(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111194322 A
(43)申请公布日 2020.05.22

(21)申请号 201880064755.4

(22)申请日 2018.08.03

(30)优先权数据
62/540,781 2017.08.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.04.03

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/045257 2018.08.03

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/028419 EN 2019.02.07

(71)申请人 辛索克斯公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 杰罗德·普塔钦
卡罗利纳·E·卡法罗
马科斯·米拉

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 武晶晶

(51)Int.Cl.
C07K 14/55(2006.01)
A61K 38/20(2006.01)
C12N 15/26(2006.01)

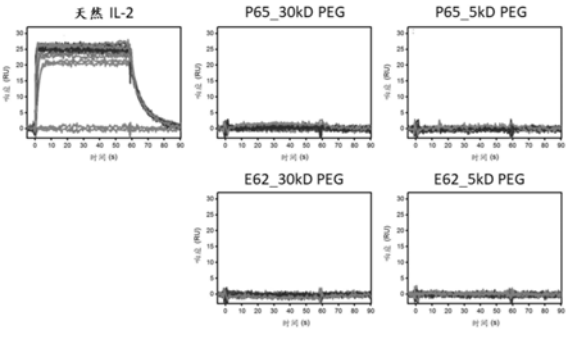
权利要求书6页 说明书86页
序列表3页 附图18页

(54)发明名称

用于治疗增生性和感染性疾病的细胞因子缀合物

(57)摘要

本文公开了白介素(IL)缀合物(例如,IL-2缀合物)以及在治疗一种或多种适应症中的用途。本文还描述了包含一种或多种所述白介素缀合物(例如,IL-2缀合物)的药物组合物和试剂盒。



CN 111194322 A

1.一种分离并修饰的白介素2(IL-2)多肽,其在该多肽的位置上包含至少一个非天然氨基酸,该非天然氨基酸降低该修饰的IL-2多肽与白介素2受体α(IL-2Rα)之间的结合,但保留与白介素2βγ受体(IL-2Rβγ)信号传导复合物显著结合以形成IL-2/IL-2Rβγ复合物,其中与IL-2Rα结合的降低是相比于野生型IL-2多肽与IL-2Rα之间的结合。

2.一种包含至少一个非天然氨基酸的分离并修饰的白介素2(IL-2)多肽,其中该分离并修饰的IL-2多肽表现出对IL-2βγ信号传导复合物的第一受体信号传导效力和对IL-2αβγ信号传导复合物的第二受体信号传导效力,并且其中第一受体信号传导效力与第二受体信号传导效力之差小于10倍。

3.根据权利要求2所述的分离并修饰的IL-2多肽,其中受体信号传导效力的差异小于5倍、小于4倍、小于3倍、小于2倍或小于1倍。

4.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽,其中所述至少一个非天然氨基酸的位置选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E60、E61、E62、K64、P65、E68、V69、N71、L72、M104、C105和Y107,其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、69、71、72、104、105和107。

5.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽,其中所述至少一个非天然氨基酸的位置选自T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、P65、E68和L72,其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置37、38、41、42、43、44、45、61、62、65、68和72。

6.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽,其中所述至少一个非天然氨基酸的位置选自K35、K64、V69、N71、M104、C105和Y107,其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置35、64、69、71、104、105和107。

7.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽,其中所述至少一个非天然氨基酸的位置选自T37、R38、T41、Y45、E61、E68和L72,其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置37、38、41、45、61、68和72。

8.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽,其中所述至少一个非天然氨基酸的位置选自F42、K43、F44、E62和P65,其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置42、43、44、62和65。

9.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽,其中所述至少一个非天然氨基酸:

- 是赖氨酸类似物;
- 包含芳族侧链;
- 包含叠氮基;
- 包含炔烃基团;或者
- 包含醛或酮基团。

10.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽,其中所述至少一个非天然氨基酸不包含芳族侧链。

11.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽,其中所述至少一个非天然氨基酸包括N6-叠氮基乙氧基-L-赖氨酸(AzK)、N6-炔丙基乙氧基-L-赖氨酸(PraK)、BCN-L-赖氨酸、降冰片烯赖氨酸、TCO-赖氨酸、甲基四嗪赖氨酸、烯丙氧基羰基赖氨酸、2-氨基-8-氧代壬酸、2-氨基-8-氧代辛酸、对乙酰基-L-苯丙氨酸、对叠氮基甲基-L-苯丙氨酸(pAMF)、对

碘-L-苯丙氨酸、间乙酰基苯丙氨酸、2-氨基-8-氧代壬酸、对炔丙基氧基苯丙氨酸、对炔丙基-苯丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对叠氮基-L-苯丙氨酸、对酰基-L-苯丙氨酸、对苯甲酰基-L-苯丙氨酸、对溴苯丙氨酸、对氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、O-烯丙基酪氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、膦酰基酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAcp-丝氨酸、L-磷酸丝氨酸、膦酰基丝氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、2-氨基-3-((2-((3-(苄氧基)-3-氧代丙基)氨基)乙基)硒基)丙酸、2-氨基-3-(苯基硒基)丙酸或硒代半胱氨酸。

12.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述至少一个非天然氨基酸通过正交tRNA合成酶/tRNA对掺入所述修饰的IL-2多肽中。

13.根据权利要求12所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述正交合成酶/tRNA对的正交tRNA包含至少一个非天然核碱基。

14.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述修饰的IL-2多肽通过所述至少一个非天然氨基酸共价连接至缀合部分。

15.根据权利要求14所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述缀合部分包含水溶性聚合物、脂质、蛋白质或肽。

16.根据权利要求15所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述水溶性聚合物包括聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟基烷基甲基丙烯酰胺)、聚(羟基烷基甲基丙烯酸酯)、多糖、聚(α-羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷腈、聚噁唑啉(POZ)、聚(N-丙烯酰基吗啉)或其组合。

17.根据权利要求15所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述水溶性聚合物包括PEG分子。

18.根据权利要求17所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述PEG分子是直链PEG。

19.根据权利要求17所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述PEG分子是支链PEG。

20.根据权利要求15所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述水溶性聚合物包括多糖。

21.根据权利要求20所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述多糖包括葡聚糖、聚唾液酸(PSA)、透明质酸(HA)、直链淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素(HS)、糊精或羟乙基淀粉(HES)。

22.根据权利要求15所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述脂质包括脂肪酸。

23.根据权利要求22所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述脂肪酸包含约6至约26个碳原子、约6至约24个碳原子、约6至约22个碳原子、约6至约20个碳原子、约6至约18个碳原子、约20至约26个碳原子、约12至约26个碳原子、约12至约24个碳原子、约12至约22个碳原子、约12至约20个碳原子或约12至约18个碳原子。

24.根据权利要求22所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述脂肪酸是饱和脂肪酸。

25.根据权利要求15所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述蛋白质包括白蛋白、转铁蛋白或运甲状腺素蛋白。

26.根据权利要求14所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述缀合部分包含TLR激动剂。

27.根据权利要求15所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述蛋白质包括抗体或其结合片段。

28.根据权利要求27所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述抗体或其结合片段包括

抗体的Fc部分。

29.根据权利要求15所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述肽包括XTEN肽、富含甘氨酸的高氨基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、弹性蛋白样多肽(ELP)、CTP肽或明胶样蛋白(GLK)聚合物。

30.根据权利要求14所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述缀合部分通过连接体间接结合至所述修饰的IL-2的所述至少一个非天然氨基酸。

31.根据权利要求30所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述连接体包括同双官能连接体、异双官能连接体、零长度连接体，可裂解或不可裂解的二肽连接体、马来酰亚胺基团、间隔基或其组合。

32.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述结合亲和力的降低是相对于野生型IL-2多肽，对IL-2Rα的结合亲和力降低约30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或100％。

33.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述结合亲和力的降低是相对于野生型IL-2多肽，对IL-2Rα的结合亲和力降低约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多。

34.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述修饰的IL-2多肽是：

全长IL-2多肽的功能活性片段；

重组IL-2多肽；或

重组人IL-2多肽。

35.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述修饰的IL-2多肽包含N-末端缺失、C-末端缺失或其组合。

36.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述N-末端缺失包括从N-末端缺失前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25或30个残基，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。

37.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述C-末端缺失包括从C-末端缺失最后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20个或更多个残基，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。

38.根据权利要求34所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述功能活性片段包含IL-2区域10-133、20-133、30-133、10-130、20-130、30-130、10-125、20-125、30-125、1-130或1-125，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。

39.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述修饰的IL-2多肽与SEQ ID NO:1具有约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的序列同一性。

40.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述对IL-2Rα的结合亲和力降低的修饰的IL-2多肽能够扩充CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞群体或其组合。

41.根据权利要求14所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中所述缀合部分或非天然氨基酸损害或阻断IL-2与IL-2Rα的结合。

42.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，其中相对于野生型IL-2多肽，所述修饰的IL-2多肽通过IL-2Rβγ复合物对CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然

杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体的激活保留激活所述细胞群体的显著效力。

43.根据权利要求42所述的分离并修饰的IL-2多肽,其中所述修饰的IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力高于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力。

44.根据权利要求42所述的分离并修饰的IL-2多肽,其中所述修饰的IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力低于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力。

45.根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽,其中所述修饰的IL-2多肽表现出对IL-2Rβγ的第一受体信号传导效力和对IL-2Rαβγ的第二受体信号传导效力,并且其中第一受体信号传导效力比第二受体信号传导效力高至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍、500倍或更高。

46.根据权利要求45所述的分离并修饰的IL-2多肽,其中所述修饰的IL-2多肽的第一受体信号传导效力高于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ的受体信号传导效力,并且所述修饰的IL-2多肽的第二受体信号传导效力低于野生型IL-2多肽对IL-2Rαβγ的受体信号传导效力。

47.根据权利要求45所述的分离并修饰的IL-2多肽,其中所述修饰的IL-2多肽的第一受体信号传导效力比野生型IL-2多肽的受体信号传导效力低至少1倍。

48.一种白介素2(IL-2)缀合物,其包含共价连接至缀合部分的非天然氨基酸,其中所述IL-2与SEQ ID NO:1具有至少80%的序列同一性。

49.一种白介素2(IL-2)缀合物,其包含共价连接至缀合部分的非天然氨基酸,其中该非天然氨基酸位于区域35-107中,并且其中该区域35-107对应于SEQ ID NO:1的残基K35-Y107。

50.一种白介素2βγ受体(IL-2Rβγ)结合蛋白,其中所述结合蛋白对白介素2α受体(IL-2Rα)的结合亲和力低于野生型人IL-2(hIL-2)对该受体的结合亲和力,并且其中所述结合蛋白包含至少一个非天然氨基酸。

51.根据权利要求50所述的IL-2Rβγ结合蛋白,其中所述结合蛋白是修饰的IL-2多肽或其功能活性片段,其中该修饰的IL-2多肽包含至少一个非天然氨基酸。

52.根据权利要求50所述的IL-2Rβγ结合蛋白,其中所述至少一个非天然氨基酸位于区域35-107中,并且其中该区域35-107对应于SEQ ID NO:1的残基K35-Y107。

53.一种IL-2/IL-2Rβγ复合物,其包含含有非天然氨基酸的修饰的IL-2多肽和IL-2Rβγ,其中所述修饰的IL-2多肽对IL-2Rα的结合亲和力降低,并且其中结合亲和力的降低是相比于野生型IL-2多肽与IL-2Rα之间的结合亲和力。

54.根据权利要求53所述的IL-2/IL-2Rβγ复合物,其中所述修饰的IL-2多肽进一步包含共价连接至所述非天然氨基酸的缀合部分。

55.CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂,其选择性地扩充细胞群体中的CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞,其中所述激活剂包括包含至少一个非天然氨基酸的修饰的白介素2(IL-2)多肽。

56.根据权利要求55所述的激活剂,其中当所述激活剂与所述细胞群体接触时,所述激

活剂使CD4+T调节性(Treg)细胞扩充少于20％、15％、10％、5％、1％或0.1％。

57.根据权利要求55所述的激活剂，其中所述激活剂不扩充所述细胞群体中的Treg细胞。

58.根据权利要求55所述的激活剂，其中所述细胞群体是体内细胞群体。

59.根据权利要求55所述的激活剂，其中所述细胞群体是体外细胞群体。

60.根据权利要求55所述的激活剂，其中所述细胞群体是离体细胞群体。

61.一种药物组合物，其包含：

根据权利要求1-47所述的分离并修饰的IL-2多肽，根据权利要求48或49所述的IL-2缀合物，根据权利要求50-52所述的IL-2Rβγ结合蛋白，或根据权利要求55-60所述的CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂；以及

药学上可接受的赋形剂。

62.根据权利要求61所述的药物组合物，其中所述药物组合物被配制用于全身递送。

63.根据权利要求61所述的药物组合物，其中所述药物组合物被配制用于肠胃外给药。

64.一种治疗有需要的受试者的增生性疾病或病况的方法，其包括向该受试者施用治疗有效量的根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，根据权利要求48或49所述的IL-2缀合物，根据权利要求50所述的IL-2Rβγ结合蛋白，根据权利要求55所述的CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或根据权利要求61所述的药物组合物。

65.根据权利要求64所述的方法，其中所述增生性疾病或病况是癌症。

66.根据权利要求65所述的方法，其中所述癌症是实体瘤癌症。

67.根据权利要求66所述的方法，其中所述实体瘤癌症是膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食道癌、眼癌、头颈癌、肾癌、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌或前列腺癌。

68.根据权利要求65所述的方法，其中所述癌症是血液系统恶性肿瘤。

69.根据权利要求68所述的方法，其中所述血液系统恶性肿瘤是慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高恶性B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或淋巴瘤样肉芽肿病。

70.根据权利要求64所述的方法，其进一步包括施用额外的治疗剂。

71.根据权利要求70所述的方法，其中同时施用所述分离并修饰的IL-2多肽，IL-2缀合物，IL-2Rβγ结合蛋白，CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或药物组合物，和所述额外的治疗剂。

72.根据权利要求70所述的方法，其中依次施用所述分离并修饰的IL-2多肽，IL-2缀合物，IL-2Rβγ结合蛋白，CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或药物组合物，和所述额外的治疗剂。

73.根据权利要求70所述的方法，其中在所述额外的治疗剂之前施用所述分离并修饰

的IL-2多肽，IL-2缀合物，IL-2Rβγ结合蛋白，CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或药物组合物。

74.根据权利要求70所述的方法，其中在施用所述额外的治疗剂之后施用所述分离并修饰的IL-2多肽，IL-2缀合物，IL-2Rβγ结合蛋白，CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或药物组合物。

75.一种扩充CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和/或记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞群体的方法，其包括：

使细胞群体接触根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，根据权利要求48或49所述的IL-2缀合物，根据权利要求50所述的IL-2Rβγ结合蛋白，根据权利要求55所述的CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或根据权利要求61所述的药物组合物，持续足以诱导与IL-2Rβγ形成复合物的时间，从而刺激Teff和/或NK细胞群体的扩充。

76.根据权利要求75所述的方法，其中相比于与野生型IL-2多肽接触的CD3+细胞群体中CD4+T调节(Treg)细胞的扩充，根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，根据权利要求48或49所述的IL-2缀合物，根据权利要求50所述的IL-2Rβγ结合蛋白，根据权利要求55所述的CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或根据权利要求61所述的药物组合物，使CD3+细胞群体中的CD4+Treg细胞扩充少于20％、15％、10％、5％或1％。

77.根据权利要求75所述的方法，其中根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，根据权利要求48或49所述的IL-2缀合物，根据权利要求50所述的IL-2Rβγ结合蛋白，根据权利要求55所述的CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或根据权利要求61所述的药物组合物，不扩充所述细胞群体中的CD4+Treg细胞。

78.根据权利要求75所述的方法，其中在与根据权利要求1或2所述的分离并修饰的IL-2多肽，根据权利要求48或49所述的IL-2缀合物，根据权利要求50所述的IL-2Rβγ结合蛋白，根据权利要求55所述的CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或根据权利要求61所述的药物组合物孵育后，所述细胞群体中Teff细胞与Treg细胞之比为大约或至少2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、50:1或100:1。

79.根据权利要求75所述的方法，其中所述方法是体内方法。

80.根据权利要求75所述的方法，其中所述方法是体外方法。

81.根据权利要求75所述的方法，其中所述方法是离体方法。

82.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述受试者是人。

83.一种试剂盒，其包含根据权利要求1-47所述的分离并修饰的IL-2多肽，根据权利要求48或49所述的IL-2缀合物，根据权利要求50-52所述的IL-2Rβγ结合蛋白，根据权利要求55-60所述的CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或根据权利要求61-63所述的药物组合物。

用于治疗增生性和感染性疾病的细胞因子缀合物

交叉引用

[0001] 本申请要求2017年8月3日提交的第62/540,781号美国临时申请的权益,该美国临时申请通过引用整体并入本文。

序列表

[0002] 本申请含有序列表,该序列表已经以ASCII格式电子提交,并且通过引用整体并入本文。创建于2018年7月27日的所述ASCII副本被命名为46085-710_601_SL.txt,大小为3,703个字节。

背景技术

[0003] T细胞的不同群体调节免疫系统,以维持免疫稳态和耐受性。例如,调节性T(Treg)细胞通过防止病理性自身反应性而防止免疫系统的不适当应答,而细胞毒性T细胞则靶向并破坏感染的细胞和/或癌细胞。在一些情况下,对T细胞的不同群体的调节为疾病或适应症的治疗提供了选项。

发明内容

[0004] 在某些实施方案中,本文公开了细胞因子缀合物以及在治疗一种或多种适应症中的用途。在一些实施方案中,本文描述的还包括白介素2(IL-2)缀合物以及在治疗一种或多种适应症中的用途。在一些情况下,所述一种或多种适应症包括癌症或病原体感染。在一些情况下,本文描述了调节IL-2与IL-2受体之间的相互作用以刺激或扩充特异性T细胞、自然杀伤(NK)细胞和/或自然杀伤T(NKT)细胞群体的方法。在另外的情况下,本文进一步描述了包含一种或多种本文所述的白介素缀合物(例如,IL-2缀合物)的药物组合物和试剂盒。

[0005] 在某些实施方案中,本文公开了一种白介素2(IL-2)缀合物,其包含:分离并纯化的IL-2多肽;以及在选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72和Y107的氨基酸位置处与所述分离并纯化的IL-2多肽结合的缀合部分,其中氨基酸残基的编号对应于SEQ ID NO:1。在一些实施方案中,所述氨基酸位置选自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72和Y107。在一些实施方案中,所述氨基酸位置选自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、P65、V69、L72和Y107。在一些实施方案中,所述氨基酸位置选自T37、T41、F42、F44、Y45、P65、V69、L72和Y107。在一些实施方案中,所述氨基酸位置选自R38和K64。在一些实施方案中,所述氨基酸位置选自E61、E62和E68。在一些实施方案中,所述氨基酸位置在E62。在一些实施方案中,选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72和Y107的氨基酸残基进一步突变为赖氨酸、半胱氨酸或组氨酸。在一些实施方案中,所述氨基酸残基被突变为半胱氨酸。在一些实施方案中,所述氨基酸残基被突变为赖氨酸。在一些实施方案中,选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72和Y107的氨基酸残基进一步突变为非天然氨基酸。在一些实施方案中,所述非天然氨基酸包括N6-叠氮基乙氧基-L-赖氨酸(AzK)、N6-炔丙基乙氧基-L-赖氨酸(PraK)、BCN-L-赖氨酸、降冰片烯赖氨酸、TCO-赖氨酸、甲基四嗪赖氨酸、烯

丙氧基羰基赖氨酸、2-氨基-8-氧代壬酸、2-氨基-8-氧代辛酸、对乙酰基-L-苯丙氨酸、对叠氮基甲基-L-苯丙氨酸(pAMF)、对碘-L-苯丙氨酸、间乙酰基苯丙氨酸、2-氨基-8-氧代壬酸、对炔丙基氧基苯丙氨酸、对炔丙基-苯丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对叠氮基-L-苯丙氨酸、对酰基-L-苯丙氨酸、对苯甲酰基-L-苯丙氨酸、对溴苯丙氨酸、对氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、O-烯丙基酪氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、膦酰基酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAcp-丝氨酸、L-磷酸丝氨酸、膦酰基丝氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、2-氨基-3-((2-((3-(苄氧基)-3-氧代丙基)氨基)乙基)硒基)丙酸、2-氨基-3-(苯基硒基)丙酸或硒代半胱氨酸。在一些实施方案中，相对于野生型IL-2多肽，所述IL-2缀合物对IL-2受体α(IL-2Rα)亚基的亲和力降低。在一些实施方案中，所述亲和力的降低是相对于野生型IL-2多肽，对IL-2Rα的结合亲和力降低约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或大于99％。在一些实施方案中，所述亲和力的降低是相对于野生型IL-2多肽降低约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、30倍、50倍、100倍、200倍、300倍、500倍、1000倍或更多。在一些实施方案中，所述缀合部分损害或阻断IL-2与IL-2Rα的结合。在一些实施方案中，所述缀合部分包含水溶性聚合物。在一些实施方案中，额外的缀合部分包含水溶性聚合物。在一些实施方案中，每种所述水溶性聚合物独立地包括聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟基烷基甲基丙烯酰胺)、聚(羟基烷基甲基丙烯酸酯)、多糖、聚(α-羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷腈、聚噁唑啉(POZ)、聚(N-丙烯酰基吗啉)或其组合。在一些实施方案中，每种所述水溶性聚合物独立地包括PEG。在一些实施方案中，所述PEG是直链PEG或支链PEG。在一些实施方案中，每种所述水溶性聚合物独立地包括多糖。在一些实施方案中，所述多糖包括葡聚糖、聚唾液酸(PSA)、透明质酸(HA)、直链淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素(HS)、糊精或羟乙基淀粉(HES)。在一些实施方案中，每种所述水溶性聚合物独立地包括聚糖。在一些实施方案中，每种所述水溶性聚合物独立地包括多胺。在一些实施方案中，所述缀合部分包含蛋白质。在一些实施方案中，额外的缀合部分包含蛋白质。在一些实施方案中，每种所述蛋白质独立地包括白蛋白、转铁蛋白或运甲状腺素蛋白。在一些实施方案中，每种所述蛋白质独立地包括Fc部分。在一些实施方案中，每种所述蛋白质独立地包括IgG的Fc部分。在一些实施方案中，所述缀合部分包含多肽。在一些实施方案中，额外的缀合部分包含多肽。在一些实施方案中，每种所述多肽独立地包括XTEN肽、富含甘氨酸的高氨基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、弹性蛋白样多肽(ELP)、CTP肽或明胶样蛋白(GLK)聚合物。在一些实施方案中，所述分离并纯化的IL-2多肽通过谷氨酰化进行修饰。在一些实施方案中，所述缀合部分直接结合至所述分离并纯化的IL-2多肽。在一些实施方案中，所述缀合部分通过连接体间接结合至所述分离并纯化的IL-2多肽。在一些实施方案中，所述连接体包括同双官能连接体。在一些实施方案中，所述同双官能连接体包括Lomant试剂二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)DSP、3'3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS)、二琥珀酰亚胺基酒石酸酯(DST)、二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸酯(磺基DST)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、二琥珀酰亚胺基戊二酸酯(DSG)、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)、二亚胺代己二酸二甲酯(DMA)、庚二亚氨酸二甲酯(DMP)、辛二亚氨酸二甲酯(DMS)、3,3'-二硫代二丙亚氨酸二甲酯(DTBP)、1,4-二-(3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基)

