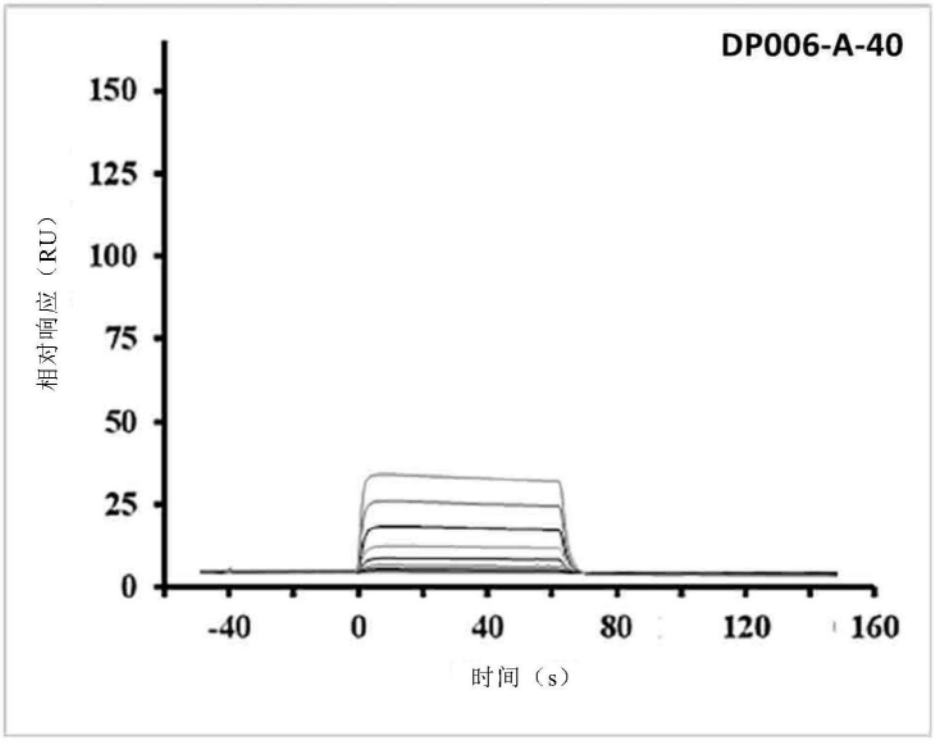



图13E

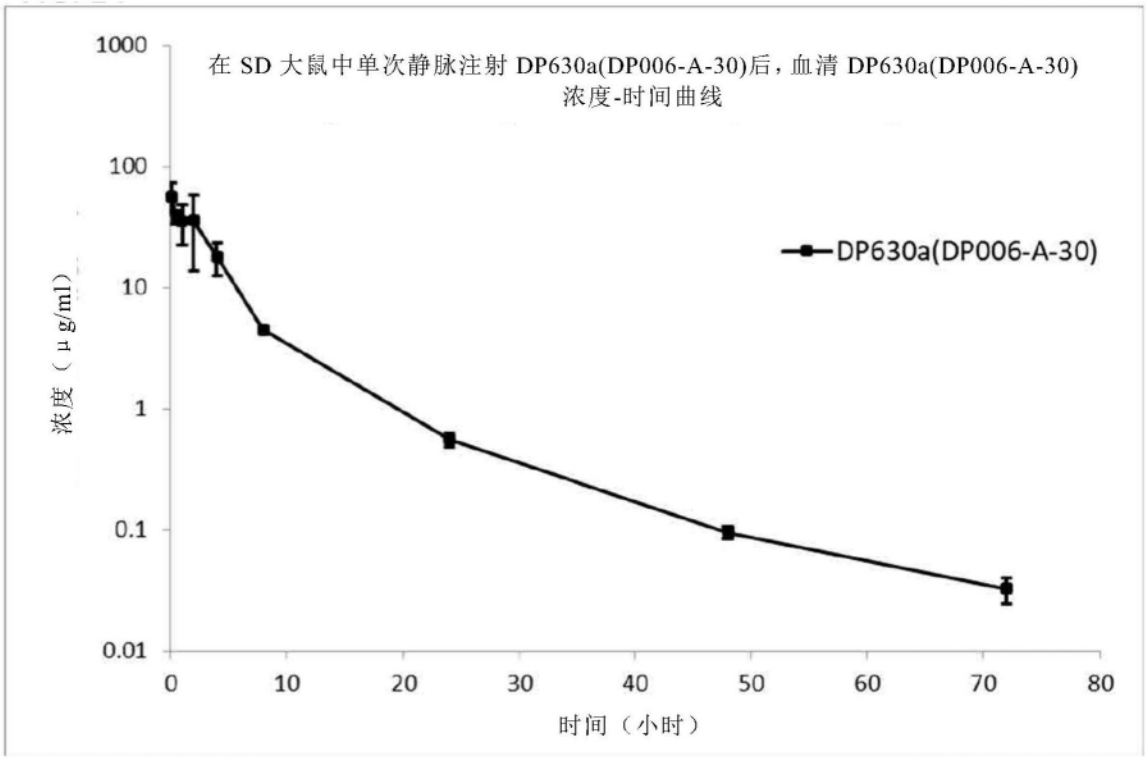

在 SD 大鼠中单次静脉注射 DP630a(DP006-A-30)后，血清 DP630a(DP006-A-30)
浓度-时间曲线
DP630a(DP006-A-30)
浓度（μg/ml）
时间（小时）
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