丁烷(DPDPB)、双马来酰亚胺基己烷(BMH)、含芳基卤的化合物(DFDNB),例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯、4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯基砜(DFDNPS)、双-[β-(4-叠氮基水杨酰胺基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、己二酸二酰肼、碳酰肼、邻甲苯胺、3,3'-二甲基联苯胺、联苯胺、α,α'-对二氨基二苯基、二碘-对二甲苯磺酸、N,N'-亚乙基-双(碘乙酰胺)或N,N'-六亚甲基-双(碘乙酰胺)。在一些实施方案中,所述连接体包括异双官能连接体。在一些实施方案中,所述异双官能连接体包括N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(sPDP)、长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(LC-sPDP)、水溶性长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀酰亚胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基二硫代)甲苯(sMPT)、磺基琥珀酰亚胺基-6-[α-甲基-α-(2-吡啶基二硫代]-甲苯甲酰胺基]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBs)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBs)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(sIAB)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-sIAB)、琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基)琥珀酰亚胺酯(GMBs)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBs)、琥珀酰亚胺基6-((碘乙酰基)氨基)己酸酯(sIAX)、琥珀酰亚胺基6-[6-(((碘乙酰基)氨基)己酰基)氨基]己酸酯(sIAXX)、琥珀酰亚胺基4-(((碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-甲酸酯(sIAC)、琥珀酰亚胺基6-(((((4-(碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-羰基)氨基)己酸酯(sIACX)、对硝基苯基碘乙酸酯(NPIA)、羰基反应性和巯基反应性交联剂,如4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼(MPBH)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-酰肼-8(M_2C_2H)、3-(2-吡啶基二硫代)丙酰基酰肼(PDPH)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(NHs-AsA)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-(4-叠氮基水杨酰胺基)己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(对叠氮基水杨酰胺基)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAsD)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(HsAB)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰基氧基琥珀酰亚胺(ANB-NOs)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(间叠氮基-邻硝基苯甲酰胺基)-乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAND)、N-琥珀酰亚胺基-4(4-叠氮基苯基)1,3'-二硫代丙酸酯(sADP)、N-磺基琥珀酰亚胺基(4-叠氮基苯基)-1,3'-二硫代丙酸酯(磺基-sADP)、磺基琥珀酰亚胺基4-(对叠氮基苯基)丁酸酯(磺基-sAPB)、磺基琥珀酰亚胺基2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAED)、磺基琥珀酰亚胺基7-叠氮基-4-甲基香豆素3-乙酸酯(磺基-sAMCA)、对硝基苯基重氮基丙酮酸(pNPDP)、对硝基苯基-2-重氮基-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP)、1-(对叠氮基水杨酰胺基)-4-(碘乙酰胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(对叠氮基水杨酰胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫基)丙酰胺(APDP)、苯甲酮-4-碘乙酰胺、对叠氮基苯甲酰基酰肼(ABH)、4-(对叠氮基水杨酰胺基)丁胺(AsBA)或对叠氮基苯基乙二醛(APG)。在一些实施方案中,所述连接体包括可裂解的连接体,任选地包括二肽连接体。在一些实施方案中,所述二肽连接体包括Val-Cit、

Phe-Lys、Val-Ala或Val-Lys。在一些实施方案中，所述连接体包括不可裂解的连接体。在一些实施方案中，所述连接体包含马来酰亚胺基团，任选地包含马来酰亚胺基己酰基(mc)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)或磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)。在一些实施方案中，所述连接体进一步包含间隔基。在一些实施方案中，所述间隔基包含对氨基苄醇(PAB)、对氨基苄氧羰基(PABC)、其衍生物或类似物。在一些实施方案中，所述缀合部分能够延长IL-2缀合物的血清半衰期。在一些实施方案中，额外的缀合部分能够延长IL-2缀合物的血清半衰期。

[0006] 在某些实施方案中，本文公开了一种白介素2(IL-2)缀合物，其包含：分离并纯化的IL-2多肽；和缀合部分；其中相对于野生型IL-2多肽，该IL-2缀合物对IL-2受体α(IL-2Rα)亚基的亲和力降低。在一些实施方案中，所述缀合部分结合至与IL-2Rα相互作用的氨基酸残基。在一些实施方案中，所述缀合部分结合至选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72和Y107的氨基酸残基，其中氨基酸残基的编号对应于SEQ ID NO:1。在一些实施方案中，所述缀合部分包含水溶性聚合物。在一些实施方案中，额外的缀合部分包含水溶性聚合物。在一些实施方案中，每种所述水溶性聚合物独立地包括聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟基烷基甲基丙烯酰胺)、聚(羟基烷基甲基丙烯酸酯)、多糖、聚(α-羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷腈、聚噁唑啉(POZ)、聚(N-丙烯酰基吗啉)或其组合。在一些实施方案中，每种所述水溶性聚合物独立地包括PEG。在一些实施方案中，所述PEG是直链PEG或支链PEG。在一些实施方案中，每种所述水溶性聚合物独立地包括多糖。在一些实施方案中，所述多糖包括葡聚糖、聚唾液酸(PSA)、透明质酸(HA)、直链淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素(HS)、糊精或羟乙基淀粉(HES)。在一些实施方案中，每种所述水溶性聚合物独立地包括聚糖。在一些实施方案中，每种所述水溶性聚合物独立地包括多胺。在一些实施方案中，所述缀合部分包含蛋白质。在一些实施方案中，额外的缀合部分包含蛋白质。在一些实施方案中，每种所述蛋白质独立地包括白蛋白、转铁蛋白或运甲状腺素蛋白。在一些实施方案中，每种所述蛋白质独立地包括Fc部分。在一些实施方案中，每种所述蛋白质独立地包括IgG的Fc部分。在一些实施方案中，所述缀合部分包含多肽。在一些实施方案中，额外的缀合部分包含多肽。在一些实施方案中，每种所述多肽独立地包括XTEN肽、富含甘氨酸的高氨基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、弹性蛋白样多肽(ELP)、CTP肽或明胶样蛋白(GLK)聚合物。在一些实施方案中，所述分离并纯化的IL-2多肽通过谷氨酰化进行修饰。在一些实施方案中，所述缀合部分直接结合至所述分离并纯化的IL-2多肽。在一些实施方案中，所述缀合部分通过连接体间接结合至所述分离并纯化的IL-2多肽。在一些实施方案中，所述连接体包括同双官能连接体。在一些实施方案中，所述同双官能连接体包括Lomant试剂二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)DSP、3'3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS)、二琥珀酰亚胺基酒石酸酯(DST)、二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸酯(磺基DST)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、二琥珀酰亚胺基戊二酸酯(DSG)、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)、二亚胺代己二酸二甲酯(DMA)、庚二亚氨酸二甲酯(DMP)、辛二亚氨酸二甲酯(DMS)、3,3'-二硫代二丙亚氨酸二甲酯(DTBP)、1,4-二-(3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基)丁烷(DPDPB)、双马来酰亚胺基己烷(BMH)、含芳基卤的化合物(DFDNB)，例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯、4,4'-二氟-

3,3'-二硝基苯基砜(DFDNPS)、双-[β-(4-叠氮基水杨酰胺基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、己二酸二酰肼、碳酰肼、邻甲苯胺、3,3'-二甲基联苯胺、联苯胺、α,α'-对二氨基二苯基、二碘-对二甲苯磺酸、N,N'-亚乙基-双(碘乙酰胺)或N,N'-六亚甲基-双(碘乙酰胺)。在一些实施方案中,所述连接体包括异双官能连接体。在一些实施方案中,所述异双官能连接体包括N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(sPDP)、长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(LC-sPDP)、水溶性长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀酰亚胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基二硫代)甲苯(sMPT)、磺基琥珀酰亚胺基-6-[α-甲基-α-(2-吡啶基二硫代]-甲苯甲酰胺基]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBs)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBs)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(sIAB)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-sIAB)、琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基)琥珀酰亚胺酯(GMBs)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBs)、琥珀酰亚胺基6-((碘乙酰基)氨基)己酸酯(sIAX)、琥珀酰亚胺基6-[6-(((碘乙酰基)氨基)己酰基)氨基]己酸酯(sIAXX)、琥珀酰亚胺基4-(((碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-甲酸酯(sIAC)、琥珀酰亚胺基6-(((((4-(碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-羰基)氨基)己酸酯(sIACX)、对硝基苯基碘乙酸酯(NPIA)、羰基反应性和巯基反应性交联剂,如4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼(MPBH)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-酰肼-8(M_2C_2H)、3-(2-吡啶基二硫代)丙酰基酰肼(PDPH)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(NHs-AsA)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-(4-叠氮基水杨酰胺基)己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(对叠氮基水杨酰胺基)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAsD)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(HsAB)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰基氧基琥珀酰亚胺(ANB-NOs)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(间叠氮基-邻硝基苯甲酰胺基)-乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAND)、N-琥珀酰亚胺基-4(4-叠氮基苯基)1,3'-二硫代丙酸酯(sADP)、N-磺基琥珀酰亚胺基(4-叠氮基苯基)-1,3'-二硫代丙酸酯(磺基-sADP)、磺基琥珀酰亚胺基4-(对叠氮基苯基)丁酸酯(磺基-sAPB)、磺基琥珀酰亚胺基2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAED)、磺基琥珀酰亚胺基7-叠氮基-4-甲基香豆素3-乙酸酯(磺基-sAMCA)、对硝基苯基重氮基丙酮酸(pNPDP)、对硝基苯基-2-重氮基-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP)、1-(对叠氮基水杨酰胺基)-4-(碘乙酰胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(对叠氮基水杨酰胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫基)丙酰胺(APDP)、苯甲酮-4-碘乙酰胺、对叠氮基苯甲酰基酰肼(ABH)、4-(对叠氮基水杨酰胺基)丁胺(AsBA)或对叠氮基苯基乙二醛(APG)。在一些实施方案中,所述连接体包括可裂解的连接体,任选地包括二肽连接体。在一些实施方案中,所述二肽连接体包括Val-Cit、Phe-Lys、Val-Ala或Val-Lys。在一些实施方案中,所述连接体包括不可裂解的连接体。在一些实施方案中,所述连接体包含马来酰

亚胺基团，任选地包含马来酰亚胺基己酰基(mc)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)或磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)。在一些实施方案中，所述连接体进一步包含间隔基。在一些实施方案中，所述间隔基包含对氨基苄醇(PAB)、对氨基苄氧羰基(PABC)、其衍生物或类似物。在一些实施方案中，所述缀合部分能够延长IL-2缀合物的血清半衰期。在一些实施方案中，额外的缀合部分能够延长IL-2缀合物的血清半衰期。

[0007] 在某些实施方案中，本文公开了一种分离并修饰的白介素2(IL-2)多肽，其在该多肽的位置上包含至少一个非天然氨基酸，该非天然氨基酸降低该修饰的IL-2多肽与白介素2受体α(IL-2Rα)之间的结合，但不会显著削弱与白介素2βγ受体(IL-2Rβγ)信号传导复合物结合形成IL-2/IL-2Rβγ复合物，其中与IL-2Rα结合的降低是相比于野生型IL-2多肽与IL-2Rα之间的结合。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E60、E61、E62、K64、P65、E68、V69、N71、L72、M104、C105和Y107，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、69、71、72、104、105和107。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、P65、E68和L72，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置37、38、41、42、43、44、45、61、62、65、68和72。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自K35、K64、V69、N71、M104、C105和Y107，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置35、64、69、71、104、105和107。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自T37、R38、T41、Y45、E61、E68和L72，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置37、38、41、45、61、68和72。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自F42、K43、F44、E62和P65，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置42、43、44、62和65。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸：是赖氨酸类似物；包含芳族侧链；包含叠氮基；或包含醛或酮基团。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸不包含芳族侧链。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸包括N6-叠氮基乙氧基-L-赖氨酸(AzK)、N6-炔丙基乙氧基-L-赖氨酸(PraK)、BCN-L-赖氨酸、降冰片烯赖氨酸、TCO-赖氨酸、甲基四嗪赖氨酸、烯丙氧基羰基赖氨酸、2-氨基-8-氧代壬酸、2-氨基-8-氧代辛酸、对乙酰基-L-苯丙氨酸、对叠氮基甲基-L-苯丙氨酸(pAMF)、对碘-L-苯丙氨酸、间乙酰基苯丙氨酸、2-氨基-8-氧代壬酸、对炔丙基氧基苯丙氨酸、对炔丙基-苯丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对叠氮基-L-苯丙氨酸、对酰基-L-苯丙氨酸、对苯甲酰基-L-苯丙氨酸、对溴苯丙氨酸、对氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、O-烯丙基酪氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、膦酰基酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAcp-丝氨酸、L-磷酸丝氨酸、膦酰基丝氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、2-氨基-3-((2-((3-(苄氧基)-3-氧代丙基)氨基)乙基)硒基)丙酸、2-氨基-3-(苯基硒基)丙酸或硒代半胱氨酸。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸通过正交tRNA合成酶/tRNA对掺入所述修饰的IL-2多肽中。在一些实施方案中，所述正交tRNA合成酶/tRNA对的正交tRNA包含至少一个非天然核碱基。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽通过所述至少一个非天然氨基酸共价连接至缀合部分。在一些实施方案中，所述缀合部分包含水溶性聚合物、脂质、蛋白质或肽。在一些实施方案中，该水溶性聚合物包括聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、

聚(羟基烷基甲基丙烯酰胺)、聚(羟基烷基甲基丙烯酸酯)、多糖、聚(α-羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷腈、聚噁唑啉(POZ)、聚(N-丙烯酰基吗啉)或其组合。在一些实施方案中,该水溶性聚合物包括PEG分子。在一些实施方案中,该PEG分子是直链PEG。在一些实施方案中,该PEG分子是支链PEG。在一些实施方案中,该水溶性聚合物包括多糖。在一些实施方案中,该多糖包括葡聚糖、聚唾液酸(PSA)、透明质酸(HA)、直链淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素(HS)、糊精或羟乙基淀粉(HES)。在一些实施方案中,所述脂质包括脂肪酸。在一些实施方案中,该脂肪酸包含约6至约26个碳原子、约6至约24个碳原子、约6至约22个碳原子、约6至约20个碳原子、约6至约18个碳原子、约20至约26个碳原子、约12至约26个碳原子、约12至约24个碳原子、约12至约22个碳原子、约12至约20个碳原子或约12至约18个碳原子。在一些实施方案中,该脂肪酸是饱和脂肪酸。在一些实施方案中,所述蛋白质包括白蛋白、转铁蛋白或运甲状腺素蛋白。在一些实施方案中,该蛋白质包含TLR激动剂。在一些实施方案中,该蛋白质包括抗体或其结合片段。在一些实施方案中,该抗体或其结合片段包括抗体的Fc部分。在一些实施方案中,所述肽包括XTEN肽、富含甘氨酸的高氨基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、弹性蛋白样多肽(ELP)、CTP肽或明胶样蛋白(GLK)聚合物。在一些实施方案中,所述缀合部分通过连接体间接结合至所述修饰的IL-2的所述至少一个非天然氨基酸。在一些实施方案中,该连接体包括同双官能连接体、异双官能连接体、零长度连接体,可裂解或不可裂解的二肽连接体、马来酰亚胺基团、间隔基或其组合。在一些实施方案中,结合亲和力的降低是相对于野生型IL-2多肽,对IL-2Rα的结合亲和力降低约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。在一些实施方案中,结合亲和力的降低是相对于野生型IL-2多肽,对IL-2Rα的结合亲和力降低约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2多肽是:全长IL-2多肽的功能活性片段;重组IL-2多肽;或重组人IL-2多肽。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2多肽包含N-末端缺失、C-末端缺失或其组合。在一些实施方案中,该N-末端缺失包括从N-末端缺失前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25或30个残基,其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中,该C-末端缺失包括从C-末端缺失最后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20个或更多个残基,其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中,所述功能活性片段包含IL-2区域10-133、20-133、30-133、10-130、20-130、30-130、10-125、20-125、30-125、1-130或1-125,其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2多肽与SEQ ID NO:1具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。在一些实施方案中,对IL-2Rα的结合亲和力降低的修饰的IL-2多肽能够扩充CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞群体或其组合。在一些实施方案中,所述缀合部分损害或阻断IL-2与IL-2Rα的结合。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2多肽通过IL-2Rβγ复合物对CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体的激活与野生型IL-2多肽对所述细胞群体的激活没有显著不同,并且其中所述修饰的IL-2多肽的效力比野生型IL-2多肽的效力高至少1倍。在一些实施方案中,当所述激活剂与所述细胞群体接触时,所述修饰的IL-2多肽使CD4+T调节性(Treg)细胞扩充少于20%、15%、10%、5%、1%或0.1%。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2多肽不扩充所述细胞群体中的Treg细胞。

[0008] 在某些实施方案中,本文公开了一种分离并修饰的白介素2(IL-2)多肽,其在该多

肽的位置上包含至少一个非天然氨基酸，该非天然氨基酸降低该修饰的IL-2多肽与白介素2受体α(IL-2Rα)之间的结合，但保留与白介素2βγ受体(IL-2Rβγ)信号传导复合物显著结合以形成IL-2/IL-2Rβγ复合物，其中与IL-2Rα结合的降低是相比于野生型IL-2多肽与IL-2Rα之间的结合。在一些实施方案中，受体信号传导效力的差异小于5倍、小于4倍、小于3倍、小于2倍或小于1倍。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E60、E61、E62、K64、P65、E68、V69、N71、L72、M104、C105和Y107，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、69、71、72、104、105和107。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、P65、E68和L72，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置37、38、41、42、43、44、45、61、62、65、68和72。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自K35、K64、V69、N71、M104、C105和Y107，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置35、64、69、71、104、105和107。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自T37、R38、T41、Y45、E61、E68和L72，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置37、38、41、45、61、68和72。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自F42、K43、F44、E62和P65，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置42、43、44、62和65。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸：是赖氨酸类似物；包含芳族侧链；包含叠氮基；包含炔烃基团；或包含醛或酮基团。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸不包含芳族侧链。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸包括N6-叠氮基乙氧基-L-赖氨酸(AzK)、N6-炔丙基乙氧基-L-赖氨酸(PraK)、BCN-L-赖氨酸、降冰片烯赖氨酸、TCO-赖氨酸、甲基四嗪赖氨酸、烯丙氧基羰基赖氨酸、2-氨基-8-氧代壬酸、2-氨基-8-氧代辛酸、对乙酰基-L-苯丙氨酸、对叠氮基甲基-L-苯丙氨酸(pAMF)、对碘-L-苯丙氨酸、间乙酰基苯丙氨酸、2-氨基-8-氧代壬酸、对炔丙基氧基苯丙氨酸、对炔丙基-苯丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对叠氮基-L-苯丙氨酸、对酰基-L-苯丙氨酸、对苯甲酰基-L-苯丙氨酸、对溴苯丙氨酸、对氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、O-烯丙基酪氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、膦酰基酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAcp-丝氨酸、L-磷酸丝氨酸、膦酰基丝氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、2-氨基-3-((2-((3-(苄氧基)-3-氧代丙基)氨基)乙基)硒基)丙酸、2-氨基-3-(苯基硒基)丙酸或硒代半胱氨酸。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸通过正交tRNA合成酶/tRNA对掺入所述修饰的IL-2多肽中。在一些实施方案中，所述正交tRNA合成酶/tRNA对的正交tRNA包含至少一个非天然核碱基。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽通过所述至少一个非天然氨基酸共价连接至缀合部分。在一些实施方案中，所述缀合部分包含水溶性聚合物、脂质、蛋白质或肽。在一些实施方案中，该水溶性聚合物包括聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟基烷基甲基丙烯酰胺)、聚(羟基烷基甲基丙烯酸酯)、多糖、聚(α-羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷腈、聚噁唑啉(POZ)、聚(N-丙烯酰基吗啉)或其组合。在一些实施方案中，该水溶性聚合物包括PEG分子。在一些实施方案中，该PEG分子是直链PEG。在一些实施方案中，该PEG分子是支链PEG。在一些实施方案中，该水溶性聚合物包括多糖。在一些实施方案中，该多糖包括葡聚糖、聚唾液酸(PSA)、透明质酸(HA)、直链淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素(HS)、糊精或羟乙基淀粉(HES)。在一些实施方案中，所述脂质包括脂肪酸。在一些实施方

案中，该脂肪酸包含约6至约26个碳原子、约6至约24个碳原子、约6至约22个碳原子、约6至约20个碳原子、约6至约18个碳原子、约20至约26个碳原子、约12至约26个碳原子、约12至约24个碳原子、约12至约22个碳原子、约12至约20个碳原子或约12至约18个碳原子。在一些实施方案中，该脂肪酸是饱和脂肪酸。在一些实施方案中，所述蛋白质包含白蛋白、转铁蛋白或运甲状腺素蛋白。在一些实施方案中，所述缀合部分包含TLR激动剂。在一些实施方案中，该蛋白质包括抗体或其结合片段。在一些实施方案中，该抗体或其结合片段包括抗体的Fc部分。在一些实施方案中，所述肽包括XTEN肽、富含甘氨酸的高氨基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、弹性蛋白样多肽(ELP)、CTP肽或明胶样蛋白(GLK)聚合物。在一些实施方案中，所述缀合部分通过连接体间接结合至所述修饰的IL-2的所述至少一个非天然氨基酸。在一些实施方案中，该连接体包括同双官能连接体、异双官能连接体、零长度连接体，可裂解或不可裂解的二肽连接体、马来酰亚胺基团、间隔基或其组合。在一些实施方案中，结合亲和力的降低是相对于野生型IL-2多肽，对IL-2Rα的结合亲和力降低约30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或100％。在一些实施方案中，结合亲和力的降低是相对于野生型IL-2多肽，对IL-2Rα的结合亲和力降低约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽是：全长IL-2多肽的功能活性片段；重组IL-2多肽；或重组人IL-2多肽。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽包含N-末端缺失、C-末端缺失或其组合。在一些实施方案中，该N-末端缺失包括从N-末端缺失前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25或30个残基，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，该C-末端缺失包括从C-末端缺失最后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20个或更多个残基，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，所述功能活性片段包含IL-2区域10-133、20-133、30-133、10-130、20-130、30-130、10-125、20-125、30-125、1-130或1-125，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽与SEQ ID NO:1具有约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的序列同一性。在一些实施方案中，对IL-2Rα的结合亲和力降低的修饰的IL-2多肽能够扩充CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞群体或其组合。在一些实施方案中，所述缀合部分或非天然氨基酸损害或阻断IL-2与IL-2Rα的结合。在一些实施方案中，相对于野生型IL-2多肽，所述修饰的IL-2多肽通过IL-2Rβγ复合物对CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体的激活保留激活所述细胞群体的显著效力。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力高于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力低于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽表现出对IL-2Rβγ的第一受体信号传导效力和对IL-2Rαβγ的第二受体信号传导效力，并且其中第一受体信号传导效力比第二受体信号传导效力高至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍、500倍或更高。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽的第一受体信号传导效力高于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ的受体信号传导效力，并且所述修饰的IL-2多肽的第二受体信号传导效力低于野生型IL-2多肽对IL-2Rαβγ的受体信号传导效力。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽的第一受体信号传导效力比野生型IL-2多肽的受体信号传导效力低至少1倍。

[0009] 在某些实施方案中，本文公开了包含至少一个非天然氨基酸的分离并修饰的白介素2(IL-2)多肽，其中该分离并修饰的IL-2多肽表现出对IL-2βγ信号传导复合物的第一受体信号传导效力和对IL-2αβγ信号传导复合物的第二受体信号传导效力，并且其中第一受体信号传导效力与第二受体信号传导效力之差小于10倍。在一些实施方案中，受体信号传导效力的差异小于5倍、小于4倍、小于3倍、小于2倍或小于1倍。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E60、E61、E62、K64、P65、E68、V69、N71、L72、M104、C105和Y107，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、69、71、72、104、105和107。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、P65、E68和L72，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置37、38、41、42、43、44、45、61、62、65、68和72。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自K35、K64、V69、N71、M104、C105和Y107，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置35、64、69、71、104、105和107。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自T37、R38、T41、Y45、E61、E68和L72，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置37、38、41、45、61、68和72。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自F42、K43、F44、E62和P65，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置42、43、44、62和65。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸：是赖氨酸类似物；包含芳族侧链；包含叠氮基；包含炔烃基团；或包含醛或酮基团。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸不包含芳族侧链。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸包括N6-叠氮基乙氧基-L-赖氨酸(AzK)、N6-炔丙基乙氧基-L-赖氨酸(PraK)、BCN-L-赖氨酸、降冰片烯赖氨酸、TCO-赖氨酸、甲基四嗪赖氨酸、烯丙氧基羰基赖氨酸、2-氨基-8-氧代壬酸、2-氨基-8-氧代辛酸、对乙酰基-L-苯丙氨酸、对叠氮基甲基-L-苯丙氨酸(pAMF)、对碘-L-苯丙氨酸、间乙酰基苯丙氨酸、2-氨基-8-氧代壬酸、对炔丙基氧基苯丙氨酸、对炔丙基-苯丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对叠氮基-L-苯丙氨酸、对酰基-L-苯丙氨酸、对苯甲酰基-L-苯丙氨酸、对溴苯丙氨酸、对氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、O-烯丙基酪氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、膦酰基酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAcp-丝氨酸、L-磷酸丝氨酸、膦酰基丝氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、2-氨基-3-((2-((3-(苄氧基)-3-氧代丙基)氨基)乙基)硒基)丙酸、2-氨基-3-(苯基硒基)丙酸或硒代半胱氨酸。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸通过正交tRNA合成酶/tRNA对掺入所述修饰的IL-2多肽中。在一些实施方案中，所述正交tRNA合成酶/tRNA对的正交tRNA包含至少一个非天然核碱基。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽通过所述至少一个非天然氨基酸共价连接至缀合部分。在一些实施方案中，所述缀合部分包含水溶性聚合物、脂质、蛋白质或肽。在一些实施方案中，该水溶性聚合物包括聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟基烷基甲基丙烯酰胺)、聚(羟基烷基甲基丙烯酸酯)、多糖、聚(α-羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷腈、聚噁唑啉(POZ)、聚(N-丙烯酰基吗啉)或其组合。在一些实施方案中，该水溶性聚合物包括PEG分子。在一些实施方案中，该PEG分子是直链PEG。在一些实施方案中，该PEG分子是支链PEG。在一些实施方案中，该水溶性聚合物包括多糖。在一些实施方案中，该多糖包括葡聚糖、聚唾液酸(PSA)、透明质酸(HA)、直链淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素(HS)、糊精或羟乙基淀粉(HES)。在一些实施

方案中，所述脂质包括脂肪酸。在一些实施方案中，该脂肪酸包含约6至约26个碳原子、约6至约24个碳原子、约6至约22个碳原子、约6至约20个碳原子、约6至约18个碳原子、约20至约26个碳原子、约12至约26个碳原子、约12至约24个碳原子、约12至约22个碳原子、约12至约20个碳原子或约12至约18个碳原子。在一些实施方案中，该脂肪酸是饱和脂肪酸。在一些实施方案中，所述蛋白质包括白蛋白、转铁蛋白或运甲状腺素蛋白。在一些实施方案中，所述缀合部分包含TLR激动剂。在一些实施方案中，该蛋白质包括抗体或其结合片段。在一些实施方案中，该抗体或其结合片段包括抗体的Fc部分。在一些实施方案中，所述肽包括XTEN肽、富含甘氨酸的高氨基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、弹性蛋白样多肽(ELP)、CTP肽或明胶样蛋白(GLK)聚合物。在一些实施方案中，所述缀合部分通过连接体间接结合至所述修饰的IL-2的所述至少一个非天然氨基酸。在一些实施方案中，该连接体包括同双官能连接体、异双官能连接体、零长度连接体，可裂解或不可裂解的二肽连接体、马来酰亚胺基团、间隔基或其组合。在一些实施方案中，结合亲和力的降低是相对于野生型IL-2多肽，对IL-2Rα的结合亲和力降低约30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或100％。在一些实施方案中，结合亲和力的降低是相对于野生型IL-2多肽，对IL-2Rα的结合亲和力降低约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽是：全长IL-2多肽的功能活性片段；重组IL-2多肽；或重组人IL-2多肽。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽包含N-末端缺失、C-末端缺失或其组合。在一些实施方案中，该N-末端缺失包括从N-末端缺失前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25或30个残基，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，该C-末端缺失包括从C-末端缺失最后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20个或更多个残基，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，所述功能活性片段包含IL-2区域10-133、20-133、30-133、10-130、20-130、30-130、10-125、20-125、30-125、1-130或1-125，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽与SEQ ID NO:1具有约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的序列同一性。在一些实施方案中，对IL-2Rα的结合亲和力降低的修饰的IL-2多肽能够扩充CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞群体或其组合。在一些实施方案中，所述缀合部分或非天然氨基酸损害或阻断IL-2与IL-2Rα的结合。在一些实施方案中，相对于野生型IL-2多肽，所述修饰的IL-2多肽通过IL-2Rβγ复合物对CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体的激活保留激活所述细胞群体的显著效力。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力高于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力低于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽表现出对IL-2Rβγ的第一受体信号传导效力和对IL-2Rαβγ的第二受体信号传导效力，并且其中第一受体信号传导效力比第二受体信号传导效力高至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍、500倍或更高。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽的第一受体信号传导效力高于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ的受体信号传导效力，并且所述修饰的IL-2多肽的第二受体信号传导效力低于野生型IL-2多肽对IL-2Rαβγ的受体信号传导效力。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽的第一受体信号传导效力比野生型IL-2多肽的受体

信号传导效力低至少1倍。

[0010] 在某些实施方案中，本文公开了包含至少一个非天然氨基酸的分离并修饰的白介素2(IL-2)多肽，其中该分离并修饰的IL-2多肽提供激活IL-2βγ信号传导复合物的第一EC50值和激活IL-2αβγ信号传导复合物的第二EC50值，并且其中第一EC50值与第二EC50值之差小于10倍。在一些实施方案中，该差异小于5倍、小于4倍、小于3倍、小于2倍或小于1倍。在一些实施方案中，受体信号传导效力的差异小于5倍、小于4倍、小于3倍、小于2倍或小于1倍。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E60、E61、E62、K64、P65、E68、V69、N71、L72、M104、C105和Y107，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、69、71、72、104、105和107。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、P65、E68和L72，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置37、38、41、42、43、44、45、61、62、65、68和72。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自K35、K64、V69、N71、M104、C105和Y107，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置35、64、69、71、104、105和107。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自T37、R38、T41、Y45、E61、E68和L72，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置37、38、41、45、61、68和72。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸的位置选自F42、K43、F44、E62和P65，其中残基位置对应于SEQ ID NO:1所示的位置42、43、44、62和65。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸：是赖氨酸类似物；包含芳族侧链；包含叠氮基；包含炔烃基团；或包含醛或酮基团。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸不包含芳族侧链。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸包括N6-叠氮基乙氧基-L-赖氨酸(AzK)、N6-炔丙基乙氧基-L-赖氨酸(PraK)、BCN-L-赖氨酸、降冰片烯赖氨酸、TCO-赖氨酸、甲基四嗪赖氨酸、烯丙氧基羰基赖氨酸、2-氨基-8-氧代壬酸、2-氨基-8-氧代辛酸、对乙酰基-L-苯丙氨酸、对叠氮基甲基-L-苯丙氨酸(pAMF)、对碘-L-苯丙氨酸、间乙酰基苯丙氨酸、2-氨基-8-氧代壬酸、对炔丙基氧基苯丙氨酸、对炔丙基-苯丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对叠氮基-L-苯丙氨酸、对酰基-L-苯丙氨酸、对苯甲酰基-L-苯丙氨酸、对溴苯丙氨酸、对氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、O-烯丙基酪氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、膦酰基酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAcp-丝氨酸、L-磷酸丝氨酸、膦酰基丝氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、2-氨基-3-((2-((3-(苄氧基)-3-氧代丙基)氨基)乙基)硒基)丙酸、2-氨基-3-(苯基硒基)丙酸或硒代半胱氨酸。在一些实施方案中，所述至少一个非天然氨基酸通过正交tRNA合成酶/tRNA对掺入所述修饰的IL-2多肽中。在一些实施方案中，所述正交tRNA合成酶/tRNA对的正交tRNA包含至少一个非天然核碱基。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽通过所述至少一个非天然氨基酸共价连接至缀合部分。在一些实施方案中，所述缀合部分包含水溶性聚合物、脂质、蛋白质或肽。在一些实施方案中，该水溶性聚合物包括聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟基烷基甲基丙烯酰胺)、聚(羟基烷基甲基丙烯酸酯)、多糖、聚(α-羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷腈、聚噁唑啉(POZ)、聚(N-丙烯酰基吗啉)或其组合。在一些实施方案中，该水溶性聚合物包括PEG分子。在一些实施方案中，该PEG分子是直链PEG。在一些实施方案中，该PEG分子是支链PEG。在一些实施方案中，该水溶性聚合物包括多糖。在一些实施方案中，该多糖

包括葡聚糖、聚唾液酸(PSA)、透明质酸(HA)、直链淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素(HS)、糊精或羟乙基淀粉(HES)。在一些实施方案中,所述脂质包括脂肪酸。在一些实施方案中,该脂肪酸包含约6至约26个碳原子、约6至约24个碳原子、约6至约22个碳原子、约6至约20个碳原子、约6至约18个碳原子、约20至约26个碳原子、约12至约26个碳原子、约12至约24个碳原子、约12至约22个碳原子、约12至约20个碳原子或约12至约18个碳原子。在一些实施方案中,该脂肪酸是饱和脂肪酸。在一些实施方案中,所述蛋白质包括白蛋白、转铁蛋白或运甲状腺素蛋白。在一些实施方案中,所述缀合部分包含TLR激动剂。在一些实施方案中,该蛋白质包括抗体或其结合片段。在一些实施方案中,该抗体或其结合片段包括抗体的Fc部分。在一些实施方案中,所述肽包括XTEN肽、富含甘氨酸的高氨基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、弹性蛋白样多肽(ELP)、CTP肽或明胶样蛋白(GLK)聚合物。在一些实施方案中,所述缀合部分通过连接体间接结合至所述修饰的IL-2的所述至少一个非天然氨基酸。在一些实施方案中,该连接体包括同双官能连接体、异双官能连接体、零长度连接体,可裂解或不可裂解的二肽连接体、马来酰亚胺基团、间隔基或其组合。在一些实施方案中,结合亲和力的降低是相对于野生型IL-2多肽,对IL-2Rα的结合亲和力降低约30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。在一些实施方案中,结合亲和力的降低是相对于野生型IL-2多肽,对IL-2Rα的结合亲和力降低约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2多肽是:全长IL-2多肽的功能活性片段;重组IL-2多肽;或重组人IL-2多肽。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2多肽包含N-末端缺失、C-末端缺失或其组合。在一些实施方案中,该N-末端缺失包括从N-末端缺失前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25或30个残基,其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中,该C-末端缺失包括从C-末端缺失最后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20个或更多个残基,其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中,所述功能活性片段包含IL-2区域10-133、20-133、30-133、10-130、20-130、30-130、10-125、20-125、30-125、1-130或1-125,其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2多肽与SEQ ID NO:1具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。在一些实施方案中,对IL-2Rα的结合亲和力降低的修饰的IL-2多肽能够扩充CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞群体或其组合。在一些实施方案中,所述缀合部分或非天然氨基酸损害或阻断IL-2与IL-2Rα的结合。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2多肽,所述修饰的IL-2多肽通过IL-2Rβγ复合物对CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体的激活保留激活所述细胞群体的显著效力。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力高于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力低于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2多肽表现出对IL-2Rβγ的第一受体信号传导效力和对IL-2Rαβγ的第二受体信号传导效力,并且其中第一受体信号传导效力比第二受体信号传导效力高至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍、500倍或更高。在一些实施方案中,所述修饰的IL-2多肽的第一受体信号传导效力高于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ的受体信号传导效力,并且所述修饰的IL-2多肽的第二受体信号传导效力低于野生型IL-2多肽对IL-2Rαβγ的受

体信号传导效力。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽的第一受体信号传导效力比野生型IL-2多肽的受体信号传导效力低至少1倍。

[0011] 在某些实施方案中，本文公开了一种药物组合物，其包含：上述IL-2缀合物；和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中，该药物组合物被配制用于肠胃外给药。

[0012] 在某些实施方案中，本文公开了一种治疗有需要的受试者的增生性疾病或病况的方法，该方法包括向该受试者施用治疗有效量的上述分离并修饰的IL-2多肽，上述IL-2缀合物，上述IL-2Rβγ结合蛋白，上述CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或上述药物组合物。在一些实施方案中，该增生性疾病或病况是癌症。在一些实施方案中，该癌症是实体瘤癌症。在一些实施方案中，该实体瘤癌症是膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食道癌、眼癌、头颈癌、肾癌、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌或前列腺癌。在一些实施方案中，该癌症是血液系统恶性肿瘤。在一些实施方案中，该血液系统恶性肿瘤是慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高恶性B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或淋巴瘤样肉芽肿病。在一些实施方案中，所述方法进一步包括施用额外的治疗剂。在一些实施方案中，同时施用所述分离并修饰的IL-2多肽，IL-2缀合物，IL-2Rβγ结合蛋白，CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或药物组合物，和所述额外的治疗剂。在一些实施方案中，依次施用所述分离并修饰的IL-2多肽，IL-2缀合物，IL-2Rβγ结合蛋白，CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或药物组合物，和所述额外的治疗剂。在一些实施方案中，在所述额外的治疗剂之前施用所述分离并修饰的IL-2多肽，IL-2缀合物，IL-2Rβγ结合蛋白，CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或药物组合物。在一些实施方案中，在施用所述额外的治疗剂之后施用所述分离并修饰的IL-2多肽，IL-2缀合物，IL-2Rβγ结合蛋白，CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或药物组合物。

[0013] 在某些实施方案中，本文公开了一种扩充CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体的方法，其包括：使细胞群体接触上述分离并修饰的IL-2多肽，上述IL-2缀合物，上述IL-2Rβγ结合蛋白，上述CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或上述药物组合物，持续足以诱导与IL-2Rβγ形成复合物的时间，从而刺激Teff和/或NK细胞群体的扩充。在一些实施方案中，相比于与野生型IL-2多肽接触的CD3+细胞群体中CD4+T调节(Treg)细胞的扩充，上述分离并修饰的IL-2多肽，上述IL-2缀合物，上述IL-2Rβγ结合蛋白，上述IL-2Rβγ结合蛋白，上述CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或上述药物组合物，使CD3+细胞群体中CD4+Treg细胞扩充少于20％、15％、10％、5％或1％。在一些实施方案中，上述分离并修饰的IL-2多肽，上述IL-2

缀合物，上述IL-2Rβγ结合蛋白，上述CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或上述药物组合物，不扩充所述细胞群体中的CD4+Treg细胞。在一些实施方案中，在与上述分离并修饰的IL-2多肽，上述IL-2缀合物，上述IL-2Rβγ结合蛋白，上述CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或上述药物组合物孵育后，细胞群体中Teff细胞与Treg细胞之比为大约或至少2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、50:1或100:1。在一些实施方案中，所述方法是体内方法。在一些实施方案中，所述方法是体外方法。在一些实施方案中，所述方法是离体方法。

[0014] 在某些实施方案中，本文公开了一种扩充CD4+辅助细胞群体、CD8+效应幼稚和/或记忆细胞群体、自然杀伤(NK)细胞群体、自然杀伤T(NKT)细胞群体或其组合的方法，其包括：(a)使细胞与上述IL-2缀合物接触；以及(b)使IL-2与IL-2Rβ和IL-2Rγ亚基相互作用以形成IL-2/IL-2Rβγ复合物；其中所述IL-2缀合物对IL-2Rα亚基的亲和力降低，并且其中所述IL-2/IL-2Rβγ复合物刺激CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和/或记忆细胞、NK细胞、NKT细胞或其组合的扩充。

[0015] 在某些实施方案中，本文公开了一种试剂盒，其包含上述分离并修饰的IL-2多肽，上述IL-2缀合物，上述IL-2Rβγ结合蛋白，上述CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，或上述包含IL-2缀合物的药物组合物。在一些实施方案中，本文还描述了一种试剂盒，其包含编码上述IL-2多肽的多核酸分子。

附图说明

[0016] 本发明的新颖特征在所附权利要求书中具体阐述。通过参考以下对利用本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述以及附图，将会对本发明的特征和优点获得更好的理解，在这些附图中：

[0017] 图1显示了示例性的非天然氨基酸。该图改编自Young等人，“Beyond the canonical 20amino acids:expanding the genetic lexicon,”J.of Biological Chemistry 285(15):11039-11044(2010)的图2。

[0018] 图2A-图2B示出了示例性的非天然氨基酸。图2A示出了示例性的赖氨酸衍生物。图2B示出了示例性的苯丙氨酸衍生物。

[0019] 图3A-图3D示出了示例性的非天然氨基酸。这些非天然氨基酸(UAA)已在蛋白质中遗传编码(图3A-UAA#1-42；图3B-UAA#43-89；图3C-UAA#90-128；图3D-UAA#129-167)。图5A-5D采自Dumas等人，Chemical Science 2015,6,50-69的表1。

[0001] 图4A-图4B显示了P65_30kD、P65_5kD、E62_30kD和E62_5kD PEG缀合物的表面等离子体共振(SPR)分析。图4A显示了与固定的IL-2Rα结合的IL-2变体的SPR分析。图4B显示了与固定的IL-2Rβ结合的IL-2变体的SPR分析。

[0002] 图5A-图5C显示了人LRS原代细胞群体中pSTAT5信号传导的示例性IL-2变体剂量响应曲线。图5A：天然IL-2；图5B：E62_30kD；图5C：P65_30kD。

[0003] 图6显示了在向C57BL/6小鼠单次静脉内推注阿地白介素(IL-2)、E62_5、E62_30和P65_30后的平均(±SD)血浆浓度-时间曲线。

[0004] 图7显示了对C57BL/6小鼠用单次静脉内推注剂量的P65_30或阿地白介素治疗后，外周血中pSTAT5+CD8+T细胞随时间变化的百分比。

[0005] 图8A-图8C显示了用单次静脉内推注剂量的P65_30或阿地白介素(IL-2)治疗后，PBMC群体中CD8+T细胞(图8A)、NK细胞(图8B)和CD4+Treg细胞(图8C)的百分比。在所示的时间点通过心脏穿刺抽血，并通过流式细胞术评估免疫细胞群体。每个数据点代表每个时间点的3次重复的平均值±SEM。

[0006] 图9A-图9B显示了用单次静脉内推注剂量的P65_30或阿地白介素(IL-2)治疗后，P65_30与IL-2(阿地白介素)在刺激CD3+群体内的记忆CD8+CD44+T细胞增殖方面的差异。在所示的时间点通过心脏穿刺抽血，并通过流式细胞术评估免疫细胞群体。使用非配对Student t检验分析数据。***表示P值<0.001。图9A显示了在72、96和120小时时的记忆CD8+CD44+T细胞增殖。图9B显示了在120h时间点，这些细胞的流式细胞术分析。

[0007] 图10显示了用单次静脉内推注剂量的P65_30治疗后，荷有同源B16F10肿瘤的C57Bl6小鼠中的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)随时间的增加。图10A显示了在治疗的第5天，与未治疗的(媒介物)动物相比，经P65_30治疗的动物中NK、CD8+T和CD4+Treg细胞的百分比。图10B显示了在经P65_30治疗的和对照(媒介物)动物中，CD8+/CD4+Treg细胞的比例。使用非配对Student t检验分析数据。***表示P值<0.001。

[0020] 图11A-图11B显示了在以渐增水平(0.01-5mg/kg)用单次静脉内推注剂量的P65_30或阿地白介素(IL-2)治疗后，小鼠IL-2、TNF-α、IFNγ、IL-5和IL-6的血浆水平。通过ELISA(Abcam,Cambridge,UK)测定血浆中每种细胞因子的浓度。对于每个剂量组，N＝3只小鼠，并在给药后4、34和72h收集样品。图11A显示了给予阿地白介素的动物的细胞因子水平，图11B则显示了给予P65_30的动物的细胞因子水平。

[0021] 图12显示了对雄性食蟹猴给予单次静脉内剂量的P65_30kD后的白细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞计数(平均值±SD)。

具体实施方式

[0022] 细胞因子包括一类细胞信号传导蛋白质，如趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子、肿瘤坏死因子和其他在先天性和适应性免疫细胞稳态中起作用的生长因子。细胞因子由诸如巨噬细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞和肥大细胞、内皮细胞、成纤维细胞和不同基质细胞等免疫细胞产生。在一些情况下，细胞因子调节体液免疫应答与基于细胞的免疫应答之间的平衡。

[0023] 白介素是调节T和B淋巴细胞、单核细胞谱系细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨核细胞和造血细胞的发育和分化的信号传导蛋白质。白介素由辅助CD4 T和B淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞和其他组织成员产生。在一些情况下，约有15种白介素，即白介素1-13、白介素15和白介素17。

[0024] 白介素2(IL-2)是一种多效性1型细胞因子，其结构包含15.5kDa的四个α-螺旋束。IL-2的前体形式的长度为153个氨基酸残基，其中前20个氨基酸形成信号肽，而残基21-153形成成熟形式。IL-2主要在抗原刺激后由CD4+T细胞产生，并且较小程度地由CD8+细胞、自然杀伤(NK)细胞和自然杀伤T(NKT)细胞、活化的树突细胞(DC)和肥大细胞产生。IL-2信号传导通过与IL-2受体(IL-2R)亚基IL-2Rα(也称为CD25)、IL-2Rβ(也称为CD122)和IL-2Rγ

(也称为CD132)的特定组合的相互作用而发生。IL-2与IL-2Rα的相互作用形成K_d约为10^{-8}M的“低亲和力”IL-2受体复合物。IL-2与IL-2Rβ和IL-2Rγ的相互作用形成K_d约为10^{-9}M的“中亲和力”IL-2受体复合物。IL-2与全部三个亚基IL-2Rα、IL-2Rβ和IL-2Rγ的相互作用形成K_d约>10^{-11}M的“高亲和力”IL-2受体复合物。

[0025] 在一些情况下,经由“高亲和力”IL-2Rαβγ复合物的IL-2信号传导调节调节性T细胞的活化和增殖。调节性T细胞或$CD4^+CD25^+Foxp3^+$调节性T(Treg)细胞通过抑制诸如$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、B细胞、NK细胞和NKT细胞等效应细胞而介导免疫稳态的维持。在一些情况下,Treg细胞由胸腺生成(tTreg细胞),或者由外周的幼稚T细胞诱导(pTreg细胞)。在一些情况下,Treg细胞被认为是外周耐受的介质。实际上,在一项研究中,耗竭CD25的外周CD4+T细胞的转移在裸鼠中产生了多种自身免疫疾病,而$CD4^+CD25^+$T细胞的共转移抑制了自身免疫的发展(Sakaguchi等人,“Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2receptor alpha-chains(CD25),”J.Immunol.155(3):1151-1164(1995))。Treg细胞群体的增加下调了效应T细胞的增殖,并抑制了自身免疫和T细胞抗肿瘤应答。