10
20
30
40
50
60
70
80

图14

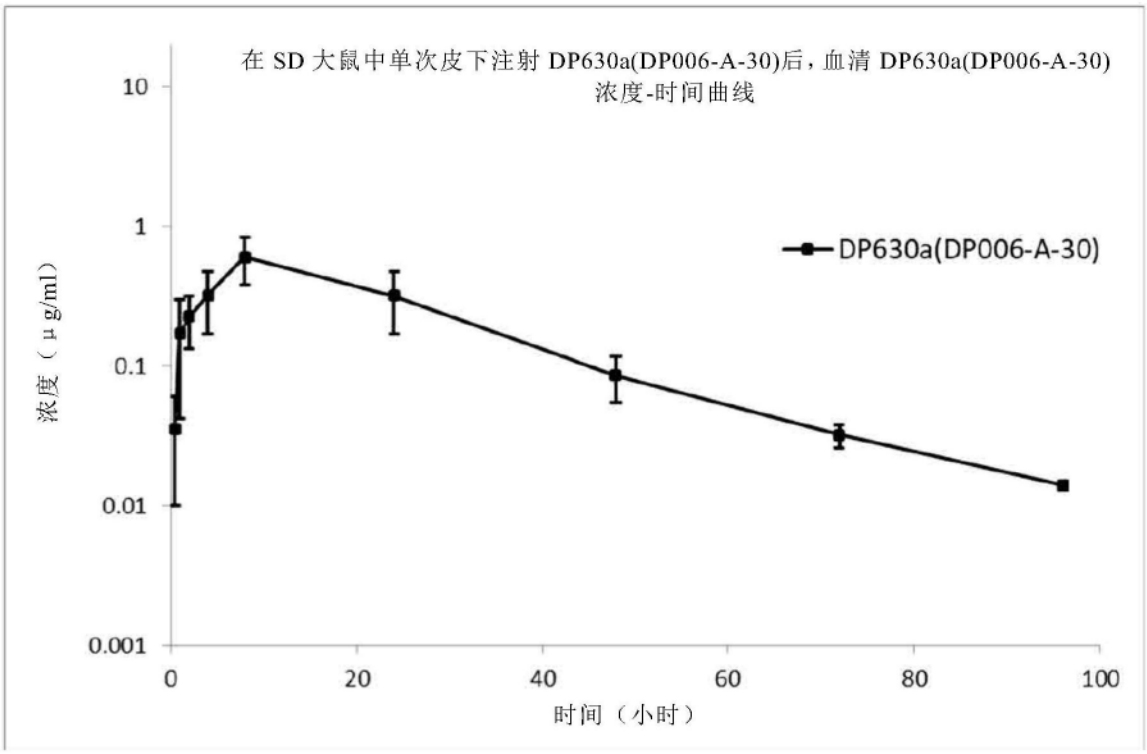

在 SD 大鼠中单次皮下注射 DP630a(DP006-A-30)后，血清 DP630a(DP006-A-30)
浓度-时间曲线
DP630a(DP006-A-30)
浓度（μg/ml）
时间（小时）
10
1
0.1
0.01
0.001
0
20
40
60
80
100