[0026] 通过“中亲和力”IL-2Rβγ复合物的IL-2信号传导调节$CD8^+$效应T(Teff)细胞、NK细胞和NKT细胞的活化和增殖。$CD8^+$Teff细胞(也称为细胞毒性T细胞、Tc细胞、细胞毒性T淋巴细胞、CTL、T杀伤细胞、溶细胞性T细胞、Tcon或杀伤T细胞)是识别并杀死受损细胞、癌细胞和病原体感染的细胞的T淋巴细胞。NK和NKT细胞是类似于$CD8^+$Teff细胞、目标癌细胞和病原体感染的细胞的淋巴细胞类型。

[0027] 在一些情况下,利用IL-2信号传导来调节T细胞应答,随后用于治疗癌症。例如,以高剂量形式施用IL-2以诱导Teff细胞群体的扩充以供治疗癌症。然而,高剂量IL2进一步导致抑制抗肿瘤免疫应答的Treg细胞的伴随刺激。高剂量IL-2还诱导由脉管系统中IL-2Rα链表达细胞(包括2型先天免疫细胞(ILC-2)、嗜酸性粒细胞和内皮细胞)的参与所介导的毒性不良事件。这导致嗜酸性粒细胞增多、毛细血管渗漏和血管渗漏综合征(VLS)。

[0028] 在某些实施方案中,本文公开了一种通过细胞因子/细胞因子受体信号传导选择性上调淋巴细胞的不同群体(例如,CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、NK细胞或NKT细胞)的方法。在一些情况下,该细胞因子包括白介素、干扰素或肿瘤坏死因子。在一些情况下,该细胞因子是细胞因子缀合物,例如白介素缀合物、干扰素缀合物或肿瘤坏死因子缀合物。在另外的情况下,本文描述了包含一种或多种本文所述的细胞因子缀合物的药物组合物和试剂盒。

[0029] 在一些实施方案中,本文还描述了一种通过IL-2/IL-2R信号传导选择性上调CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、NK细胞和/或NKT细胞群体的方法。在一些情况下,IL-2是IL-2缀合物,其与“中亲和力”IL-2Rβγ复合物相互作用,任选地具有与IL-2Rαβγ复合物类似的效力,并且相对于野生型IL-2具有减弱的IL-2Rα相互作用。在一些实施方案中,本文进一步描述了使用本文所述的IL-2缀合物治疗癌症的方法。在另外的实施方案中,本文描述了包含一种或多种本文所述的IL-2缀合物的药物组合物和试剂盒。

细胞因子缀合物

[0030] 在一些实施方案中,本文描述了细胞因子缀合物。在一些情况下,该细胞因子包括白介素、肿瘤坏死因子、干扰素、趋化因子、淋巴因子或生长因子。在一些情况下,该细胞因

子是白介素。在一些情况下，该细胞因子是干扰素。在另外的情况下，该细胞因子是肿瘤坏死因子。在进一步的情况下，该细胞因子是生长因子。

[0031] 在一些实施方案中，本文描述了一种白介素缀合物。示例性的白介素包括但不限于白介素1β(IL-1β)、白介素2(IL-2)、白介素7(IL-7)、白介素10(IL-10)、白介素12(IL-12)、白介素15(IL-15)、白介素18(IL-18)和白介素21(IL-21)。在一些情况下，本文描述了一种白介素缀合物，其中该白介素选自IL-1β、IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18和IL-21。

IL-2缀合物

[0032] 在一些实施方案中，本文描述了在氨基酸位置处被修饰的IL-2缀合物。在一些情况下，该修饰是向天然氨基酸的修饰。在一些情况下，该修饰是向非天然氨基酸的修饰。在一些情况下，本文描述了包含至少一个非天然氨基酸的分离并修饰的IL-2多肽。在一些情况下，该IL-2多肽是分离并纯化的哺乳动物IL-2，例如啮齿动物IL-2蛋白质或人IL-2蛋白质。在一些情况下，该IL-2多肽是人IL-2蛋白质。在一些情况下，该IL-2多肽与SEQ ID NO:1具有约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的序列同一性。在一些情况下，该IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的序列。在一些情况下，该IL-2多肽由SEQ ID NO:1的序列组成。在另外的情况下，该IL-2多肽与SEQ ID NO:2具有约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％的序列同一性。在另外的情况下，该IL-2多肽包含SEQ ID NO:2的序列。在另外的情况下，该IL-2多肽由SEQ ID NO:2的序列组成。

[0033] 在一些情况下，所述IL-2多肽是截短的变体。在一些情况下，该截短是N-末端缺失。在其他情况下，该截短是C-末端缺失。在另外的情况下，该截短包含N-末端和C-末端缺失。例如，该截短可以是从N-末端或C-末端或两个末端缺失至少或大约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20个或更多个残基。在一些情况下，该IL-2多肽包含至少或大约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20个或更多个残基的N-末端缺失。在一些情况下，该IL-2多肽包含至少或大约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个残基的N-末端缺失。在一些情况下，该IL-2多肽包含至少或大约2个残基的N-末端缺失。在一些情况下，该IL-2多肽包含至少或大约3个残基的N-末端缺失。在一些情况下，该IL-2多肽包含至少或大约4个残基的N-末端缺失。在一些情况下，该IL-2多肽包含至少或大约5个残基的N-末端缺失。在一些情况下，该IL-2多肽包含至少或大约6个残基的N-末端缺失。在一些情况下，该IL-2多肽包含至少或大约7个残基的N-末端缺失。在一些情况下，该IL-2多肽包含至少或大约8个残基的N-末端缺失。在一些情况下，该IL-2多肽包含至少或大约9个残基的N-末端缺失。在一些情况下，该IL-2多肽包含至少或大约10个残基的N-末端缺失。

[0034] 在一些实施方案中，所述IL-2多肽是功能活性片段。在一些情况下，该功能活性片段包含IL-2区域10-133、20-133、30-133、10-130、20-130、30-130、10-125、20-125、30-125、1-130或1-125，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些情况下，该功能活性片段包含IL-2区域10-133，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些情况下，该功能活性片段包含IL-2区域20-133，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些情况下，该功能活性片段包含IL-2区域30-133，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些情况下，该功能活性片段包含IL-2区域10-125，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些情况下，该功能活性片段包含IL-2区域20-125，其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位

置。在一些情况下,该功能活性片段包含IL-2区域1-130,其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些情况下,该功能活性片段包含IL-2区域1-125,其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。

[0035] 在一些实施方案中,本文描述了一种IL-2缀合物,其包含分离、纯化并修饰的IL-2多肽和缀合部分。在一些情况下,相对于野生型IL-2多肽,该IL-2缀合物对IL-2受体α(IL-2Rα)亚基的亲和力降低。在一些情况下,该缀合部分结合至与IL-2Rα相互作用的氨基酸残基(例如,在IL-2/IL-2Rα界面处)。在一些情况下,该缀合部分结合至邻近IL-2/IL-2Rα界面(例如,距IL-2/IL-2Rα界面约5Å、约10Å、约15Å或约20Å)的氨基酸残基。如本文所用的,参与IL-2/IL-2Rα界面的残基包括与来自IL-2Rα亚基的残基形成疏水相互作用、氢键或离子相互作用的IL-2残基。

[0036] 在一些情况下,所述缀合部分结合至选自氨基酸位置Y31、K32、N33、P34、K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、P47、K48、Q57、E60、E61、E62、L63、K64、P65、E68、V69、N71、L72、Q74、S75、K76、N77、M104、C105、E106、Y107、A108、D109、E110、T111或A112的氨基酸残基,其中氨基酸残基的编号对应于SEQ ID NO:1。在一些情况下,该氨基酸位置选自Y31、K32、N33、P34、K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、P47、K48、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72、Q74、S75、K76、N77、M104、C105、E106、Y107、A108、D109、E110、T111和A112。在一些情况下,该氨基酸位置选自N33、P34、K35、T37、R38、M39、T41、F42、K43、F44、Y45、Q57、E60、E61、E62、L63、K64、P65、E68、V69、N71、L72、M104、C105、E106、Y107、A108、D109、E110、T111和A112。在一些情况下,该氨基酸位置选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72和Y107。在一些情况下,该氨基酸位置选自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72和Y107。在一些情况下,该氨基酸位置选自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、P65、V69、L72和Y107。在一些情况下,该氨基酸位置选自T37、T41、F42、F44、Y45、P65、V69、L72和Y107。在一些情况下,该氨基酸位置选自R38和K64。在一些情况下,该氨基酸位置选自E61、E62和E68。在一些情况下,该氨基酸位置在K35。在一些情况下,该氨基酸位置在T37。在一些情况下,该氨基酸位置在R38。在一些情况下,该氨基酸位置在T41。在一些情况下,该氨基酸位置在F42。在一些情况下,该氨基酸位置在K43。在一些情况下,该氨基酸位置在F44。在一些情况下,该氨基酸位置在Y45。在一些情况下,该氨基酸位置在E61。在一些情况下,该氨基酸位置在E62。在一些情况下,该氨基酸位置在K64。在一些情况下,该氨基酸位置在E68。在一些情况下,该氨基酸位置在P65。在一些情况下,该氨基酸位置在V69。在一些情况下,该氨基酸位置在L72。在一些情况下,该氨基酸位置在Y107。在一些情况下,该氨基酸位置在L72。在一些情况下,该氨基酸位置在D109。

[0037] 在一些情况下,所述IL-2缀合物进一步包含另外的突变。在一些情况下,该另外的突变在选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72和Y107的氨基酸位置处。在这样的情况下,所述氨基酸与额外的缀合部分缀合,以增加血清半衰期、稳定性或其组合。或者,在与额外的缀合部分结合之前,首先将氨基酸突变为天然氨基酸,如赖氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸;或突变为非天然氨基酸。

[0038] 在一些实施方案中,相对于没有非天然氨基酸修饰的野生型IL-2多肽(例如,野生型IL-2多肽),所述修饰的IL-2多肽对IL-2受体α(IL-2Rα)亚基的亲和力降低约为10%、

20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％或99％，或大于99％。在一些情况下，亲和力的降低约为10％。在一些情况下，亲和力的降低约为20％。在一些情况下，亲和力的降低约为40％。在一些情况下，亲和力的降低约为50％。在一些情况下，亲和力的降低约为60％。在一些情况下，亲和力的降低约为80％。在一些情况下，亲和力的降低约为90％。在一些情况下，亲和力的降低约为99％。在一些情况下，亲和力的降低大于99％。在一些情况下，亲和力的降低约为80％。在一些情况下，亲和力的降低约为100％。

[0039] 在一些实施方案中，相对于没有非天然氨基酸修饰的相当的IL-2多肽(例如，野生型IL-2多肽)，所述修饰的IL-2多肽对IL-2受体α(IL-2Rα)亚基的亲和力降低约为1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、30倍、50倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1,000倍或更多。在一些情况下，亲和力的降低约为1倍。在一些情况下，亲和力的降低约为2倍。在一些情况下，亲和力的降低约为4倍。在一些情况下，亲和力的降低约为5倍。在一些情况下，亲和力的降低约为6倍。在一些情况下，亲和力的降低约为8倍。在一些情况下，亲和力的降低约为10倍。在一些情况下，亲和力的降低约为30倍。在一些情况下，亲和力的降低约为50倍。在一些情况下，亲和力的降低约为100倍。在一些情况下，亲和力的降低约为300倍。在一些情况下，亲和力的降低约为500倍。在一些情况下，亲和力的降低约为1000倍。在一些情况下，亲和力的降低大于1,000倍。

[0040] 在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽不与IL-2Rα相互作用。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽进一步缀合至缀合部分。在一些情况下，所述IL-2缀合物不与IL-2Rα相互作用。

[0041] 在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽表现出对IL-2βγ信号传导复合物的第一受体信号传导效力和对IL-2αβγ信号传导复合物的第二受体信号传导效力，并且其中第一受体信号传导效力与第二受体信号传导效力之差小于10倍。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽表现出对IL-2βγ信号传导复合物的第一受体信号传导效力和对IL-2αβγ信号传导复合物的第二受体信号传导效力，并且其中第一受体信号传导效力与第二受体信号传导效力之差小于5倍。在一些情况下，该差异小于9倍、小于8倍、小于7倍、小于6倍、小于5倍、小于4倍、小于3倍、小于2倍或小于1倍。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽是部分激动剂，例如，激活受体(例如，IL-2βγ信号传导复合物或IL-2αβγ信号传导复合物)但相对于完全激动剂对受体仅有部分功效的激动剂。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽是完全激动剂，例如，以最大响应激活受体(例如，IL-2βγ信号传导复合物或IL-2αβγ信号传导复合物)的激动剂。

[0042] 在一些情况下，所述受体信号传导效力通过EC50值来测量。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽提供激活IL-2βγ信号传导复合物的第一EC50值和激活IL-2αβγ信号传导复合物的第二EC50值，并且其中第一EC50值与第二EC50值之差小于10倍。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽提供激活IL-2βγ信号传导复合物的第一EC50值和激活IL-2αβγ信号传导复合物的第二EC50值，并且其中第一EC50值与第二EC50值之差小于5倍。在一些情况下，该差异小于9倍、小于8倍、小于7倍、小于6倍、小于5倍、小于4倍、小于3倍、小于2倍或小于1倍。

[0043] 在一些情况下，所述受体信号传导效力通过ED50值来测量。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽提供激活IL-2βγ信号传导复合物的第一ED50值和激活IL-2αβγ信号传导复合物的第二ED50值，并且其中第一ED50值与第二ED50值之差小于10倍。在一些情况下，所述

修饰的IL-2多肽提供激活IL-2βγ信号传导复合物的第一ED50值和激活IL-2αβγ信号传导复合物的第二ED50值，并且其中第一ED50值与第二ED50值之差小于5倍。在一些情况下，该差异小于9倍、小于8倍、小于7倍、小于6倍、小于5倍、小于4倍、小于3倍、小于2倍或小于1倍。

[0044] 在一些实施方案中，所述缀合部分直接地或通过连接体肽间接地连接至IL-2多肽的N-末端或C-末端。在一些情况下，该缀合部分(例如，聚合物、蛋白质或肽)直接地或通过连接体肽间接地与IL-2在IL-2的N-末端或C-末端遗传融合。在一些情况下，该缀合部分连接至N-末端或C-末端氨基酸残基。在一些情况下，该缀合部分连接至与N-末端或C-末端氨基酸残基结合的反应性基团。

[0045] 在一些实施方案中，对IL-2Rα的结合亲和力降低的IL-2缀合物能够扩充CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体。在一些情况下，该缀合部分损害或阻断IL-2与IL-2Rα的结合。

[0046] 在一些情况下，相对于野生型IL-2多肽，所述修饰的IL-2多肽通过IL-2Rβγ复合物对CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体的激活保留激活所述细胞群体的显著效力。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽的激活等同于野生型IL-2多肽的激活。在其他情况下，所述修饰的IL-2多肽的激活高于野生型IL-2多肽的激活。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力高于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽的受体信号传导效力比野生型IL-2多肽的相应效力高至少1倍。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽的受体信号传导效力比野生型IL-2多肽的相应效力高大约或至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1,000倍或更多。在这样的情况下，用于实现与野生型IL-2多肽类似的CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体激活水平的修饰IL-2多肽的剂量或浓度低于用于野生型IL-2多肽的剂量或浓度。

[0047] 在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽通过IL-2Rβγ复合物对CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体的激活保留野生型IL-2多肽激活所述细胞群体的显著效力。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力低于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ复合物的受体信号传导效力。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽的受体信号传导效力比野生型IL-2多肽的相应效力低大约或至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍或50倍。

[0048] 在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽表现出对IL-2Rβγ的第一受体信号传导效力和对IL-2Rαβγ的第二受体信号传导效力。在一些情况下，对IL-2Rβγ的第一受体信号传导效力是相对于野生型IL-2多肽改善的效力。在一些情况下，对IL-2Rαβγ的第二受体信号传导效力是相对于野生型IL-2多肽受损的效力。在一些实施方案中，所述修饰的IL-2多肽表现出对IL-2Rβγ的第一受体信号传导效力和对IL-2Rαβγ的第二受体信号传导效力，并且其中第一受体信号传导效力比第二受体信号传导效力高至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍、500倍、1000倍或更高。在一些情况下，第一受体信号传导效力比第二受体信号传导效力至少高1倍或更多。在一些情况下，第一受体信号传导效力比第二受体信号传导效力至少高2倍或更多。在一些情况下，第一受体信号传导

效力比第二受体信号传导效力至少高5倍或更多。在一些情况下，第一受体信号传导效力比第二受体信号传导效力至少高10倍或更多。在一些情况下，第一受体信号传导效力比第二受体信号传导效力至少高20倍或更多。在一些情况下，第一受体信号传导效力比第二受体信号传导效力至少高50倍或更多。在一些情况下，第一受体信号传导效力比第二受体信号传导效力至少高100倍或更多。在一些情况下，第一受体信号传导效力比第二受体信号传导效力至少高500倍或更多。在一些情况下，第一受体信号传导效力比第二受体信号传导效力至少高1000倍或更多。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽的第一受体信号传导效力高于野生型IL-2多肽对IL-2Rβγ的受体信号传导效力，并且所述修饰的IL-2多肽的第二受体信号传导效力低于野生型IL-2多肽对IL-2Rαβγ的受体信号传导效力。在一些情况下，这两种受体信号传导效力均低于其在野生型IL-2多肽中的相应效力。在其他情况下，这两种受体信号传导效力均高于其在野生型IL-2多肽中的相应效力。

[0049] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物减少施用该IL-2缀合物的受试者中的毒性不良事件。示例性的毒性不良事件包括嗜酸性粒细胞增多、毛细血管渗漏和血管渗漏综合征(VLS)。在一些情况下，相对于施用野生型IL-2或阿地白介素的第二受试者，该IL-2缀合物将受试者中毒性不良事件的发生率降低约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或约100％。在一些情况下，相对于施用野生型IL-2或阿地白介素的第二受试者，该IL-2缀合物将受试者中毒性不良事件的严重程度降低约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或约100％。

[0050] 在一些情况下，所述毒性不良事件是嗜酸性粒细胞增多。在一些情况下，相对于施用野生型IL-2或阿地白介素的第二受试者，所述IL-2缀合物将受试者中嗜酸性粒细胞增多的发生率降低约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或约100％。在一些情况下，相对于施用野生型IL-2或阿地白介素的第二受试者，所述IL-2缀合物将受试者中嗜酸性粒细胞增多的严重程度降低约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或约100％。

[0051] 在一些情况下，所述毒性不良事件是毛细血管渗漏。在一些情况下，相对于施用野生型IL-2或阿地白介素的第二受试者，所述IL-2缀合物将受试者中毛细血管渗漏的发生率降低约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或约100％。在一些情况下，相对于施用野生型IL-2或阿地白介素的第二受试者，所述IL-2缀合物将受试者中毛细血管渗漏的严重程度降低约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或约100％。

[0052] 在一些情况下，所述毒性不良事件是VLS。在一些情况下，相对于施用野生型IL-2或阿地白介素的第二受试者，所述IL-2缀合物将受试者中VLS的发生率降低约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或约100％。在一些情况下，相对于施用野生型IL-2或阿地白介素的第二受试者，所述IL-2缀合物将受试者中VLS的严重程度降低约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或约100％。

[0053] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有超过1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、18小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天或更长的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有超过1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时或更长的血浆半衰期。在一些实施方案中，所

述IL-2缀合物具有超过1小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有超过2小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有超过3小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有超过4小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有超过5小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有超过6小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有超过7小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有超过8小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有超过9小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有超过10小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有超过12小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有超过18小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有超过24小时的血浆半衰期。

[0054] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、18小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天或更长的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、18小时、24小时或更长的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少1小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少2小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少3小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少4小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少5小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少6小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少7小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少8小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少9小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少10小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少12小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少18小时的血浆半衰期。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有至少24小时的血浆半衰期。

[0055] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有约1小时至约7天、约12小时至约7天、约18小时至约7天、约24小时至约7天、约1小时至约5天、约12小时至约5天、约24小时至约5天、约2天至约5天或约2天至约3天的血浆半衰期。

[0056] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有约1小时至约18小时、约1小时至约12小时、约2小时至约10小时、约2小时至约8小时、约4小时至约18小时、约4小时至约12小时、约4小时至约10小时、约4小时至约8小时、约6小时至约18小时、约6小时至约12小时、约6小时至约10小时、约6小时至约8小时、约8小时至约18小时、约8小时至约12小时或约8小时至约10小时的血浆半衰期。

[0057] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有能够增殖和/或扩充CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆T细胞、NK细胞、NKT细胞或其组合，但是不会产生诸如凋亡等有害作用的血浆半衰期。

[0058] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有相对于野生型IL-2延长的血浆半衰期，例如延长至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、18小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天或更长。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有相对于野生型IL-2延长的血浆半衰期，例如延长至少1小时、2小时、3小时、

4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、18小时、24小时或更长。

[0059] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有相对于野生型IL-2延长的血浆半衰期，例如约1小时至约18小时、约1小时至约12小时、约2小时至约10小时、约2小时至约8小时、约4小时至约18小时、约4小时至约12小时、约4小时至约10小时、约4小时至约8小时、约6小时至约18小时、约6小时至约12小时、约6小时至约10小时、约6小时至约8小时、约8小时至约18小时、约8小时至约12小时或约8小时至约10小时。

[0060] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有相对于阿地白介素延长的血浆半衰期，例如延长至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、18小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天或更长。在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有相对于阿地白介素延长的血浆半衰期，例如延长至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、18小时、24小时或更长。

[0061] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有相对于阿地白介素延长的血浆半衰期，例如约1小时至约18小时、约1小时至约12小时、约2小时至约10小时、约2小时至约8小时、约4小时至约18小时、约4小时至约12小时、约4小时至约10小时、约4小时至约8小时、约6小时至约18小时、约6小时至约12小时、约6小时至约10小时、约6小时至约8小时、约8小时至约18小时、约8小时至约12小时或约8小时至约10小时。

[0062] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有延长的血浆半衰期以及降低的毒性。在一些情况下，所述IL-2缀合物具有至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、18小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天或更长的延长的血浆半衰期，以及降低的毒性。在一些情况下，所述IL-2缀合物具有至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、18小时、24小时或更长的延长的血浆半衰期，以及降低的毒性。在一些情况下，所述IL-2缀合物具有约1小时至约18小时、约1小时至约12小时、约2小时至约10小时、约2小时至约8小时、约4小时至约18小时、约4小时至约12小时、约4小时至约10小时、约4小时至约8小时、约6小时至约18小时、约6小时至约12小时、约6小时至约10小时、约6小时至约8小时、约8小时至约18小时、约8小时至约12小时或约8小时至约10小时的延长的血浆半衰期，以及降低的毒性。在一些情况下，所述毒性的降低是相对于野生型IL-2降低至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍或更多。在一些情况下，所述毒性的降低是相对于野生型IL-2降低至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％、500％或更多。

[0063] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物具有延长的血浆半衰期以及降低的毒性。在一些情况下，所述IL-2缀合物具有至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、18小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天或更长的延长的血浆半衰期，以及降低的毒性。在一些情况下，所述IL-2缀合物具有至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、18小时、24小时或更长的延长的血浆半衰期，以及降低的毒性。在一些情况下，所述IL-2缀合物具有约1小时至约18小时、约1小时至约12小时、约2小时至约10小时、约2小时至约8小时、约4小时至约18小时、约4小时至约12小时、约4小时至约10小时、约4小时至约8小时、约6小时至约18小时、约6小时至约12小时、约6小时至约10小时、约6小时至约8小时、约8小时至约18小时、约8

小时至约12小时或约8小时至约10小时的延长的血浆半衰期，以及降低的毒性。在一些情况下，所述毒性的降低是相对于阿地白介素降低至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍或更多。在一些情况下，所述毒性的降低是相对于阿地白介素降低至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％、500％或更多。

[0064] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物包含缀合部分，其中该缀合部分的大小(例如，体积或长度)增强血浆稳定性但不降低效力。在一些情况下，该缀合部分的大小使血浆半衰期延长至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、18小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天或更长。在一些情况下，该缀合部分的大小使血浆半衰期延长至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、18小时、24小时或更长。在一些情况下，该缀合部分的大小使血浆半衰期延长约1小时至约18小时、约1小时至约12小时、约2小时至约10小时、约2小时至约8小时、约4小时至约18小时、约4小时至约12小时、约4小时至约10小时、约4小时至约8小时、约6小时至约18小时、约6小时至约12小时、约6小时至约10小时、约6小时至约8小时、约8小时至约18小时、约8小时至约12小时或约8小时至约10小时。在一些情况下，该缀合部分的大小使效力相对于阿地白介素降低少于5％、4％、3％、2％、1％或更少。

[0065] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物包含缀合部分，其中该缀合部分的大小(例如，体积或长度)增强血浆稳定性和效力。在一些情况下，该缀合部分的大小使血浆半衰期延长至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、18小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天或更长。在一些情况下，该缀合部分的大小使血浆半衰期延长至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、18小时、24小时或更长。在一些情况下，该缀合部分的大小使血浆半衰期延长约1小时至约18小时、约1小时至约12小时、约2小时至约10小时、约2小时至约8小时、约4小时至约18小时、约4小时至约12小时、约4小时至约10小时、约4小时至约8小时、约6小时至约18小时、约6小时至约12小时、约6小时至约10小时、约6小时至约8小时、约8小时至约18小时、约8小时至约12小时或约8小时至约10小时。在一些情况下，该缀合部分的大小进一步使效力相对于阿地白介素增强超过5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％或更多。

[0066] 在一些实施方案中，本文描述了一种IL-2缀合物，其包含共价连接至缀合部分的非天然氨基酸，其中该非天然氨基酸位于区域35-107中，并且其中该区域35-107对应于SEQ ID NO:1的残基K35-Y107。

[0067] 在一些实施方案中，本文描述了一种白介素2βγ受体(IL-2Rβγ)结合蛋白，其中所述结合蛋白对白介素2α受体(IL-2Rα)的结合亲和力低于野生型人IL-2(hIL-2)对该受体的结合亲和力，其中所述结合蛋白对白介素2α受体(IL-2Rα)的结合亲和力低于野生型人IL-2(hIL-2)对该受体的结合亲和力。在一些实施方案中，本文描述了一种白介素2βγ受体(IL-2Rβγ)结合蛋白，其中所述结合蛋白对白介素2α受体(IL-2Rα)的结合亲和力低于野生型人IL-2(hIL-2)对该受体的结合亲和力，并且其中所述结合蛋白包含至少一个非天然氨基酸。在一些情况下，所述结合蛋白是修饰的IL-2多肽或其功能活性片段，其中该修饰的IL-2多肽包含至少一个非天然氨基酸。在一些情况下，所述至少一个非天然氨基酸位于区

域35-107中，并且其中该区域35-107对应于SEQ ID NO:1的残基K35-Y107。

[0068] 在一些实施方案中，本文描述了一种IL-2/IL-2Rβγ复合物，其包含含有突变的修饰的IL-2多肽和IL-2Rβγ，其中所述修饰的IL-2多肽对IL-2Rα的结合亲和力降低，并且其中结合亲和力的降低是相比于野生型IL-2多肽与IL-2Rα之间的结合亲和力。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽进一步包含共价连接至突变位点的缀合部分。在一些情况下，该突变位点包含突变为天然氨基酸的氨基酸。在一些情况下，该突变位点包含突变为半胱氨酸残基的氨基酸。在其他情况下，该突变位点包含突变为赖氨酸残基的氨基酸。

[0069] 在一些实施方案中，本文描述了一种IL-2/IL-2Rβγ复合物，其包含含有非天然氨基酸的修饰的IL-2多肽和IL-2Rβγ，其中所述修饰的IL-2多肽对IL-2Rα的结合亲和力降低，并且其中结合亲和力的降低是相比于野生型IL-2多肽与IL-2Rα之间的结合亲和力。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽进一步包含共价连接至该非天然氨基酸的缀合部分。

[0070] 在一些实施方案中，本文描述了一种IL-2/IL-2Rβγ复合物，其包含含有非天然氨基酸的修饰的IL-2多肽和IL-2Rβγ，其中所述修饰的IL-2多肽对IL-2Rα的受体信号传导效力降低，并且其中受体信号传导效力的降低是相比于野生型IL-2多肽与IL-2Rα之间的受体信号传导效力。在一些情况下，所述修饰的IL-2多肽进一步包含共价连接至该非天然氨基酸的缀合部分。

[0071] 在一些实施方案中，本文描述了CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆T细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，其选择性地扩充细胞群体中的CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆T细胞、NK细胞、NKT细胞或其组合，其中所述激活剂包括包含至少一个突变的修饰的白介素2(IL-2)多肽。在一些情况下，该突变是向天然氨基酸的突变。在其他情况下，该突变是向非天然氨基酸的突变。在一些实施方案中，本文描述了CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆T细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞的激活剂，其选择性地扩充细胞群体中的CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆T细胞、NK细胞、NKT细胞或其组合，其中所述激活剂包括包含至少一个非天然氨基酸的修饰的白介素2(IL-2)多肽。在一些情况下，相比于与野生型IL-2多肽接触的CD3+细胞群体中CD4+T调节性(Treg)细胞的扩充，当所述激活剂与所述CD3+细胞群体接触时，所述激活剂使CD4+Treg细胞扩充少于20％、15％、10％、5％、1％或小于0.1％。在一些情况下，所述激活剂不扩充所述细胞群体中的Treg细胞。在一些情况下，所述细胞群体是体内细胞群体。在一些情况下，所述细胞群体是体外细胞群体。在一些情况下，所述细胞群体是离体细胞群体。

[0072] 在一些情况下，本文还描述了一种扩充CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆T细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体的方法，其包括使所述细胞群体与治疗有效量的CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆T细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞激活剂接触，其中所述激活剂包含含有至少一个突变的修饰的白介素2(IL-2)多肽，从而扩充所述CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆T细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体。在一些情况下，该突变是向天然氨基酸的突变。在其他情况下，该突变是向非天然氨基酸的突变。在一些情况下，本文还描述了一种扩充CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆T细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体的方法，其包括使所述细胞群体与治疗有效量的CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆T细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞激活剂接触，其中所述激活剂包含含有至少一个非天然氨基酸的修饰的白介

素2(IL-2)多肽,从而扩充所述CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆T细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体。

IL-15缀合物

[0073] 在一些实施方案中,本文描述了在氨基酸位置处被修饰的IL-15缀合物。IL-15调节T细胞和NK细胞的活化和增殖。在一些情况下,该IL-15缀合物包含分离并纯化的IL-15多肽和缀合部分。在一些情况下,相对于野生型IL-15多肽,该IL-15缀合物对IL-15受体的亲和力降低。在一些情况下,该缀合部分结合至与IL-15受体(例如,在IL-15/IL-15Rα界面处)或与IL-2Rβγ亚基相互作用的氨基酸残基。在一些情况下,该缀合部分结合至邻近IL-15/IL-15Rα界面(例如,距IL-15/IL-15Rα界面约5Å、约10Å、约15Å或约20Å)或邻近IL-2Rβγ亚基的氨基酸残基。如本文所用的,参与IL-15/IL-15R界面的残基包括与来自IL-15R的残基形成疏水相互作用、氢键或离子相互作用的IL-15残基。类似地,参与IL-15/IL-2Rβγ界面的残基包括与来自IL-2Rβγ亚基的残基形成疏水相互作用、氢键或离子相互作用的IL-15残基。在一些情况下,该缀合部分直接地或通过连接体肽间接地连接至IL-15多肽的N-末端或C-末端(例如,连接至N-末端或C-末端氨基酸残基或连接至与末端氨基酸残基结合的反应性基团)。在另外的情况下,该缀合部分调节IL-15与IL-15R之间的相互作用。在一些情况下,所述IL-15缀合物通过IL-15/IL-15R信号转导上调肿瘤浸润淋巴细胞的不同群体。在一些情况下,所述IL-15缀合物促进肿瘤相关淋巴细胞的增殖和/或扩充的减少。在一些情况下,所述IL-15缀合物调节免疫活性。

额外的细胞因子缀合物

[0074] 在一些实施方案中,本文描述的包括在氨基酸位置处被修饰的一种或多种额外的细胞因子缀合物。示例性的细胞因子包括但不限于IL-1β、IL-7、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21、INF(例如,IFN-α、IFN-β、IFN-κ、IFN-δ、IFN-ε、IFN-τ、IFN-ω或IFN-ζ)和TNF(例如,TNFα或CD40L)。在一些情况下,该细胞因子缀合物包含分离并纯化的细胞因子多肽和缀合部分。在一些情况下,相对于野生型细胞因子,该细胞因子缀合物对其相应受体的亲和力降低。在一些情况下,该缀合部分结合至邻近受体界面(例如,距受体界面约5Å、约10Å、约15Å或约20Å)的氨基酸残基。在一些情况下,该缀合部分直接地或通过连接体肽间接地连接至细胞因子的N-末端或C-末端。在另外的情况下,该缀合部分调节细胞因子与其相应受体之间的相互作用。在一些情况下,该细胞因子缀合物上调肿瘤浸润淋巴细胞的不同群体。在一些情况下,该细胞因子缀合物促进肿瘤相关淋巴细胞的增殖和/或扩充的减少。在一些情况下,该细胞因子缀合物调节免疫活性。

细胞因子缀合物前体

[0075] 本文描述了包含突变细胞因子(如IL-2)的细胞因子缀合物前体,其中一个或多个氨基酸已从野生型氨基酸突变。这类前体通常与本文所述的方法一起用于疾病或病况的治疗。在一些实施方案中,细胞因子前体不缀合。这类突变不同地包括添加、缺失或置换。在一些实施方案中,该突变包括向不同天然氨基酸的置换。在一些情况下,该突变细胞因子在氨基酸位置Y31、K32、N33、P34、K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、P47、K48、Q57、E60、E61、E62、L63、K64、P65、E68、V69、N71、L72、Q74、S75、K76、N77、M104、C105、E106、Y107、A108、D109、E110、T111或A112处包含突变,其中氨基酸残基的编号对应于SEQ ID NO:1。在一些情

况下，该氨基酸位置选自Y31、K32、N33、P34、K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、P47、K48、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72、Q74、S75、K76、N77、M104、C105、E106、Y107、A108、D109、E110、T111和A112。在一些情况下，该氨基酸位置选自N33、P34、K35、T37、R38、M39、T41、F42、K43、F44、Y45、Q57、E60、E61、E62、L63、K64、P65、E68、V69、N71、L72、M104、C105、E106、Y107、A108、D109、E110、T111和A112。在一些情况下，该氨基酸位置选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72和Y107。在一些情况下，该氨基酸位置选自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72和Y107。在一些情况下，该氨基酸位置选自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、P65、V69、L72和Y107。在一些情况下，该氨基酸位置选自T37、T41、F42、F44、Y45、P65、V69、L72和Y107。在一些情况下，该氨基酸位置选自R38和K64。在一些情况下，该氨基酸位置选自E61、E62和E68。在一些情况下，该氨基酸位置在K35。在一些情况下，该氨基酸位置在T37。在一些情况下，该氨基酸位置在R38。在一些情况下，该氨基酸位置在T41。在一些情况下，该氨基酸位置在F42。在一些情况下，该氨基酸位置在K43。在一些情况下，该氨基酸位置在F44。在一些情况下，该氨基酸位置在Y45。在一些情况下，该氨基酸位置在E61。在一些情况下，该氨基酸位置在E62。在一些情况下，该氨基酸位置在K64。在一些情况下，该氨基酸位置在E68。在一些情况下，该氨基酸位置在P65。在一些情况下，该氨基酸位置在V69。在一些情况下，该氨基酸位置在L72。在一些情况下，该氨基酸位置在Y107。在一些情况下，该氨基酸位置在L72。在一些情况下，该氨基酸位置在D109。在一些实施方案中，细胞因子突变体包含缀合部分，其中该缀合部分连接至突变细胞因子中的突变位点。

[0076] 本文所述的细胞因子突变体通常包含一个或多个向天然氨基酸的突变。在一些实施方案中，细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和至少一个突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62K突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62C突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62A突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62I突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62L突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62Y突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62W突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62N突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62R突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62D突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62Q突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62G突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62H突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62M突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62F突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62P突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62S突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62T突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和E62V突变。

[0077] 在一些实施方案中，细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和至少一个突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65K突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65C突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID

NO:1和P65A突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65I突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65L突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65Y突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65W突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65N突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65R突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65D突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65Q突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65G突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65H突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65M突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65F突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65E突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65S突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65T突变。在一些实施方案中，该细胞因子突变体包含SEQ ID NO:1和P65V突变。

蛋白质或肽融合体

[0078] 在一些实施方案中，本文所述的细胞因子缀合物包含与肽或蛋白质融合的细胞因子(例如，IL-2或其他细胞因子)(融合体)。在一些实施方案中，所述肽或蛋白质是抗体或抗体片段。在一些实施方案中，本文所述的细胞因子缀合物包含与抗体或其结合片段融合的细胞因子(例如，IL-2或其他细胞因子)。在一些实施方案中，本文所述的细胞因子与多个蛋白质或肽融合。在一些实施方案中，细胞因子缀合物包含与蛋白质或肽融合的细胞因子融合体，以及至少一个缀合部分。在一些情况下，抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab_2、$F(ab)'_3$片段、单链可变片段(scFv)、双-scFv、$(scFv)_2$、双抗体、微抗体(minibody)、纳米抗体、三抗体、四抗体、人抗体(humabody)、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科动物抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段、或其化学修饰的衍生物。在一些情况下，这类融合蛋白是直接通过翻译生成的。在一些实施方案中，使用化学或其他酶促连接方法生成融合体。在一些实施方案中，细胞因子缀合物包含通过连接体连接的融合的肽或蛋白质。在一些实施方案中，该连接体是肽。在一些实施方案中，细胞因子缀合物包含N-末端肽或蛋白质融合体。在一些实施方案中，细胞因子缀合物包含C-末端肽或蛋白质融合体。在一些情况下，与肽或蛋白质融合的细胞因子进一步与一个或多个以下所述的缀合部分缀合。

[0079] 在一些情况下，所述细胞因子缀合物包含与scFv、双-scFv、$(scFv)_2$、dsFv或sdAb融合的融合体。在一些情况下，该融合体包含scFv。在一些情况下，该细胞因子缀合物包含与双-scFv的融合体。在一些情况下，该细胞因子缀合物包含与$(scFv)_2$的融合体。在一些情况下，该细胞因子缀合物包含与dsFv的融合体。在一些情况下，该细胞因子缀合物包含与sdAb的融合体。在一些情况下，与scFv、双-scFv、$(scFv)_2$、dsFv或sdAb融合的细胞因子进一步与一个或多个以下所述的缀合部分缀合。

[0080] 在一些情况下，所述细胞因子缀合物包含与抗体的Fc部分，例如与IgG、IgA、IgM、IgE或IgD的Fc部分的融合体。在一些情况下，所述细胞因子缀合物包含与IgG(例如，IgG_1、IgG_3或IgG_4)的Fc部分的融合体。在一些情况下，与Fc部分融合的细胞因子进一步与一个或

多个以下所述的缀合部分缀合。

[0081] 在一些情况下，细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽与抗体或其结合片段融合。在一些情况下，该细胞因子多肽与人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab_2、$F(ab)'_3$片段、单链可变片段(scFv)、双-scFv、$(scFv)_2$、双抗体、微抗体(minibody)、纳米抗体、三抗体、四抗体、人抗体(humabody)、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科动物抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段、或其化学修饰的衍生物融合。在另外的情况下，该细胞因子多肽与抗体的Fc部分融合。在另外的情况下，该细胞因子多肽与IgG(例如，IgG_1、IgG_3或IgG_4)的Fc部分融合。在一些情况下，与抗体或其结合片段融合的细胞因子进一步与一个或多个以下所述的缀合部分缀合。

[0082] 在一些情况下，IL-2多肽与抗体或其结合片段融合。在一些情况下，该IL-2多肽与人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab_2、$F(ab)'_3$片段、单链可变片段(scFv)、双-scFv、$(scFv)_2$、双抗体、微抗体(minibody)、纳米抗体、三抗体、四抗体、人抗体(humabody)、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科动物抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段、或其化学修饰的衍生物融合。在另外的情况下，该IL-2多肽与抗体的Fc部分融合。在另外的情况下，该IL-2多肽与IgG(例如，IgG_1、IgG_3或IgG_4)的Fc部分融合。在一些情况下，与抗体或其结合片段融合的IL-2多肽进一步与一个或多个以下所述的缀合部分缀合。

天然和非天然氨基酸

[0083] 在一些实施方案中，在与缀合部分结合(或反应)之前，将本文所述的氨基酸残基(例如，在细胞因子如IL-2内)突变为赖氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸。例如，赖氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的侧链可与本文所述的缀合部分结合。在一些情况下，该氨基酸残基被突变为半胱氨酸、赖氨酸或组氨酸。在一些情况下，该氨基酸残基被突变为半胱氨酸。在一些情况下，该氨基酸残基被突变为赖氨酸。在一些情况下，该氨基酸残基被突变为组氨酸。在一些情况下，该氨基酸残基被突变为酪氨酸。在一些情况下，该氨基酸残基被突变为色氨酸。在一些实施方案中，非天然氨基酸不与缀合部分缀合。在一些实施方案中，本文所述的细胞因子包含非天然氨基酸，其中该细胞因子与蛋白质缀合，其中连接点不是所述非天然氨基酸。

[0084] 在一些实施方案中，在与缀合部分结合之前，将本文所述的氨基酸残基(例如，在细胞因子如IL-2内)突变为非天然氨基酸。在一些情况下，向非天然氨基酸的突变防止或最小化免疫系统的自身抗原应答。如本文所用的，术语“非天然氨基酸”是指除蛋白质中天然存在的20种氨基酸以外的氨基酸。非天然氨基酸的非限制性实例包括：对乙酰基-L-苯丙氨酸、对碘-L-苯丙氨酸、对甲氧基苯丙氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、对炔丙基氧基苯丙氨酸、对炔丙基-苯丙氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAcp-丝氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对叠氮基-L-苯丙氨酸、对酰基-L-苯丙氨酸、对苯甲酰基-L-苯丙氨酸、对硼酸基苯丙氨酸、O-炔丙基酪氨酸、L-磷酸丝氨酸、膦酰丝氨酸、膦酰酪氨酸、对溴苯丙氨酸、硒代半胱氨酸、对氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、叠氮基-赖氨酸(AzK)、酪氨酸氨基酸的非天然类似

物;谷氨酰胺氨基酸的非天然类似物;苯丙氨酸氨基酸的非天然类似物;丝氨酸氨基酸的非天然类似物;苏氨酸氨基酸的非天然类似物;烷基、芳基、酰基、叠氮基、氰基、卤代、肼、酰肼、羟基、烯基、炔基、醚、硫醇、磺酰基、硒代、酯、硫代酸、硼酸盐、硼酸酯、磷酸基、膦酰基、膦、杂环、烯酮、亚胺、醛、羟胺、酮或氨基取代的氨基酸,或其组合;具有可光活化的交联体的氨基酸;旋转标记的氨基酸;荧光氨基酸;金属结合氨基酸;含金属的氨基酸;放射性氨基酸;光笼化和/或可光异构化的氨基酸;含生物素或生物素类似物的氨基酸;含酮的氨基酸;包含聚乙二醇或聚醚的氨基酸;重原子取代的氨基酸;可化学裂解或可光裂解的氨基酸;具有延长的侧链的氨基酸;含有毒性基团的氨基酸;糖取代的氨基酸;碳连接的含糖氨基酸;氧化还原活性氨基酸;含α-羟基的酸;氨基硫代酸;α,α二取代的氨基酸;β-氨基酸;除脯氨酸或组氨酸以外的环状氨基酸,以及除苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸以外的芳族氨基酸。

[0085] 在一些实施方案中,所述非天然氨基酸包含选择性反应性基团,或用于目标多肽的位点选择性标记的反应性基团。在一些情况下,所述化学法是双正交反应(例如,生物相容性和选择性反应)。在一些情况下,该化学法是Cu(I)催化的或“无铜的”炔烃-叠氮化物三唑形成反应、Staudinger连接、反电子需求Diels-Alder(IEDDA)反应、“光点击”化学法或金属介导的过程,如烯烃复分解和Suzuki-Miyaura或Sonogashira交叉偶合。

[0086] 在一些实施方案中,所述非天然氨基酸包含光反应性基团,该基团在用例如UV照射时交联。

[0087] 在一些实施方案中,所述非天然氨基酸包括光笼化的氨基酸。

[0088] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是对位取代的、间位取代的或邻位取代的氨基酸衍生物。

[0089] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包括对乙酰基-L-苯丙氨酸、对叠氮基甲基-L-苯丙氨酸(pAMF)、对碘-L-苯丙氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、对甲氧基苯丙氨酸、对炔丙基氧基苯丙氨酸、对炔丙基-苯丙氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAcp-丝氨酸、L-多巴、氟代苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对叠氮基-L-苯丙氨酸、对酰基-L-苯丙氨酸、对苯甲酰基-L-苯丙氨酸、L-磷酸丝氨酸、膦酰丝氨酸、膦酰酪氨酸、对-溴苯丙氨酸、对氨基-L-苯丙氨酸或异丙基-L-苯丙氨酸。

[0090] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是3-氨基酪氨酸、3-硝基酪氨酸、3,4-二羟基-苯丙氨酸或3-碘酪氨酸。

[0091] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是苯基硒代半胱氨酸。

[0092] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是含有苯甲酮、酮、碘化物、甲氧基、乙酰基、苯甲酰基或叠氮化物的苯丙氨酸衍生物。

[0093] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是含有苯甲酮、酮、碘化物、甲氧基、乙酰基、苯甲酰基或叠氮化物的赖氨酸衍生物。

[0094] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包含芳族侧链。

[0095] 在一些情况下,所述非天然氨基酸不包含芳族侧链。

[0096] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包含叠氮基。

[0097] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包含Michael受体基团。在一些情况下,Michael受体基团包含能够通过1,2-加成反应形成共价键的不饱和部分。在一些情况下,Michael受

体基团包括缺电子的烯烃或炔烃。在一些情况下,Michael受体基团包括但不限于α,β不饱和的:酮、醛、亚砜、砜、腈、亚胺或芳族化合物。

[0098] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是脱氢丙氨酸。

[0099] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包含醛或酮基团。

[0100] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是包含醛或酮基团的赖氨酸衍生物。

[0101] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是在β、γ或δ位置包含一个或多个O、N、Se或S原子的赖氨酸衍生物。在一些情况下,所述非天然氨基酸是在γ位置包含O、N、Se或S原子的赖氨酸衍生物。

[0102] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是赖氨酸衍生物,其中εN原子被氧原子替代。

[0103] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是赖氨酸衍生物,其不是天然存在的翻译后修饰的赖氨酸。

[0104] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是包含侧链的氨基酸,其中从α位置起的第六个原子包含羰基。在一些情况下,所述非天然氨基酸是包含侧链的氨基酸,其中从α位置起的第六个原子包含羰基,并且从α位置起的第五个原子是氮。在一些情况下,所述非天然氨基酸是包含侧链的氨基酸,其中从α位置起的第七个原子是氧原子。