图15

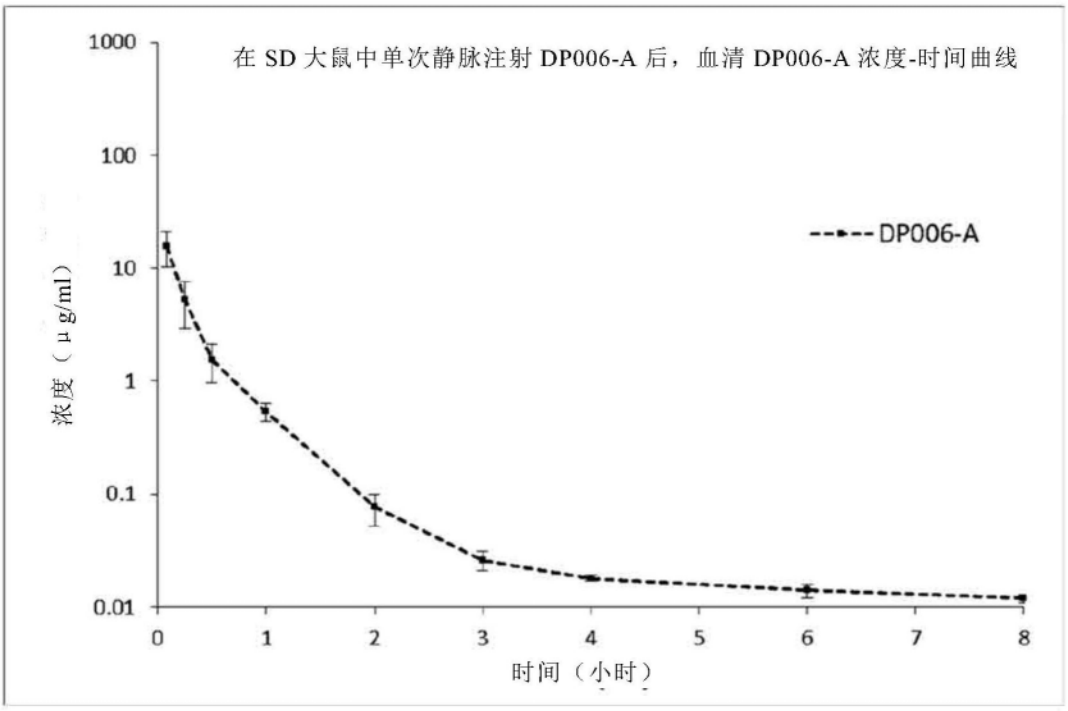

在 SD 大鼠中单次静脉注射 DP006-A 后，血清 DP006-A 浓度-时间曲线
DP006-A
浓度（μg/ml）
时间（小时）
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
1
2
3
4
5
6
7
8

图16

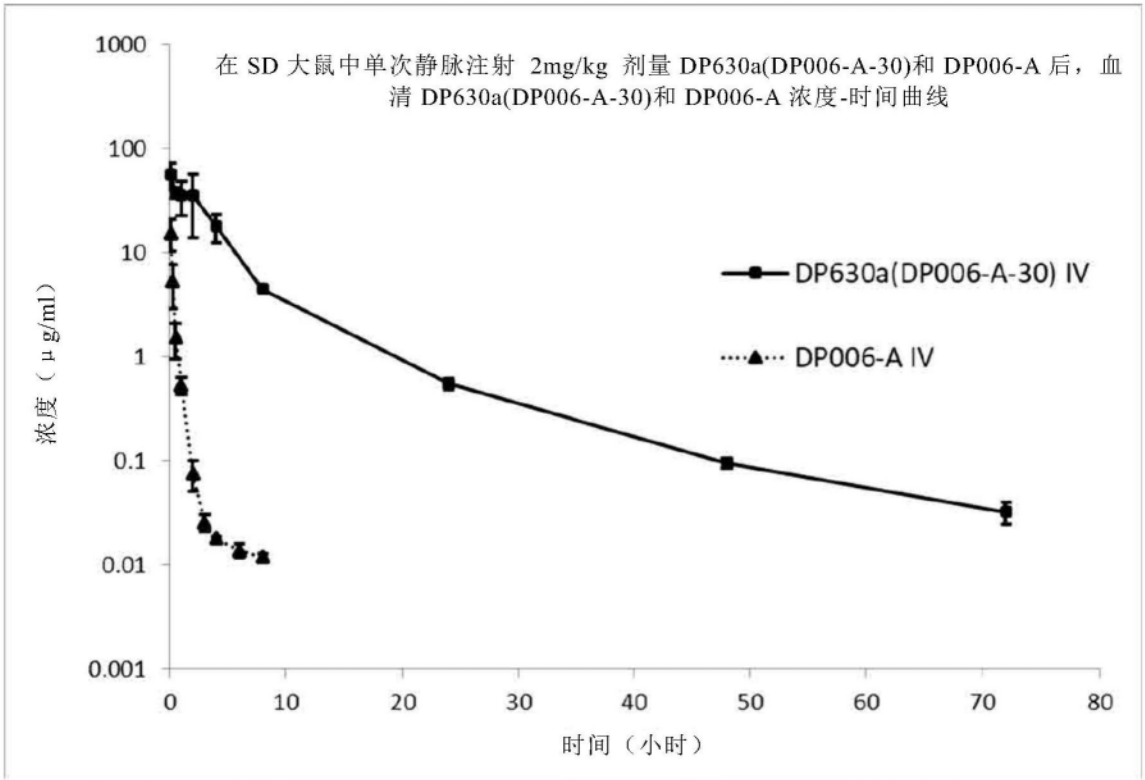

在 SD 大鼠中单次静脉注射 2mg/kg 剂量 DP630a(DP006-A-30)和 DP006-A 后，血清 DP630a(DP006-A-30)和 DP006-A 浓度-时间曲线
DP630a(DP006-A-30) IV
DP006-A IV
浓度（μg/ml）
时间（小时）
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
10
20
30
40
50
60
70
80

图17

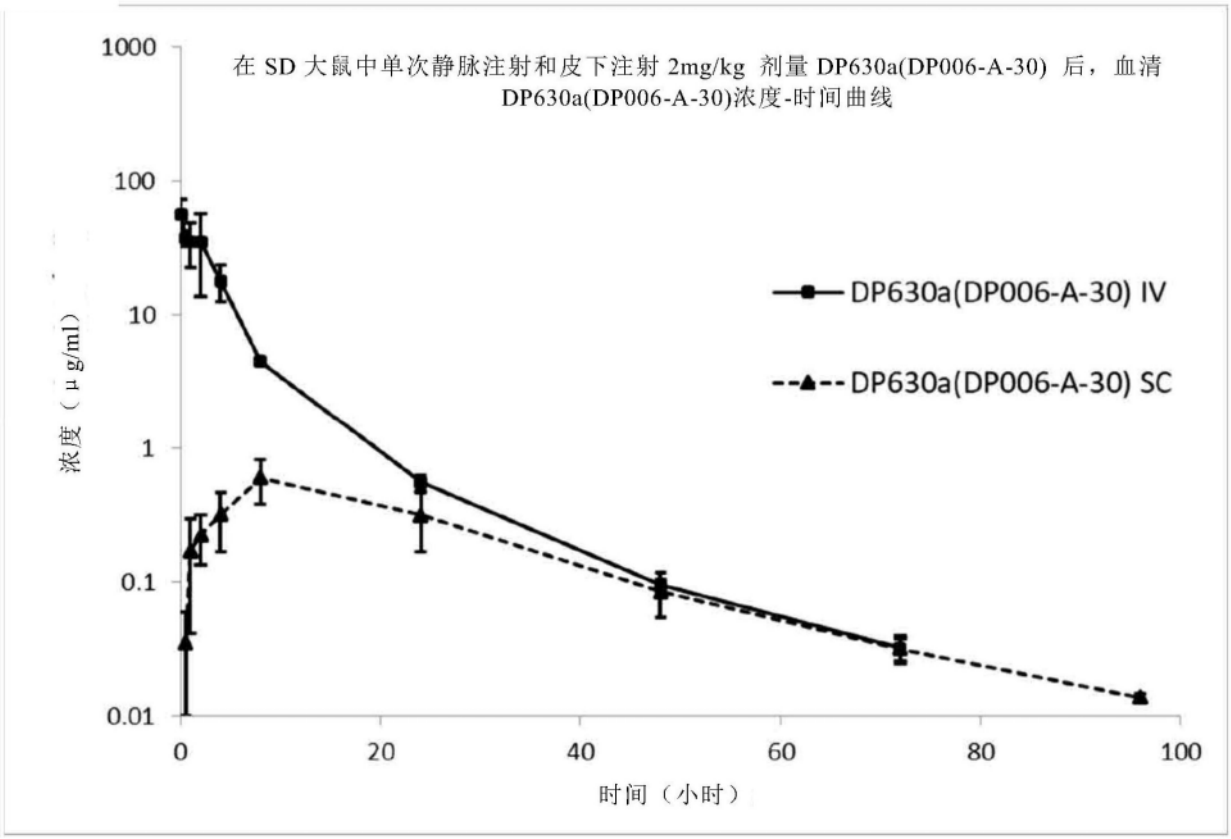



图18

通过数据库检索 DP006-A 和 DP006-A-30 在胰蛋白酶消化下的序列覆盖

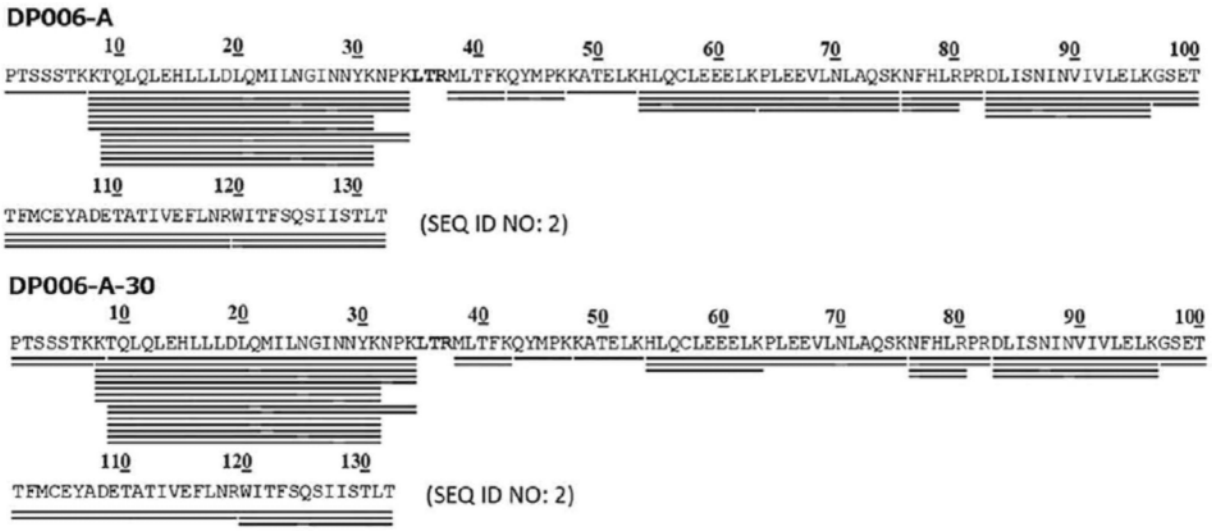



图19

DP006-A 和 DP006-A-30 在胰蛋白酶消化下的基峰色谱

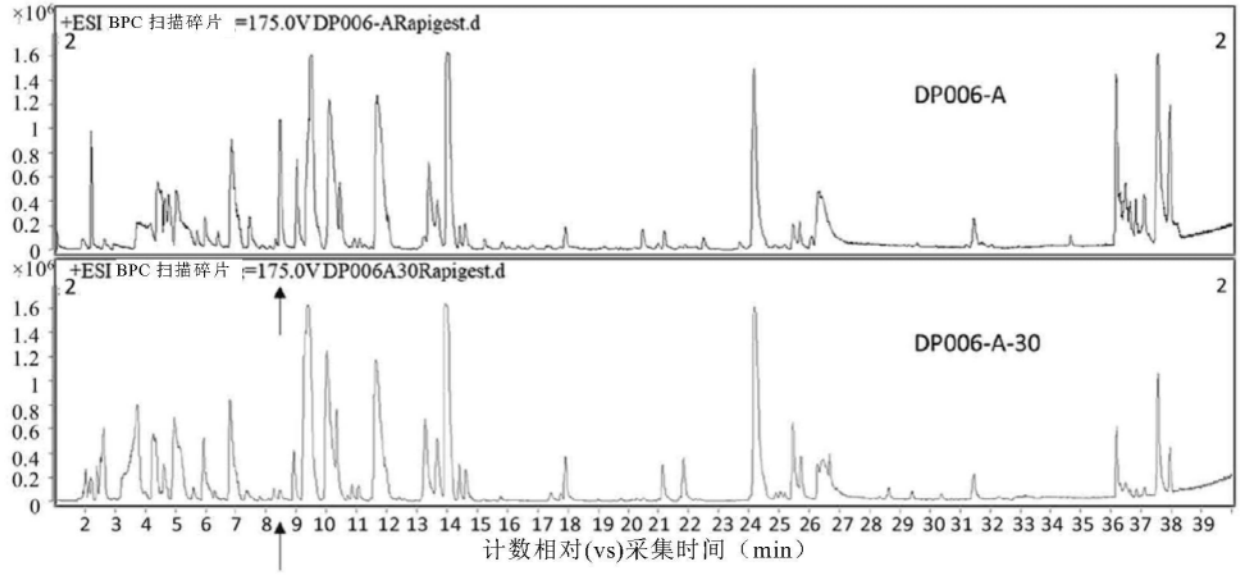



图20

聚乙二醇化 P43-47 在 DP006-A-30 中的 EIC

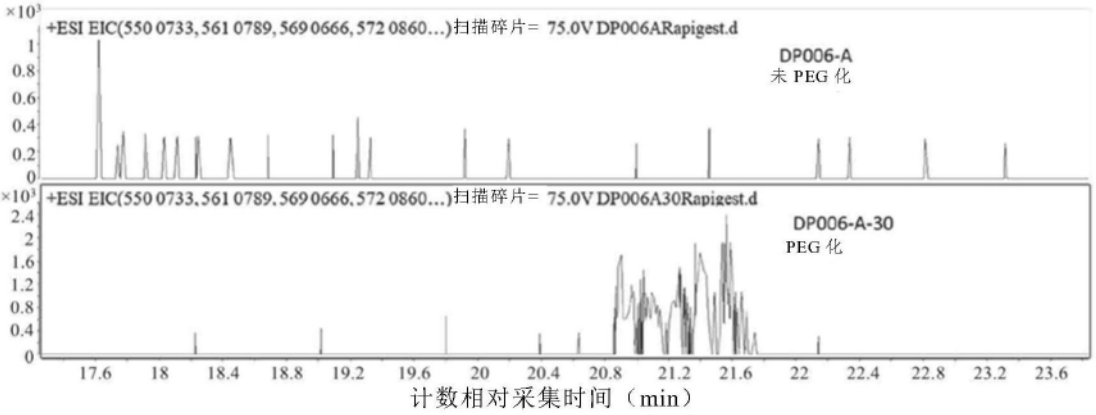