[0105] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是包含硒的丝氨酸衍生物。在一些情况下,所述非天然氨基酸是硒代丝氨酸(2-氨基-3-羟基硒代丙酸)。在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-3-((2-((3-(苄氧基)-3-氧代丙基)氨基)乙基)硒基)丙酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-3-(苯基硒基)丙酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸包含硒,其中该硒的氧化导致形成包含烯烃的非天然氨基酸。

[0106] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包含环辛炔基。

[0107] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包含反式环辛烯基。

[0108] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包含降冰片烯基。

[0109] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包含环丙烯基。

[0110] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包含双吖丙啶基团。

[0111] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包含四嗪基团。

[0112] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是赖氨酸衍生物,其中侧链氮被氨基甲酰化。在一些情况下,所述非天然氨基酸是赖氨酸衍生物,其中侧链氮被酰化。在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-6-{[(叔丁氧基)羰基]氨基}己酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-6-{[(叔丁氧基)羰基]氨基}己酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-Boc-N6-甲基赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-乙酰基赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是吡咯赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-三氟乙酰基赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-6-{[(苄氧基)羰基]氨基}己酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-6-{[(对碘苄氧基)羰基]氨基}己酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-6-{[(对硝基苄氧基)羰基]氨基}己酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-脯氨酰赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-6-{[(环戊基氧基)羰基]氨基}己酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-(环戊烷羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-(四氢呋喃-2-羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-(3-乙炔基四氢呋喃-2-羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸

是N6-((丙-2-炔-1-基氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-6-{[((2-叠氮基环戊基氧基)羰基]氨基]己酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-((2-叠氮基乙氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-6-{[(2-硝基苄氧基)羰基]氨基}己酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-6-{[(2-环辛炔基氧基)羰基]氨基}己酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-(2-氨基丁-3-炔酰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-6-((2-氨基丁-3-炔酰基)氧基)己酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-(烯丙基氧基羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-(丁烯基-4-氧基羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-(戊烯基-5-氧基羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-((丁-3-炔-1-基氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-((戊-4-炔-1-基氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-(噻唑烷-4-羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-8-氧代壬酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-8-氧代辛酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-(2-氧代乙酰基)赖氨酸。

[0113] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-丙酰基赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-丁酰基赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-(丁-2-烯酰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-((双环[2.2.1]庚-5-烯-2-基氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-((螺[2.3]己-1-烯-5-基甲氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-(((4-(1-(三氟甲基)环丙-2-烯-1-基)苄基)氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-((双环[2.2.1]庚-5-烯-2-基甲氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是半胱氨酰赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-((1-(6-硝基苯并[d][1,3]二氧戊环-5-基)乙氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-((2-(3-甲基-3H-双吖丙啶-3-基)乙氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-((3-(3-甲基-3H-双吖丙啶-3-基)丙氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-((间硝基苄氧基)N6-甲基羰基)赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-((双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲氧基)羰基)-赖氨酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-((环庚-3-烯-1-基氧基)羰基)-L-赖氨酸。

[0114] 在一些情况下,所述非天然氨基酸是2-氨基-3-(((((苄氧基)羰基)氨基)甲基)硒基)丙酸。

[0115] 在一些实施方案中,所述非天然氨基酸通过改变目的的琥珀、卵白石或赭石终止密码子掺入细胞因子(例如,IL多肽)中。

[0116] 在一些实施方案中,所述非天然氨基酸通过4-碱基密码子掺入细胞因子(例如,IL多肽)中。

[0117] 在一些实施方案中,所述非天然氨基酸通过改变目的的稀有有义密码子掺入细胞因子(例如,IL多肽)中。

[0118] 在一些实施方案中,所述非天然氨基酸通过包含非天然核酸的合成密码子掺入细胞因子(例如,IL多肽)中。

在一些情况下,所述非天然氨基酸通过正交的、修饰的合成酶/tRNA对掺入细胞因子中。这类正交对包含这样的非天然合成酶:其能够使非天然tRNA加载非天然氨基酸,同时使a)其他内源氨基酸向非天然tRNA上的加载和b)非天然氨基酸向其他内源tRNA上的加载最

小化。这类正交对包含这样的tRNA:其能够被非天然合成酶加载,同时避免被内源合成酶加载a)其他内源氨基酸。在一些实施方案中,从各种生物体,如细菌、酵母、古菌或人类来源中鉴定出这样的对。在一些实施方案中,正交合成酶/tRNA对包含来自单一生物体的组分。在一些实施方案中,正交合成酶/tRNA对包含来自两种不同生物体的组分。在一些实施方案中,正交合成酶/tRNA对包含在修饰之前促进两个不同氨基酸的翻译的组分。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的丙氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的精氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的天冬酰胺合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的天冬氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的半胱氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的谷氨酰胺合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的谷氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的丙氨酸甘氨酸。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的组氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的亮氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的异亮氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的赖氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的甲硫氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的苯丙氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的脯氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的丝氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的苏氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的色氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的酪氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的缬氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是修饰的磷酸丝氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的丙氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的精氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的天冬酰胺tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的天冬氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的半胱氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的谷氨酰胺tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的谷氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的丙氨酸甘氨酸。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的组氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的亮氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的异亮氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的赖氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的甲硫氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的苯丙氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的脯氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的丝氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的苏氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的色氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的酪氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的缬氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是修饰的磷酸丝氨酸tRNA。

[0119] 在一些实施方案中,所述非天然氨基酸通过氨基酰基(aaRS或RS)-tRNA合成酶-tRNA对掺入细胞因子(例如,IL多肽)中。示例性的aaRS-tRNA对包括但不限于詹氏甲烷球菌(Methanococcus jannaschii)(Mj-Tyr)aaRS/tRNA对、大肠杆菌TyrRS(Ec-Tyr)/嗜热脂肪芽孢杆菌(B.stearothermophilus)$tRNA_{CUA}$对、大肠杆菌LeuRS(Ec-Leu)/嗜热脂肪芽孢杆菌$tRNA_{CUA}$对和吡咯赖氨酰-tRNA对。在一些情况下,所述非天然氨基酸通过Mj-TyrRS/tRNA对掺入细胞因子(例如,IL多肽)中。可以被Mj-TyrRS/tRNA对掺入的示例性UAA包括但不限于对位取代的苯丙氨酸衍生物,如对氨基苯丙氨酸和对甲氧基苯丙氨酸;间位取代的酪氨酸衍生物,如3-氨基酪氨酸、3-硝基酪氨酸、3,4-二羟基苯丙氨酸和3-碘酪氨酸;苯基硒代半

胱氨酸;对硼酸基苯丙氨酸;和邻硝基苄基酪氨酸。

[0120] 在一些情况下,所述非天然氨基酸通过Ec-Tyr/$tRNA_{CUA}$或Ec-Leu/$tRNA_{CUA}$对掺入细胞因子(例如,IL多肽)中。可以通过Ec-Tyr/$tRNA_{CUA}$或Ec-Leu/$tRNA_{CUA}$对掺入的示例性UAA包括但不限于含有苯甲酮、酮、碘化物或叠氮化物取代基的苯丙氨酸衍生物;O-炔丙基酪氨酸;α-氨基辛酸、O-甲基酪氨酸、O-硝基苄基半胱氨酸;和3-(萘-2-基氨基)-2-氨基-丙酸。

[0121] 在一些情况下,所述非天然氨基酸通过吡咯赖氨酰-tRNA对掺入细胞因子(例如,IL多肽)中。在一些情况下,PylRS获自古菌,例如获自产甲烷的古菌。在一些情况下,PylRS获自巴氏甲烷八叠球菌(Methanosarcina barkeri)、马氏甲烷八叠球菌(Methanosarcina mazei)或乙酸甲烷八叠球菌(Methanosarcina acetivorans)。可以通过吡咯赖氨酰-tRNA对掺入的示例性UAA包括但不限于酰胺和氨基甲酸酯取代的赖氨酸,如2-氨基-6-((R)-四氢呋喃-2-甲酰胺基)己酸、N-ε-$_D$-脯氨酰基-$_L$-赖氨酸和N-ε-环戊氧羰基-$_L$-赖氨酸;N-ε-丙烯酰基-$_L$-赖氨酸;N-ε-[(1-(6-硝基苯并[d][1,3]二氧戊环-5-基)乙氧基)羰基]-$_L$-赖氨酸;和N-ε-(1-甲基环丙-2-烯甲酰胺基)赖氨酸。

[0122] 在一些情况下,通过US 9,988,619和US 9,938,516中公开的合成酶将非天然氨基酸掺入本文所述的细胞因子(例如,IL多肽)中。可被此类合成酶掺入的示例性UAA包括对甲基叠氮基-L-苯丙氨酸,芳烷基、杂环基、杂芳烷基非天然氨基酸,等等。在一些实施方案中,此类UAA包含吡啶基、吡嗪基、吡唑基、三唑基、噁唑基、噻唑基、噻吩基或其他杂环。在一些实施方案中,此类氨基酸包含叠氮化物、四嗪或其他能够与偶联配偶体如水溶性部分缀合的化学基团。在一些实施方案中,此类合成酶被表达并用来在体内将UAA掺入细胞因子中。在一些实施方案中,使用无细胞翻译系统,利用此类合成酶将UAA掺入细胞因子中。

[0123] 在一些情况下,通过天然存在的合成酶将非天然氨基酸掺入本文所述的细胞因子(例如,IL多肽)中。在一些实施方案中,通过对一种或多种氨基酸为营养缺陷型的生物体将非天然氨基酸掺入细胞因子中。在一些实施方案中,对应于营养缺陷型氨基酸的合成酶能够使相应的tRNA加载非天然氨基酸。在一些实施方案中,所述非天然氨基酸是硒代半胱氨酸或其衍生物。在一些实施方案中,所述非天然氨基酸是硒代甲硫氨酸或其衍生物。在一些实施方案中,所述非天然氨基酸是芳族氨基酸,其中该芳族氨基酸包含芳基卤化物,如碘化物。在实施方案中,所述非天然氨基酸在结构上类似于营养缺陷型氨基酸。

[0124] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包括图1所示的非天然氨基酸。

[0125] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包括赖氨酸或苯丙氨酸衍生物或类似物。在一些情况下,所述非天然氨基酸包括赖氨酸衍生物或赖氨酸类似物。在一些情况下,所述非天然氨基酸包括吡咯赖氨酸(Pyl)。在一些情况下,所述非天然氨基酸包括苯丙氨酸衍生物或苯丙氨酸类似物。在一些情况下,所述非天然氨基酸是Wan等人,"Pyrrolysyl-tRNA synthetase:an ordinary enzyme but an outstanding genetic code expansion tool,"Biocheim Biophys Aceta 1844(6):1059-4070(2014)描述的非天然氨基酸。在一些情况下,所述非天然氨基酸包括图2(例如,图2A和图2B)所示的非天然氨基酸。

[0126] 在一些实施方案中,所述非天然氨基酸包括图3A-图3D(采自Dumas等人,Chemical Science 2015,6,50-69的表1)所示的非天然氨基酸。

[0127] 在一些实施方案中,掺入本文所述的细胞因子(例如,IL多肽)中的非天然氨基酸公开于US 9,840,493;US 9,682,934;US 2017/0260137;US 9,938,516;或US 2018/

0086734。可被此类合成酶掺入的示例性UAA包括对甲基叠氮基-L-苯丙氨酸，芳烷基、杂环基和杂芳烷基，以及赖氨酸衍生物非天然氨基酸。在一些实施方案中，此类UAA包含吡啶基、吡嗪基、吡唑基、三唑基、噁唑基、噻唑基、噻吩基或其他杂环。在一些实施方案中，此类氨基酸包含叠氮化物、四嗪或其他能够与偶联配偶体如水溶性部分缀合的化学基团。在一些实施方案中，UAA包含经由烷基连接体连接至芳族部分的叠氮化物。在一些实施方案中，烷基连接体是C_1-C_{10}连接体。在一些实施方案中，UAA包含经由烷基连接体连接至芳族部分的四嗪。在一些实施方案中，UAA包含经由氨基连接至芳族部分的四嗪。在一些实施方案中，UAA包含经由烷基氨基连接至芳族部分的四嗪。在一些实施方案中，UAA包含经由烷基链连接至氨基酸侧链的末端氮(例如，赖氨酸衍生物的N6，或包含较短烷基侧链的衍生物的N5、N4或N3)的叠氮化物。在一些实施方案中，UAA包含经由烷基链连接至氨基酸侧链的末端氮的四嗪。在一些实施方案中，UAA包含经由烷基连接体连接至酰胺的叠氮化物或四嗪。在一些实施方案中，该UAA是3-氨基丙氨酸、丝氨酸、赖氨酸或其衍生物的含叠氮化物或四嗪的氨基甲酸酯或酰胺。在一些实施方案中，在体内将此类UAA掺入细胞因子中。在一些实施方案中，在无细胞系统中将此类UAA掺入细胞因子中。

缀合部分

[0128] 在某些实施方案中，本文公开了与上文描述的一种或多种细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)结合的缀合部分。在一些情况下，该缀合部分是干扰细胞因子与其受体相互作用的分子。在一些情况下，该缀合部分是当与细胞因子键合时能够使细胞因子缀合物调节免疫应答的任何分子。在一些情况下，该缀合部分通过共价键与细胞因子结合。在一些情况下，本文所述的细胞因子连接至具有三唑基团的缀合部分。在一些情况下，本文所述的细胞因子连接至具有二氢哒嗪或哒嗪基团的缀合部分。在一些情况下，该缀合部分包含水溶性聚合物。在其他情况下，该缀合部分包含蛋白质或其结合片段。在另外的情况下，该缀合部分包含肽。在另外的情况下，该缀合部分包含核酸。在另外的情况下，该缀合部分包含小分子。在另外的情况下，该缀合部分包含生物缀合物(例如，TLR激动剂，如TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8或TLR9激动剂；或合成配体，如Pam3Cys、CFA、MALP2、Pam2Cys、FSL-1、Hib-OMPC、聚I:C、聚A:U、AGP、MPLA、RC-529、MDF2β、CFA或鞭毛蛋白)。在一些情况下，该缀合部分延长血清半衰期，并且/或者改善稳定性。在一些情况下，该缀合部分降低细胞因子与一个或多个细胞因子受体结构域或亚基的相互作用。在另外的情况下，该缀合部分阻断细胞因子与具有其同源受体的一个或多个细胞因子结构域或亚基的相互作用。在一些实施方案中，本文所述的细胞因子缀合物包含多个缀合部分。在一些实施方案中，缀合部分连接至细胞因子肽中的非天然或天然氨基酸。在一些实施方案中，细胞因子缀合物包含连接至天然氨基酸的缀合部分。在一些实施方案中，细胞因子缀合物连接至细胞因子肽中的非天然氨基酸。在一些实施方案中，缀合部分连接至细胞因子肽的N或C末端氨基酸。本文公开了各种组合位点，例如，第一缀合部分连接至细胞因子肽中的非天然或天然氨基酸，而第二缀合部分连接至细胞因子肽的N或C末端氨基酸。在一些实施方案中，单个缀合部分连接至细胞因子肽的多个残基(例如钉(staple))。在一些实施方案中，缀合部分与细胞因子肽的N和C末端氨基酸均连接。

水溶性聚合物

[0129] 在一些实施方案中，本文描述的缀合部分是水溶性聚合物。在一些情况下，该水溶

性聚合物是非肽的、无毒的且生物相容的。如本文所用的，如果根据临床医生，例如医师、毒理学家或临床开发专家的评价，针对活组织(例如，施用于患者)与单独使用某物质或与另一种物质(例如活性剂，如细胞因子部分)组合使用该物质相关的有益效果超过了任何有害作用，则该物质被认为是生物相容的。在一些情况下，水溶性聚合物进一步是非免疫原性的。在一些情况下，如果某物质在体内的预期使用不产生不希望的免疫应答(例如，抗体的形成)，或者如果产生免疫应答，但根据临床医生，例如医师、毒理学家或临床开发专家的评价，认为这样的应答不具有临床意义或重要性，则该物质被认为是非免疫原性的。

[0130] 在一些情况下，所述水溶性聚合物的特征在于具有约2个至约300个末端。示例性的水溶性聚合物包括但不限于聚(亚烷基二醇)，如聚乙二醇(“PEG”)、聚(丙二醇)(“PPG”)、乙二醇与丙二醇的共聚物等，聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟基烷基甲基丙烯酰胺)、聚(羟基烷基甲基丙烯酸酯)、多糖、聚(α-羟基酸)、聚(乙烯醇)(PVA)、聚丙烯酰胺(PAAm)、聚(N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺)(PHPMA)、聚二甲基丙烯酰胺(PDAAm)、聚磷腈、聚噁唑啉(“POZ”)(在WO2008/106186中描述)、聚(N-丙烯酰基吗啉)，以及任何上述聚合物的组合。

[0131] 在一些情况下，所述水溶性聚合物不限于特定的结构。在一些情况下，所述水溶性聚合物是直链的(例如封端的，例如烷氧基PEG或双官能PEG)、支链的或多臂的(例如，叉型PEG或与多元醇核心连接的PEG)、树枝状(或星型)架构，每种都带有或不带有一个或多个可降解的连接。此外，所述水溶性聚合物的内部结构可以以任何数目的不同重复模式来组织化，并且可以选自均聚物、交替共聚物、无规共聚物、嵌段共聚物、交替三元共聚物、无规三元共聚物和嵌段三元共聚物。

[0132] 在一些实施方案中，所述IL-2缀合物中的水溶性聚合物的重均分子量为约100道尔顿至约150,000道尔顿。示例性的范围包括，例如，在大于5,000道尔顿至约100,000道尔顿的范围内、在约6,000道尔顿至约90,000道尔顿的范围内、在约10,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围内、在大于10,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围内、在约20,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围内、在约53,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围内、在约25,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围内、在约29,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围内、在约35,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围内以及在约40,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围内的重均分子量。

[0133] 所述水溶性聚合物的示例性重均分子量包括约100道尔顿、约200道尔顿、约300道尔顿、约400道尔顿、约500道尔顿、约600道尔顿、约700道尔顿、约750道尔顿、约800道尔顿、约900道尔顿、约1,000道尔顿、约1,500道尔顿、约2,000道尔顿、约2,200道尔顿、约2,500道尔顿、约3,000道尔顿、约4,000道尔顿、约4,400道尔顿、约4,500道尔顿、约5,000道尔顿、约5,500道尔顿、约6,000道尔顿、约7,000道尔顿、约7,500道尔顿、约8,000道尔顿、约9,000道尔顿、约10,000道尔顿、约11,000道尔顿、约12,000道尔顿、约13,000道尔顿、约14,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约22,500道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约55,000道尔顿、约60,000道尔顿、约65,000道尔顿、约70,000道尔顿和约75,000道尔顿。也可以使用总分子量为前述任何分子量的水溶性聚合物的支链形式(例如，由两个20,000道尔顿的聚合物组成的支链40,000道尔顿水溶性聚合物)。在一个或多个实施方案中，所述缀合物不具有

直接或间接与重均分子量小于约6,000道尔顿的PEG连接的任何PEG部分。

[0134] PEG一般包含许多(OCH_2CH_2)单体[或(CH_2CH_2O)单体,取决于该PEG如何定义]。如本文所用的,重复单元的数目由“(OCH_2CH_2)$_n$”中的下标“n”来标识。因此,(n)的值一般落在以下一个或多个范围内:2至约3400,约100至约2300,约100至约2270,约136至约2050,约225至约1930,约450至约1930,约1200至约1930,约568至约2727,约660至约2730,约795至约2730,约795至约2730,约909至约2730,以及约1,200至约1,900。对于任何已知分子量的给定聚合物,可以通过将该聚合物的总重均分子量除以重复单体的分子量来确定重复单元的数目(即“n”)。

[0135] 在一些情况下,所述水溶性聚合物是封端的聚合物,即,至少一个末端被相对惰性的基团如低级C_{1-6}烷氧基或羟基封端的聚合物。当聚合物是PEG时,例如,可以使用甲氧基-PEG(通常称为mPEG),其为PEG的直链形式,其中该聚合物的一个末端是甲氧基(—OCH_3)基团,而另一个末端是可以任选地化学修饰的羟基或其他官能团。

[0136] 在一些实施方案中,示例性的水溶性聚合物包括但不限于来自Quanta Biodesign,Ltd的直链或支链离散PEG(dPEG);来自Nektar Therapeutics的直链、支链或叉型PEG;以及来自JenKem Technology的Y形PEG衍生物。

[0137] 在一些实施方案中,本文所述的细胞因子(例如,白介素、IFN或TNF)多肽与选自以下的水溶性聚合物缀合:聚(亚烷基二醇),如聚乙二醇(“PEG”)、聚(丙二醇)(“PPG”)、乙二醇与丙二醇的共聚物等,聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟基烷基甲基丙烯酰胺)、聚(羟基烷基甲基丙烯酸酯)、多糖、聚(α-羟基酸)、聚(乙烯醇)(PVA)、聚丙烯酰胺(PAAm)、聚二甲基丙烯酰胺(PDAAm)、聚(N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺)(PHPMA)、聚磷腈、聚噁唑啉(“POZ”)、聚(N-丙烯酰基吗啉)及其组合。在一些情况下,该细胞因子多肽与PEG缀合(例如,PEG化)。在一些情况下,该细胞因子多肽与PPG缀合。在一些情况下,该细胞因子多肽与POZ缀合。在一些情况下,该细胞因子多肽与PVP缀合。

[0138] 在一些实施方案中,本文所述的IL-2多肽与选自以下的水溶性聚合物缀合:聚(亚烷基二醇),如聚乙二醇(“PEG”)、聚(丙二醇)(“PPG”)、乙二醇与丙二醇的共聚物等,聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟基烷基甲基丙烯酰胺)、聚(羟基烷基甲基丙烯酸酯)、多糖、聚(α-羟基酸)、聚(乙烯醇)(PVA)、聚丙烯酰胺(PAAm)、聚二甲基丙烯酰胺(PDAAm)、聚(N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺)(PHPMA)、聚磷腈、聚噁唑啉(“POZ”)、聚(N-丙烯酰基吗啉)及其组合。在一些情况下,该IL-2多肽与PEG缀合(例如,PEG化)。在一些情况下,该IL-2多肽与PPG缀合。在一些情况下,该IL-2多肽与POZ缀合。在一些情况下,该IL-2多肽与PVP缀合。

[0139] 在一些情况下,水溶性聚合物包括聚甘油(PG)。在一些情况下,该聚甘油是超支化PG(HPG)(例如,如Imran等人.“Influence of architecture of high molecular weight linear and branched polyglycerols on their biocompatibility and biodistribution,”Biomaterials 33:9135-9147(2012)所述)。在其他情况下,该聚甘油是直链PG(LPG)。在另外的情况下,该聚甘油是中官能性PG、直链嵌段超支化PG(例如,如Wurm等人,“Squaric acid mediated synthesis and biological activity of a library of linear and hyperbranched poly(glycerol)-protein conjugates,”Biomacromolecules 13:1161-1171(2012)所述),或侧链官能性PG(例如,如Li等人,“Synthesis of linear

polyether polyol derivatives as new materials for bioconjugation," Bioconjugate Chem.20:780-789(2009)所述)。

[0140] 在一些情况下,本文所述的细胞因子(例如,白介素、IFN或TNF)多肽缀合至PG,例如,HPG、LPG、中官能性PG、直链-嵌段-超支化PG或侧链官能性PG。在一些情况下,该细胞因子是IL-2多肽。在一些情况下,该IL-2多肽与PG、中官能性PG、直链嵌段超支化PG缀合。