图21

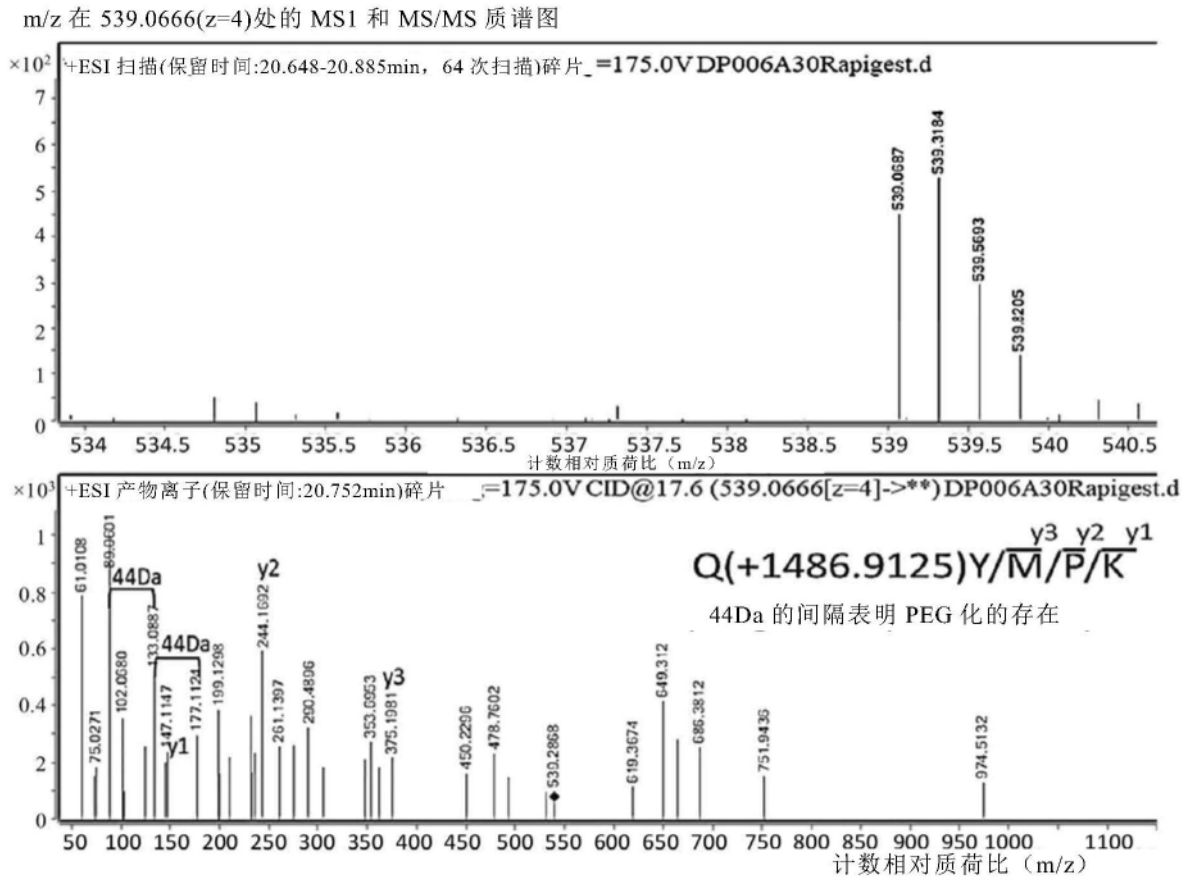

m/z 在 539.0666(z=4)处的 MS1 和 MS/MS 质谱图
×10²
+ESI 扫描(保留时间:20.648-20.885min，64 次扫描)碎片_=175.0V DP006A30Rapigest.d
539.0687
539.3184
539.5693
539.8205
计数相对质荷比（m/z）
×10³
+ESI 产物离子(保留时间:20.752min)碎片 _=175.0V CID@17.6 (539.0666[z=4]->**) DP006A30Rapigest.d
y3 y2 y1
Q(+1486.9125)Y/M/P/K
44Da 的间隔表明 PEG 化的存在
44Da
44Da
y1
y2
y3
61.0108
69.0001
75.0271
102.0080
133.0887
147.1147
177.1124
199.1298
244.1692
261.1397
290.4896
353.0953
375.1981
450.2296
478.7602
530.2868
619.3674
649.312
686.3812
751.9436
974.5132
计数相对质荷比（m/z）

图22

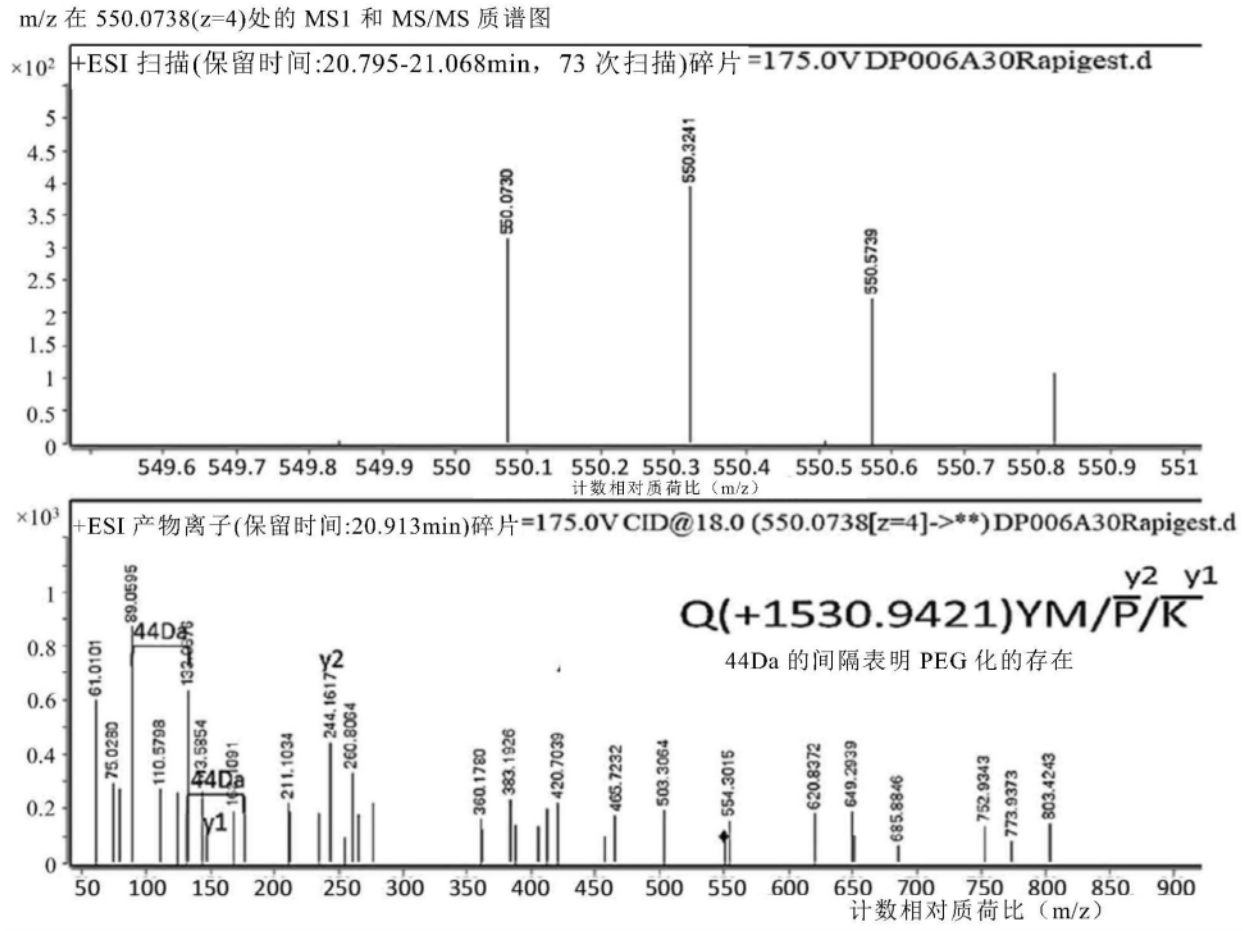

m/z 在 550.0738(z=4)处的 MS1 和 MS/MS 质谱图
×10²
+ESI 扫描(保留时间:20.795-21.068min，73 次扫描)碎片 =175.0V DP006A30Rapigest.d
550.0730
550.3241
550.5739
计数相对质荷比（m/z）
×10³
+ESI 产物离子(保留时间:20.913min)碎片=175.0V CID@18.0 (550.0738[z=4]->**) DP006A30Rapigest.d
Q(+1530.9421)YM/P/K
y2 y1
44Da 的间隔表明 PEG 化的存在
44Da
44Da
y1
y2
计数相对质荷比（m/z）