[0141] 在一些实施方案中,水溶性聚合物是可降解的合成PEG替代物。示例性的可降解的合成PEG替代物包括但不限于聚[寡聚(乙二醇)甲基丙烯酸甲酯](POEGMA);通过远螯(telechelic)或基于二末端官能化PEG的大分子单体聚合而生成的骨架修饰的PEG衍生物;包含含有可降解键的共聚单体的PEG衍生物,如聚[(环氧乙烷)-共-(亚甲基环氧乙烷)][P(EO-共-MEO)],环状烯酮缩醛,如与OEGMA共聚的5,6-苯并-2-亚甲基-1,3-二氧杂环庚烷(BMDO)、2-亚甲基-1,3-二氧杂环庚烷(MDO)和2-亚甲基-4-苯基-1,3-二氧戊环(MPDL);或聚(ε-己内酯)-接枝-聚(环氧乙烷)(PCL-g-PEO)。

[0142] 在一些情况下,本文所述的细胞因子(例如,白介素、IFN或TNF)多肽缀合至可降解的合成PEG替代物,例如POEGM;通过远螯或基于二末端官能化PEG的大分子单体聚合而生成的骨架修饰的PEG衍生物;P(EO-共-MEO);环状烯酮缩醛,如与OEGMA共聚的BMDO、MDO和MPDL;或PCL-g-PEO。在一些情况下,该细胞因子是IL-2多肽。在一些情况下,该IL-2多肽缀合至可降解的合成PEG替代物,例如POEGM;通过远螯或基于二末端官能化PEG的大分子单体聚合而生成的骨架修饰的PEG衍生物;P(EO-共-MEO);环状烯酮缩醛,如与OEGMA共聚的BMDO、MDO和MPDL;或PCL-g-PEO。

[0143] 在一些实施方案中,水溶性聚合物包括聚(两性离子)。示例性的聚(两性离子)包括但不限于聚(硫代甜菜碱甲基丙烯酸酯)(PSBMA)、聚(羧基甜菜碱甲基丙烯酸酯)(PCBMA)和聚(2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱)(PMPC)。在一些情况下,本文所述的细胞因子(例如,白介素、IFN或TNF)多肽与聚(两性离子)如PSBMA、PCBMA或PMPC缀合。在一些情况下,该细胞因子是IL-2多肽。在一些情况下,该IL-2多肽与聚(两性离子)如PSBMA、PCBMA或PMPC缀合。

[0144] 在一些实施方案中,水溶性聚合物包括聚碳酸酯。示例性的聚碳酸酯包括但不限于5-甲基-2-氧代-1,3-二氧六环-5-甲酸五氟苯酯(MTC-OC_6F_5)。在一些情况下,本文所述的细胞因子(例如,白介素、IFN或TNF)多肽与聚碳酸酯如MTC-OC_6F_5缀合。在一些情况下,该细胞因子是IL-2多肽。在一些情况下,该IL-2多肽与聚碳酸酯如MTC-OC_6F_5缀合。

[0145] 在一些实施方案中,水溶性聚合物包括聚合物杂合体,例如聚碳酸酯/PEG聚合物杂合体、肽/蛋白质-聚合物缀合物或含羟基的和/或两性离子衍生的聚合物(例如,含羟基的和/或两性离子衍生的PEG聚合物)。在一些情况下,本文所述的细胞因子(例如,白介素、IFN或TNF)多肽缀合至聚合物杂合体,如聚碳酸酯/PEG聚合物杂合体、肽/蛋白质-聚合物缀合物或含羟基的和/或两性离子衍生的聚合物(例如,含羟基的和/或两性离子衍生的PEG聚合物)。在一些情况下,该细胞因子是IL-2多肽。在一些情况下,该IL-2多肽缀合至聚合物杂合体,如聚碳酸酯/PEG聚合物杂合体、肽/蛋白质-聚合物缀合物或含羟基的和/或两性离子衍生的聚合物(例如,含羟基的和/或两性离子衍生的PEG聚合物)。

[0146] 在一些情况下,水溶性聚合物包括多糖。示例性的多糖包括但不限于葡聚糖、聚唾液酸(PSA)、透明质酸(HA)、直链淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素(HS)、糊精或羟乙基淀粉(HES)。

在一些情况下，细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽与多糖缀合。在一些情况下，IL-2多肽与葡聚糖缀合。在一些情况下，IL-2多肽与PSA缀合。在一些情况下，IL-2多肽与HA缀合。在一些情况下，IL-2多肽与直链淀粉缀合。在一些情况下，IL-2多肽与肝素缀合。在一些情况下，IL-2多肽与HS缀合。在一些情况下，IL-2多肽与糊精缀合。在一些情况下，IL-2多肽与HES缀合。

[0147] 在一些情况下，水溶性聚合物包括聚糖。聚糖的示例性类别包括N-连接的聚糖、O-连接的聚糖、糖脂、O-GlcNAc和糖胺聚糖。在一些情况下，细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽与聚糖缀合。在一些情况下，IL-2多肽与N-连接的聚糖缀合。在一些情况下，IL-2多肽与O-连接的聚糖缀合。在一些情况下，IL-2多肽与糖脂缀合。在一些情况下，IL-2多肽与O-GlcNAc缀合。在一些情况下，IL-2多肽与糖胺聚糖缀合。

[0148] 在一些实施方案中，水溶性聚合物包括聚噁唑啉聚合物。聚噁唑啉聚合物是直链合成聚合物，并且类似于PEG，具有低多分散性。在一些情况下，聚噁唑啉聚合物是以平均分子量表征的多分散的聚噁唑啉聚合物。在一些情况下，聚噁唑啉聚合物的平均分子量包括，例如，1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、100,000、200,000、300,000、400,000或500,000Da。在一些情况下，聚噁唑啉聚合物包括聚(2-甲基2-噁唑啉)(PMOZ)、聚(2-乙基2-噁唑啉)(PEOZ)或聚(2-丙基2-噁唑啉)(PPOZ)。在一些情况下，细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽与聚噁唑啉聚合物缀合。在一些情况下，IL-2多肽与聚噁唑啉聚合物缀合。在一些情况下，IL-2多肽与PMOZ缀合。在一些情况下，IL-2多肽与PEOZ缀合。在一些情况下，IL-2多肽与PPOZ缀合。

[0149] 在一些情况下，水溶性聚合物包括聚丙烯酸聚合物。在一些情况下，细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽与聚丙烯酸聚合物聚合物缀合。在一些情况下，IL-2多肽与聚丙烯酸聚合物缀合。

[0150] 在一些情况下，水溶性聚合物包括多胺。多胺是包含两个或更多个伯氨基的有机聚合物。在一些实施方案中，多胺包括支链多胺、直链多胺或环状多胺。在一些情况下，多胺是低分子量的直链多胺。示例性的多胺包括腐胺、尸胺、亚精胺、精胺、乙二胺、1,3-二氨基丙烷、六亚甲基二胺、四乙基亚甲基二胺和哌嗪。在一些情况下，细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽与多胺缀合。在一些情况下，IL-2多肽与多胺缀合。在一些情况下，IL-2多肽与腐胺、尸胺、亚精胺、精胺、乙二胺、1,3-二氨基丙烷、六亚甲基二胺、四乙基亚甲基二胺或哌嗪缀合。

[0151] 在一些情况下，水溶性聚合物描述于美国专利7,744,861、8,273,833和7,803,777。在一些情况下，细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽与美国专利7,744,861、8,273,833或7,803,777中描述的连接体缀合。在一些情况下，IL-2多肽与美国专利7,744,861、8,273,833或7,803,777中描述的连接体缀合。

脂质

[0152] 在一些实施方案中，本文所述的缀合部分是脂质。在一些情况下，该脂质是脂肪酸。在一些情况下，该脂肪酸是饱和脂肪酸。在其他情况下，该脂肪酸是不饱和脂肪酸。示例性的脂肪酸包括但不限于包含约6至约26个碳原子、约6至约24个碳原子、约6至约22个碳原子、约6至约20个碳原子、约6至约18个碳原子、约20至约26个碳原子、约12至约26个碳原子、

约12至约24个碳原子、约12至约22个碳原子、约12至约20个碳原子或约12至约18个碳原子的脂肪酸。在一些情况下，该脂质与一种或多种血清蛋白质结合，从而增加血清稳定性和/或血清半衰期。

[0153] 在一些实施方案中，所述脂质与IL-2缀合。在一些情况下，该脂质是脂肪酸，例如饱和脂肪酸或不饱和脂肪酸。在一些情况下，该脂肪酸是约6至约26个碳原子、约6至约24个碳原子、约6至约22个碳原子、约6至约20个碳原子、约6至约18个碳原子、约20至约26个碳原子、约12至约26个碳原子、约12至约24个碳原子、约12至约22个碳原子、约12至约20个碳原子或约12至约18个碳原子。在一些情况下，该脂肪酸在长度上包含约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个碳原子。在一些情况下，该脂肪酸包括己酸(羊油酸)、庚酸(葡萄花酸)、辛酸(羊脂酸)、壬酸(天竺葵酸)、癸酸(羊蜡酸)、十一烷酸(篦麻油酸)、月桂酸(十二烷酸)、十三烷酸(十三酸)、肉豆蔻酸(十四烷酸)、十五烷酸(十五酸)、棕榈酸(十六烷酸)、十七烷酸(珠光脂酸)、硬脂酸(十八烷酸)、十九烷酸(十九酸)、花生酸(二十烷酸)、二十一烷酸(二十一酸)、山萮酸(二十二烷酸)、二十三烷酸(二十三酸)、二十四烷酸(木焦油酸)、二十五烷酸(二十五酸)或蜡酸(二十六烷酸)。

[0154] 在一些实施方案中，所述IL-2脂质缀合物增强血清稳定性和/或血清半衰期。

蛋白质

[0155] 在一些实施方案中，本文描述的缀合部分是蛋白质或其结合片段。示例性的蛋白质包括白蛋白、转铁蛋白或运甲状腺素蛋白。在一些情况下，该蛋白质或其结合片段包括抗体或其结合片段。在一些情况下，细胞因子缀合物包含蛋白质或其结合片段。在一些情况下，包含蛋白质或其结合片段的IL-2缀合物具有增加的血清半衰期和/或稳定性。在一些情况下，包含蛋白质或其结合片段的IL-2缀合物具有降低的IL-2与一个或多个IL-2R亚基的相互作用。在另外的情况下，该蛋白质或其结合片段阻断IL-2与一个或多个IL-2R亚基的相互作用。

[0156] 在一些实施方案中，所述缀合部分是白蛋白。白蛋白是一系列水溶性球状蛋白质。它通常在血浆中发现，占全部血浆蛋白质的约55-60％。人血清白蛋白(HSA)是585个氨基酸的多肽，其中三级结构分为三个结构域：结构域I(氨基酸残基1-195)、结构域II(氨基酸残基196-383)和结构域III(氨基酸残基384-585)。每个结构域进一步包含结合位点，该结合位点可以与内源性配体如长链和中链脂肪酸、胆红素或血红素或者外源性化合物如杂环或芳族化合物可逆或不可逆地相互作用。

[0157] 在一些情况下，细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽与白蛋白缀合。在一些情况下，该细胞因子多肽与人血清白蛋白(HSA)缀合。在另外的情况下，该细胞因子多肽与白蛋白的功能片段缀合。

[0158] 在一些情况下，IL-2多肽与白蛋白缀合。在一些情况下，该IL-2多肽与人血清白蛋白(HSA)缀合。在另外的情况下，该IL-2多肽与白蛋白的功能片段缀合。

[0159] 在一些实施方案中，所述缀合部分是转铁蛋白。转铁蛋白是大小约为80kDa的679个氨基酸的多肽，并且包含两个Fe^{3+}结合位点，其中一个在N-末端结构域处，而另一个在C-末端结构域处。在一些情况下，人转铁蛋白的半衰期约为7-12天。

[0160] 在一些情况下，细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽与转铁蛋白缀合。在一些情况下，该细胞因子多肽与人转铁蛋白缀合。在另外的情况下，该细胞因子多肽与转铁蛋白

的功能片段缀合。

[0161] 在一些情况下，IL-2多肽与转铁蛋白缀合。在一些情况下，该IL-2多肽与人转铁蛋白缀合。在另外的情况下，该IL-2多肽与转铁蛋白的功能片段缀合。

[0162] 在一些实施方案中，所述缀合部分是运甲状腺素蛋白(TTR)。运甲状腺素蛋白是位于血清和脑脊液中的转运蛋白，其转运甲状腺激素甲状腺素(T_4)和与视黄醇结合的视黄醇结合蛋白。

[0163] 在一些情况下，细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽与运甲状腺素蛋白缀合(通过其末端之一或通过内部铰链区)。在一些情况下，该细胞因子多肽与运甲状腺素蛋白的功能片段缀合。

[0164] 在一些情况下，IL-2多肽与运甲状腺素蛋白缀合(通过其末端之一或通过内部铰链区)。在一些情况下，该IL-2多肽与运甲状腺素蛋白的功能片段缀合。

[0165] 在一些实施方案中，所述缀合部分是抗体或其结合片段。在一些情况下，抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab_2、$F(ab)'_3$片段、单链可变片段(scFv)、双-scFv、$(scFv)_2$、双抗体、微抗体(minibody)、纳米抗体、三抗体、四抗体、人抗体(humabody)、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科动物抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段、或其化学修饰的衍生物。

[0166] 在一些情况下，所述缀合部分包含scFv、双-scFv、$(scFv)_2$、dsFv或sdAb。在一些情况下，该缀合部分包含scFv。在一些情况下，该缀合部分包含双-scFv。在一些情况下，该缀合部分包含$(scFv)_2$。在一些情况下，该缀合部分包含dsFv。在一些情况下，该缀合部分包含sdAb。

[0167] 在一些情况下，所述缀合部分包含抗体的Fc部分，例如IgG、IgA、IgM、IgE或IgD的Fc部分。在一些情况下，该部分包含IgG(例如，IgG_1、IgG_3或IgG_4)的Fc部分。

[0168] 在一些情况下，细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽与抗体或其结合片段缀合。在一些情况下，该细胞因子多肽与人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab_2、$F(ab)'_3$片段、单链可变片段(scFv)、双-scFv、$(scFv)_2$、双抗体、微抗体(minibody)、纳米抗体、三抗体、四抗体、人抗体(humabody)、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科动物抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段、或其化学修饰的衍生物缀合。在另外的情况下，该细胞因子多肽与抗体的Fc部分缀合。在另外的情况下，该细胞因子多肽与IgG(例如，IgG_1、IgG_3或IgG_4)的Fc部分缀合。

[0169] 在一些情况下，IL-2多肽与抗体或其结合片段缀合。在一些情况下，该IL-2多肽与人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab_2、$F(ab)'_3$片段、单链可变片段(scFv)、双-scFv、$(scFv)_2$、双抗体、微抗体(minibody)、纳米抗体、三抗体、四抗体、人抗体(humabody)、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科动物抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段、或其化学修饰的衍生物缀合。在另外的情况下，该IL-2多肽与抗体的Fc部分缀合。在另外的情况下，该IL-2多肽与IgG(例如，IgG_1、IgG_3或IgG_4)的Fc部分缀合。

[0170] 在一些实施方案中，IL-2多肽与水溶性聚合物(例如，PEG)和抗体或其结合片段缀

合。在一些情况下,该抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab_2、$F(ab)'_3$片段、单链可变片段(scFv)、双-scFv、$(scFv)_2$、双抗体、微抗体(minibody)、纳米抗体、三抗体、四抗体、人抗体(humabody)、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科动物抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段、或其化学修饰的衍生物。在一些情况下,该抗体或其结合片段包含scFv、双-scFv、$(scFv)_2$、dsFv或sdAb。在一些情况下,该抗体或其结合片段包含scFv。在一些情况下,该抗体或其结合片段将IL-2缀合物引导至目的靶细胞,并且所述水溶性聚合物增强稳定性和/或血清半衰期。

[0171] 在一些情况下,一个或多个IL-2多肽-水溶性聚合物(例如,PEG)缀合物进一步与抗体或其结合片段结合。在一些情况下,IL-2缀合物与抗体之比约为1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1或12:1。在一些情况下,IL-2缀合物与抗体之比约为1:1。在其他情况下,IL-2缀合物与抗体之比约为2:1、3:1或4:1。在另外的情况下,IL-2缀合物与抗体之比约为6:1或更高。

[0172] 在一些实施方案中,所述一个或多个IL-2多肽-水溶性聚合物(例如,PEG)缀合物直接结合至所述抗体或其结合片段。在其他情况下,IL-2缀合物通过连接体间接地结合至抗体或其结合片段。示例性的连接体包括同双官能连接体、异双官能连接体、基于马来酰亚胺的连接体、零迹(zero-trace)连接体、自牺牲性(self-immolative)连接体、间隔基等。

[0173] 在一些实施方案中,所述抗体或其结合片段直接或间接地结合至所述IL-2多肽-水溶性聚合物(例如,PEG)缀合物的IL-2多肽部分。在这样的情况下,所述抗体针对IL-2多肽的缀合位点在不会阻碍IL-2多肽与IL-2Rβγ的结合的位点处。在另外的情况下,所述抗体针对IL-2多肽的缀合位点在部分阻断IL-2多肽与IL-2Rβγ的结合的位点处。在另外的情况下,所述抗体针对IL-2多肽的缀合位点在阻碍或进一步阻碍IL-2多肽与IL-2Rα的结合的位点处。在其他实施方案中,所述抗体或其结合片段直接或间接地结合至所述IL-2多肽-水溶性聚合物(例如,PEG)缀合物的水溶性聚合物部分。

肽

[0174] 在一些实施方案中,本文所述的缀合部分是肽。在一些情况下,该肽是非结构化的肽。在一些情况下,细胞因子(例如,白介素、IFN或TNF)多肽与肽缀合。在一些情况下,包含肽的IL-2缀合物具有增加的血清半衰期和/或稳定性。在一些情况下,包含肽的IL-2缀合物具有降低的IL-2与一个或多个IL-2R亚基的相互作用。在另外的情况下,该肽阻断IL-2与一个或多个IL-2R亚基的相互作用。

[0175] 在一些情况下,所述缀合部分是XTEN™肽(Amunix Operating Inc.),并且所述修饰被称为XTEN化。XTEN化是编码目的多肽的核酸与编码XTEN™肽(Amunix Operating Inc.)的核酸的遗传融合,XTEN™肽是一种长的非结构化亲水性肽,其包含不同百分比的六种氨基酸:Ala、Glu、Gly、Ser和Thr。在一些情况下,基于与目的多肽组合的性质如表达、遗传稳定性、溶解性、聚集抗性、增强的半衰期、增强的效力和/或增强的体外活性来选择XTEN™肽。在一些情况下,细胞因子(例如,白介素、IFN或TNF)多肽与XTEN肽缀合。在一些情况下,IL-2多肽与XTEN肽缀合。

[0176] 在一些情况下,所述缀合部分是富含甘氨酸的高氨基酸聚合物(HAP),并且所述修饰被称为HAP化。HAP化是编码目的多肽的核酸与编码富含甘氨酸的高氨基酸聚合物(HAP)

的核酸的遗传融合。在一些情况下，该HAP聚合物包含$(Gly_4Ser)_n$重复基序(SEQ ID NO:3)，并且有时长度为约50、100、150、200、250、300个或更多个残基。在一些情况下，细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽与HAP缀合。在一些情况下，IL-2多肽与HAP缀合。

[0177] 在一些实施方案中，所述缀合部分是PAS多肽，并且所述修饰被称为PAS化。PAS化是编码目的多肽的核酸与编码PAS多肽的核酸的遗传融合。PAS多肽是由Pro、Ala和Ser残基组成的不带电荷的亲水性多肽。在一些情况下，PAS多肽的长度至少约为100、200、300、400、500或600个氨基酸。在一些情况下，细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽与PAS多肽缀合。在一些情况下，IL-2多肽与PAS多肽缀合。

[0178] 在一些实施方案中，所述缀合部分是弹性蛋白样多肽(ELP)，并且所述修饰被称为ELP化。ELP化是编码目的多肽的核酸与编码弹性蛋白样多肽(ELP)的核酸的遗传融合。ELP包含VPGxG重复基序(SEQ ID NO:4)，其中x是除脯氨酸外的任何氨基酸。在一些情况下，细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽与ELP缀合。在一些情况下，IL-2多肽与ELP缀合。

[0179] 在一些实施方案中，所述缀合部分是CTP肽。CTP肽包含31个氨基酸残基的肽FQSSSS*KAPPPS*LPSPS*RLPGPS*DTPILPQ(SEQ ID NO:5)，其中S*表示O-糖基化位点(OPKO)。在一些情况下，CTP肽与细胞因子多肽(例如，IL-2多肽)遗传融合。在一些情况下，细胞因子多肽(例如，IL-2多肽)与CTP肽缀合。

[0180] 在一些实施方案中，细胞因子(例如，IL-2多肽)通过谷氨酰化进行修饰。谷氨酰化(或聚谷氨酰化)是谷氨酸的可逆翻译后修饰，其中谷氨酸的γ-羧基与游离谷氨酸的氨基形成肽样键，其中α-羧基延伸到聚谷氨酸链中。

[0181] 在一些实施方案中，细胞因子(例如，IL-2多肽)被明胶样蛋白质(GLK)聚合物修饰。在一些情况下，该GLK聚合物包含Gly-Xaa-Yaa的多个重复，其中Xaa和Yaa分别主要包含脯氨酸和4-羟基脯氨酸。在一些情况下，该GLK聚合物进一步包含氨基酸残基Pro、Gly、Glu、Qln、Asn、Ser和Lys。在一些情况下，该GLK聚合物的长度为约20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、150个残基或更长。

额外的缀合部分

[0182] 在一些情况下，所述缀合部分包含细胞外生物标志物。在一些情况下，该细胞外生物标志物是肿瘤抗原。在一些情况下，示例性的细胞外生物标志物物包括CD19、PSMA、B7-H3、B7-H6、CD70、CEA、CSPG4、EGFRvIII、EphA3、EpCAM、EGFR、ErbB2(HER2)、FAP、FRα、GD2、GD3、Lewis-Y、间皮素、Muc1、Muc 16、ROR1、TAG72、VEGFR2、CD11、Gr-1、CD204、CD16、CD49b、CD3、CD4、CD8和B220。在一些情况下，该缀合部分与细胞因子(例如，IL-2)键合或缀合。在一些情况下，该缀合部分例如在细胞因子(例如，IL-2)的N-末端或C-末端处遗传融合。

[0183] 在一些情况下，所述缀合部分包含来自翻译后修饰的分子。在一些情况下，翻译后修饰的实例包括肉豆蔻酰化、棕榈酰化、异戊二烯化(或异戊烯化)(例如，法呢基化或香叶酰香叶酰化)、糖基磷脂酰肌醇化(glypiation)、酰化(例如，O-酰化、N-酰化、S-酰化)、烷基化(例如，添加烷基，如甲基或乙基)、酰胺化、糖基化、羟基化、碘化、核苷酸添加、氧化、磷酸化、琥珀酰化、硫酸化、糖化、氨基甲酰化、谷氨酰化或脱酰胺。在一些情况下，所述细胞因子(例如，IL-2)通过翻译后修饰如肉豆蔻酰化、棕榈酰化、异戊二烯化(或异戊烯化)(例如，法呢基化或香叶酰香叶酰化)、糖基磷脂酰肌醇化(glypiation)、酰化(例如，O-酰化、N-酰化、S-酰化)、烷基化(例如，添加烷基，如甲基或乙基)、酰胺化、糖基化、羟基化、碘化、核苷酸添