图23

通过数据库检索 DP006-A 和 DP006-A-30 在 Glu-C 消化下的序列覆盖

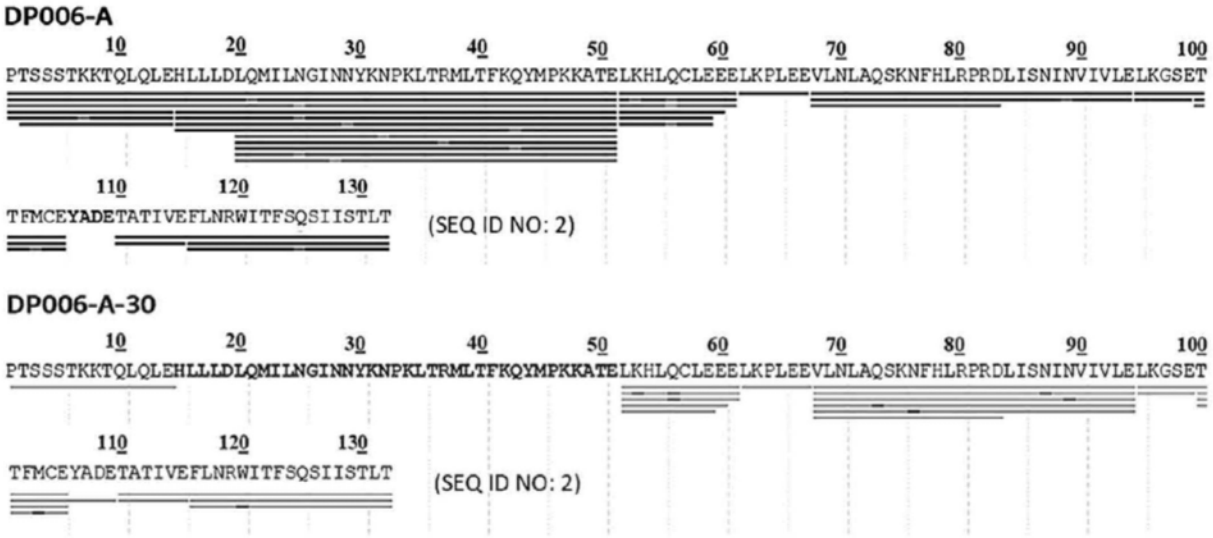



图24

DP006-A 和 DP006-A-30 在 Glu-C 消化下的基峰色谱

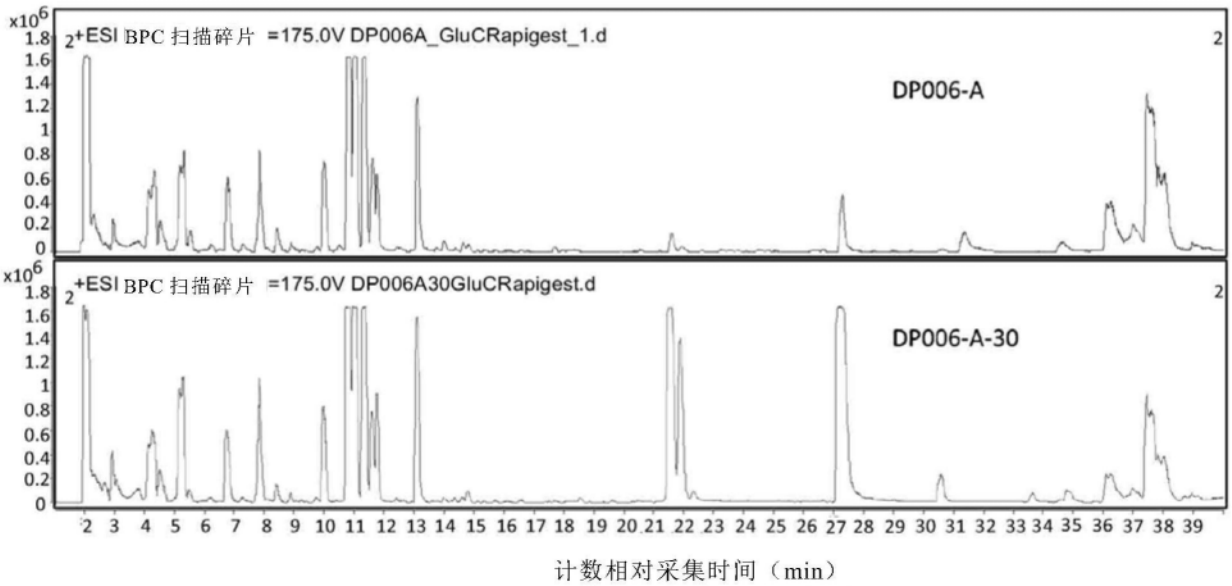



图25