加、氧化、磷酸化、琥珀酰化、硫酸化、糖化、氨基甲酰化、谷氨酰化或脱酰胺进行修饰。

缀合

连接体

[0184] 在一些实施方案中，用于将缀合部分与本文所述的细胞因子多肽(例如，IL-2多肽)缀合或结合的有用的官能性反应性基团包括，例如，零阶或更高阶的连接体。在一些情况下，掺入本文所述的白介素中的非天然氨基酸包含官能性反应性基团。在一些情况下，连接体包含与掺入本文所述的白介素中的非天然氨基酸反应的官能性反应性基团。在一些情况下，缀合部分包含与掺入本文所述的白介素中的非天然氨基酸反应的官能性反应性基团。在一些情况下，缀合部分包含与本文所述的连接体(任选地预连接至细胞因子肽)反应的官能性反应性基团。在一些实施方案中，连接体包含与本文所述的细胞因子肽中的天然氨基酸反应的反应性基团。在一些情况下，高阶连接体包括双官能连接体，如同双官能连接体或异双官能连接体。示例性的同双官能连接体包括但不限于Lomant试剂二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)DSP、3'3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS)、二琥珀酰亚胺基酒石酸酯(DST)、二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸酯(磺基DST)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、二琥珀酰亚胺基戊二酸酯(DSG)、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)、二亚胺代己二酸二甲酯(DMA)、庚二亚氨酸二甲酯(DMP)、辛二亚氨酸二甲酯(DMS)、3,3'-二硫代二丙亚氨酸二甲酯(DTBP)、1,4-二-(3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基)丁烷(DPDPB)、双马来酰亚胺基己烷(BMH)、含芳基卤的化合物(DFDNB)，例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯、4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯基砜(DFDNPS)、双-[β-(4-叠氮基水杨酰胺基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、己二酸二酰肼、碳酰肼、邻甲苯胺、3,3'-二甲基联苯胺、联苯胺、α,α'-对二氨基二苯基、二碘-对二甲苯磺酸、N,N'-亚乙基-双(碘乙酰胺)或N,N'-六亚甲基-双(碘乙酰胺)。

[0185] 在一些实施方案中，所述双官能连接体包括异双官能连接体。示例性的异双官能连接体包括但不限于胺反应性和巯基交联体，如N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(sPDP)、长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(LC-sPDP)、水溶性长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀酰亚胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基二硫代)甲苯(sMPT)、磺基琥珀酰亚胺基-6-[α-甲基-α-(2-吡啶基二硫代]-甲苯甲酰胺基]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBs)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBs)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(sIAB)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-sIAB)、琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基)琥珀酰亚胺酯(GMBs)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBs)、琥珀酰亚胺基6-((碘乙酰基)氨基)己酸酯(sIAX)、琥珀酰亚胺基6-[6-(((碘乙酰基)氨基)己酰基)氨基]己酸酯(sIAXX)、琥珀酰亚胺基4-(((碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-甲酸酯(sIAC)、琥珀酰亚胺基6-((((4-(碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-羰基)氨基)己酸酯(sIACX)、对硝基苯基碘乙酸酯(NPIA)，羰基反

应性和巯基反应性交联剂，如4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼(MPBH)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-酰肼-8(M_2C_2H)、3-(2-吡啶基二硫代)丙酰基酰肼(PDPH)，胺反应性和光反应性交联体，如N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(NHs-AsA)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-(4-叠氮基水杨酰胺基)己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(对叠氮基水杨酰胺基)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAsD)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(HsAB)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰基氧基琥珀酰亚胺(ANB-NOs)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(间叠氮基-邻硝基苯甲酰胺基)-乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAND)、N-琥珀酰亚胺基-4(4-叠氮基苯基)1,3'-二硫代丙酸酯(sADP)、N-磺基琥珀酰亚胺基(4-叠氮基苯基)-1,3'-二硫代丙酸酯(磺基-sADP)、磺基琥珀酰亚胺基4-(对叠氮基苯基)丁酸酯(磺基-sAPB)、磺基琥珀酰亚胺基2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAED)、磺基琥珀酰亚胺基7-叠氮基-4-甲基香豆素3-乙酸酯(磺基-sAMCA)、对硝基苯基重氮基丙酮酸(pNPDP)、对硝基苯基-2-重氮基-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP)，巯基反应性和光反应性交联体，如1-(对叠氮基水杨酰胺基)-4-(碘乙酰胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(对叠氮基水杨酰胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫基)丙酰胺(APDP)、苯甲酮-4-碘乙酰胺，苯甲酮-4-马来酰亚胺羰基反应性和光反应性交联体，如对叠氮基苯甲酰基酰肼(ABH)，羧酸反应性和光反应性交联体，如4-(对叠氮基水杨酰胺基)丁胺(AsBA)，以及精氨酸反应性和光反应性交联体，如对叠氮基苯基乙二醛(APG)。

[0186] 在一些情况下，所述反应性官能团包括对存在于结合部分上(例如，缀合部分上或IL-2上)的亲电子基团具有反应性的亲核基团。示例性的亲电子基团包括羰基——如醛、酮、羧酸、酯、酰胺、烯酮、酰基卤或酸酐。在一些实施方案中，所述反应性官能团是醛。示例性的亲核基团包括酰肼、肟、氨基、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯和芳基酰肼。在一些实施方案中，掺入本文所述的白介素中的非天然氨基酸包含亲电子基团。

[0187] 在一些实施方案中，所述连接体是可裂解的连接体。在一些实施方案中，该可裂解的连接体是二肽连接体。在一些实施方案中，该二肽连接体是缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)、苯丙氨酸-赖氨酸(Phe-Lys)、缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala)和缬氨酸-赖氨酸(Val-Lys)。在一些实施方案中，该二肽连接体是缬氨酸-瓜氨酸。

[0188] 在一些实施方案中，所述连接体是包含例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、25、30、35、40、45、50个或更多个氨基酸的肽连接体。在一些情况下，该肽连接体包含至多2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、25、30、35、40、45、50个或更少的氨基酸。在另外的情况下，该肽连接体包含约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸。

[0189] 在一些实施方案中，所述连接体包含自牺牲性连接体部分。在一些实施方案中，该自牺牲性连接体部分包含对氨基苄醇(PAB)、对氨基苄氧羰基(PABC)或其衍生物或类似物。在一些实施方案中，该连接体包含二肽连接体部分和自牺牲性连接体部分。在一些实施方案中，该自牺牲性连接体部分例如在美国专利9089614和WIPO公开WO2015038426中描述。

[0190] 在一些实施方案中，所述可裂解的连接体是葡糖苷酸。在一些实施方案中，该可裂

解的连接体是酸可裂解的连接体。在一些实施方案中，该酸可裂解的连接体是肼。在一些实施方案中，该可裂解的连接体是可还原的连接体。

[0191] 在一些实施方案中，所述连接体包含马来酰亚胺基团。在一些情况下，该马来酰亚胺基团也被称为马来酰亚胺间隔基。在一些情况下，该马来酰亚胺基团进一步包含己酸，从而形成马来酰亚胺基己酰基(mc)。在一些情况下，该连接体包含马来酰亚胺基己酰基(mc)。在一些情况下，连接体是马来酰亚胺基己酰基(mc)。在其他情况下，该马来酰亚胺基团包括以上描述的马来酰亚胺基甲基，如琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)或磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)。

[0192] 在一些情况下，所述马来酰亚胺基团是自稳定马来酰亚胺。在一些情况下，该自稳定马来酰亚胺利用二氨基丙酸(DPR)掺入与马来酰亚胺相邻的碱性氨基，以提供硫代琥珀酰亚胺环水解的分子内催化，从而避免马来酰亚胺通过逆Michael反应经历消除反应。在一些情况下，该自稳定马来酰亚胺是Lyon等人，“Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates,” Nat.Biotechnol.32(10):1059-1062(2014)描述的马来酰亚胺基团。在一些情况下，该连接体包含自稳定马来酰亚胺。在一些情况下，该连接体是自稳定马来酰亚胺。

缀合化学

[0193] 各种缀合反应用来缀合连接体、缀合部分和掺入本文所述的细胞因子肽中的非天然氨基酸。此类缀合反应通常与水性条件如“生物正交”反应相容。在一些实施方案中，缀合反应由化学试剂如催化剂、光或在连接体、缀合部分或非天然氨基酸上发现的反应性化学基团介导。在一些实施方案中，缀合反应由酶介导。在一些实施方案中，本文使用的缀合反应在Gong,Y.,Pan,L.Tett.Lett.2015,56,2123中描述。在一些实施方案中，本文使用的缀合反应在Chen,X.;Wu.Y-W.Org.Biomol.Chem.2016,14,5417中描述。

[0194] 在本文所述的一些实施方案中，缀合反应包括酮或醛与亲核试剂的反应。在一些实施方案中，缀合反应包括酮与氨氧基反应形成肟的反应。在一些实施方案中，缀合反应包括酮与芳基或杂芳基胺基团反应形成亚胺的反应。在一些实施方案中，缀合反应包括醛与芳基或杂芳基胺基团反应形成亚胺的反应。在一些实施方案中，本文所述的缀合反应产生包含经由肟连接的连接体或缀合部分的细胞因子肽。在一些实施方案中，缀合反应包括醛或酮与色胺亲核试剂的Pictet-Spengler反应。在一些实施方案中，缀合反应包括肼基-Pictet-Spengler反应。在一些实施方案中，缀合反应包括Pictet-Spengler连接。

[0195] 在本文所述的一些实施方案中，本文所述的缀合反应包括叠氮化物和膦的反应(Staudinger连接)。在一些实施方案中，该膦是芳基膦。在一些实施方案中，该芳基膦包含原酸酯基团。在一些实施方案中，该膦包含2-(二苯基膦基)苯甲酸甲酯结构。在一些实施方案中，本文所述的缀合反应产生包含经由芳基酰胺连接的连接体或缀合部分的细胞因子肽。在一些实施方案中，本文所述的缀合反应产生包含经由酰胺连接的连接体或缀合部分的细胞因子肽。

[0196] 在本文所述的一些实施方案中，本文所述的缀合反应包括1,3-二极环加成反应。在一些实施方案中，该1,3-二极环加成反应包括叠氮化物和膦的反应(“点击”反应)。在一些实施方案中，所述缀合反应被铜催化。在一些实施方案中，本文所述的缀合反应产生包含经由三唑连接的连接体或缀合部分的细胞因子肽。在一些实施方案中，本文所述的缀合反

应包括叠氮化物与张力(strained)烯烃的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括叠氮化物与张力炔烃的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括叠氮化物与环炔,例如OCT、DIFO、DIFBO、DIBO、BARAC、TMTH或其他张力环炔的反应,其结构在Gong,Y.,Pan,L.Tett.Lett.2015,56,2123中显示。在一些实施方案中,1,3-二极环加成反应被光催化(“光点击”)。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括末端烯丙基与四唑和光的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括末端炔基与四唑和光的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括O-烯丙基氨基酸与四嗪和光的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括O-烯丙基酪氨酸与四嗪和光的反应。

[0197] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括包含二烯和亲二烯体的反电子需求环加成反应。在一些实施方案中,该二烯包括四嗪。在一些实施方案中,该亲二烯体包括烯烃。在一些实施方案中,该亲二烯体包括炔烃。在一些实施方案中,该炔烃是张力炔烃。在一些实施方案中,该烯烃是张力二烯。在一些实施方案中,该炔烃是反式环辛炔。在一些实施方案中,该炔烃是环辛烯。在一些实施方案中,该烯烃是环丙烯。在一些实施方案中,该烯烃是氟环丙烯。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应导致形成经由在环中包含两个氮原子的6元环杂环连接至连接体或缀合部分的细胞因子肽。

[0198] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括烯烃复分解反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括烯烃和炔烃与钌催化剂的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括两个烯烃与钌催化剂的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括两个炔烃与钌催化剂的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括烯烃或炔烃与钌催化剂和包含烯丙基的氨基酸的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括烯烃或炔烃与钌催化剂和包含烯丙基硫醚或硒化物的氨基酸的反应。在一些实施方案中,钌催化剂是Hoveda-Grubbs第2代催化剂。在一些实施方案中,烯烃复分解反应包括一种或多种张力烯烃或炔烃的反应。

[0199] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括交叉偶合反应。在一些实施方案中,交叉偶合反应包含过渡金属催化剂,如铱、金、钌、铑、钯、镍、铂或其他过渡金属催化剂和一种或多种配体。在一些实施方案中,过渡金属催化剂是水溶性的。在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括Suzuki-Miyaura交叉偶合反应。在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括芳基卤(或三氟甲烷磺酸酯或甲苯磺酸酯)、芳基或烯基硼酸和钯催化剂的反应。在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括Sonogashira交叉偶合反应。在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括芳基卤(或三氟甲烷磺酸酯或甲苯磺酸酯)、炔烃和钯催化剂的反应。在一些实施方案中,交叉偶合反应导致连接体或缀合部分经由碳-碳键连接至细胞因子肽。

[0200] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括反应性基团在缀合之前的脱保护或“解笼”反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括用光使反应性基团解笼,随后进行缀合反应。在一些实施方案中,反应性基团用包含一个或多个硝基的芳烷基部分保护。在一些实施方案中,反应性基团的解笼产生游离胺、硫化物或其他反应性基团。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括用过渡金属催化剂使反应性基团解笼,随后进行缀合反应。在一些实施方案中,该过渡金属催化剂包含钯和一种或多种配体。在一些实施方案中,反应性基团用烯丙基部分保护。在一些实施方案中,反应性基团用氨基甲酸烯丙

酯保护。在一些实施方案中，反应性基团用炔丙基部分保护。在一些实施方案中，反应性基团用氨基甲酸炔丙酯保护。在一些实施方案中，反应性基团用亲二烯体保护，其中暴露于二烯(如四嗪)导致该反应性基团的脱保护。

[0201] 在本文所述的一些实施方案中，本文所述的缀合反应包括配体指导的反应，其中(任选地连接至反应性基团的)配体促进了反应性基团与细胞因子肽之间的缀合位点。在一些实施方案中，在细胞因子肽与反应性基团反应期间或之后裂解该配体。在一些实施方案中，该细胞因子肽的缀合位点是天然氨基酸。在一些实施方案中，该细胞因子肽的缀合位点是赖氨酸、半胱氨酸或丝氨酸。在一些实施方案中，该细胞因子肽的缀合位点是本文所述的非天然氨基酸。在一些实施方案中，该反应性基团包含离去基团，如缺电子的芳基或杂芳基。在一些实施方案中，该反应性基团包含离去基团，如被细胞因子肽置换的缺电子的烷基。在一些实施方案中，本文所述的缀合反应包括自由基捕获剂与自由基物质的反应。在一些实施方案中，本文所述的缀合反应包括氧化自由基加成反应。在一些实施方案中，自由基捕获剂是芳基胺。在一些实施方案中，自由基物质是酪氨酰自由基。在一些实施方案中，自由基物质由钌催化剂(如$[Ru(bpy)_3]$)和光生成。

[0202] 酶促反应任选地用于本文所述的缀合反应。示例性的酶促缀合包括SortA介导的缀合、TG介导的缀合或FGE介导的缀合。在一些实施方案中，本文所述的缀合反应包括末端1-氨基-2-硫基与硫酯的天然蛋白质连接(NPL)以形成酰胺键。

[0203] 本文描述了用于使连接体或缀合部分与细胞因子肽反应的各种缀合反应，其中该反应与细胞因子肽中的天然(“规范”)氨基酸发生。在一些实施方案中，该天然氨基酸在缀合位置处发现，该位置在野生型序列中发现，或者，该位置已被突变。在一些实施方案中，缀合反应包括在半胱氨酸残基处形成二硫键。在一些实施方案中，缀合反应包括半胱氨酸或赖氨酸的1,4-Michael加成反应。在一些实施方案中，缀合反应包括半胱氨酸的氰基苯并噻唑连接。在一些实施方案中，缀合反应包括与丙酮部分如1,3-二氯-2-丙酮的交联。在一些实施方案中，缀合反应包括通过半胱氨酸与O-均三甲苯磺酰基羟胺反应形成的脱氢丙氨酸的1,4-Michael加成。在一些实施方案中，缀合反应包括酪氨酸与三唑啉二酮(TAD)或TAD衍生物的反应。在一些实施方案中，缀合反应包括色氨酸与铑卡宾体(carbenoid)的反应。

使用方法

增生性疾病或病况

[0204] 在一些实施方案中，本文描述了一种治疗有需要的受试者的增生性疾病或病况的方法，其包括向该受试者施用治疗有效量的本文所述的细胞因子缀合物(例如，IL-2缀合物)。在一些情况下，该IL-2缀合物包含分离并纯化的IL-2多肽和缀合部分，其中相对于野生型IL-2多肽，该IL-2缀合物对IL-2受体α(IL-2Rα)亚基的亲和力降低。在一些情况下，该IL-2缀合物包含分离并纯化的IL-2多肽；以及在选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E60、E61、E62、K64、P65、E68、V69、N71、L72、M104、C105和Y107的氨基酸位置处与所述分离并纯化的IL-2多肽结合的缀合部分，其中氨基酸残基的编号对应于SEQ ID NO:1。在一些情况下，该IL-2缀合物优先与IL-2Rβ和IL-2Rβγ亚基相互作用以形成IL-2/IL-2Rβγ复合物。在一些情况下，该IL-2/IL-2Rβγ复合物刺激和/或增强CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆T细胞、NK细胞和/或NKT细胞的扩充。在另外的情况下，Teff细胞的扩充使Teff:Treg比偏向Teff群体。

[0205] 在一些实施方案中，所述增生性疾病或病况是癌症。在一些情况下，该癌症是实体瘤。示例性的实体瘤包括但不限于膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食道癌、眼癌、头颈癌、肾癌、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌或前列腺癌。在一些情况下，该实体瘤是转移性癌症。在一些情况下，该实体瘤是复发性或难治性癌症。

[0206] 在一些情况下，将本文所述的细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)缀合物施用于有需要的受试者，以供治疗实体瘤。在这样的情况下，该受试者患有膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食道癌、眼癌、头颈癌、肾癌、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌或前列腺癌。在一些情况下，该实体瘤是转移性癌症。在一些情况下，该实体瘤是复发性或难治性癌症。

[0207] 在一些情况下，将本文所述的IL-2缀合物施用于有需要的受试者，以供治疗实体瘤。在这样的情况下，该受试者患有膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食道癌、眼癌、头颈癌、肾癌、肺癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌或前列腺癌。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗膀胱癌。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗乳腺癌。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗结直肠癌。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗食道癌。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗头颈癌。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗肾癌。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗肺癌。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗黑素瘤。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗卵巢癌。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗胰腺癌。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗前列腺癌。

[0208] 在一些实施方案中，将所述IL-2缀合物施用于受试者以供治疗转移性癌症。在一些情况下，该转移性癌症包括转移性膀胱癌、转移性骨癌、转移性脑癌、转移性乳腺癌、转移性结直肠癌、转移性食道癌、转移性眼癌、转移性头颈癌、转移性肾癌、转移性肺癌、转移性黑素瘤、转移性卵巢癌、转移性胰腺癌或转移性前列腺癌。在一些情况下，将所述IL-2缀合物施用于受试者以供治疗转移性膀胱癌、转移性骨癌、转移性脑癌、转移性乳腺癌、转移性结直肠癌、转移性食道癌、转移性眼癌、转移性头颈癌、转移性肾癌、转移性肺癌、转移性黑素瘤、转移性卵巢癌、转移性胰腺癌或转移性前列腺癌。

[0209] 在一些情况下，将所述IL-2缀合物施用于受试者以供治疗复发性或难治性癌症。在一些情况下，该复发性或难治性癌症包括复发性或难治性膀胱癌、复发性或难治性骨癌、复发性或难治性脑癌、复发性或难治性乳腺癌、复发性或难治性结直肠癌、复发性或难治性食道癌、复发性或难治性眼癌、复发性或难治性头颈癌、复发性或难治性肾癌、复发性或难治性肺癌、复发性或难治性黑素瘤、复发性或难治性卵巢癌、复发性或难治性胰腺癌或者复发性或难治性前列腺癌。在一些情况下，将所述IL-2缀合物施用于受试者以供治疗复发性或难治性膀胱癌、复发性或难治性骨癌、复发性或难治性脑癌、复发性或难治性乳腺癌、复发性或难治性结直肠癌、复发性或难治性食道癌、复发性或难治性眼癌、复发性或难治性头颈癌、复发性或难治性肾癌、复发性或难治性肺癌、复发性或难治性黑素瘤、复发性或难治性卵巢癌、复发性或难治性胰腺癌或者复发性或难治性前列腺癌。

[0210] 在一些实施方案中，所述癌症是未经治疗(treatment-naïve)的癌症。在这样的情况下，该未经治疗的癌症是未用疗法进行治疗的癌症。在一些情况下，该未经治疗的癌症是实体瘤，如膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食道癌、眼癌、头颈癌、肾癌、肺癌、黑素

瘤、卵巢癌、胰腺癌或前列腺癌。在一些实施方案中，本文描述了一种治疗有需要的受试者中的未经治疗的实体瘤的方法，其包括向该受试者施用本文所述的细胞因子缀合物(例如，IL-2缀合物)。

[0211] 在一些实施方案中，所述癌症是血液系统恶性肿瘤。在一些情况下，该血液系统恶性肿瘤包括白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些情况下，该血液系统恶性肿瘤是T细胞恶性肿瘤。在其他情况下，该血液系统恶性肿瘤是B细胞恶性肿瘤。示例性的血液系统恶性肿瘤包括但不限于慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高恶性B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或淋巴瘤样肉芽肿病。

[0212] 在一些情况下，所述血液系统恶性肿瘤是转移性癌症。在一些情况下，该转移性癌症是转移性T细胞恶性肿瘤或转移性B细胞恶性肿瘤。

[0213] 在一些情况下，所述血液系统恶性肿瘤是复发性或难治性癌症。在一些情况下，该复发性或难治性癌症是复发性或难治性T细胞恶性肿瘤或者复发性或难治性B细胞恶性肿瘤。

[0214] 在一些情况下，将本文所述的细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)施用于有需要的受试者，以供治疗血液系统恶性肿瘤。在一些情况下，该受试者患有T细胞恶性肿瘤。在一些情况下，该受试者患有B细胞恶性肿瘤。在一些情况下，该受试者患有慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高恶性B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或淋巴瘤样肉芽肿病。

[0215] 在一些情况下，将本文所述的IL-2缀合物施用于有需要的受试者，以供治疗血液系统恶性肿瘤。在一些情况下，该受试者患有T细胞恶性肿瘤。在一些情况下，该受试者患有B细胞恶性肿瘤。在一些情况下，该受试者患有慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高恶性B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或淋巴瘤样肉芽肿病。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗CLL。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗SLL。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗FL。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗DLBCL。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗MCL。在一些情

况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗多发性骨髓瘤。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗伯基特淋巴瘤。

[0216] 在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗转移性血液系统恶性肿瘤。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗转移性T细胞恶性肿瘤。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗转移性B细胞恶性肿瘤。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗转移性慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高恶性B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或转移性淋巴瘤样肉芽肿病。

[0217] 在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗复发性或难治性血液系统恶性肿瘤。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗复发性或难治性T细胞恶性肿瘤。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗复发性或难治性B细胞恶性肿瘤。在一些情况下，将该IL-2缀合物施用于受试者以供治疗复发性或难治性慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高恶性B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或淋巴瘤样肉芽肿病。

额外的治疗剂

[0218] 在一些实施方案中，进一步向受试者施用额外的治疗剂。在一些情况下，所述额外的治疗剂与细胞因子缀合物(例如，IL-2缀合物)同时施用。在其他情况下，依次施用所述额外的治疗剂和IL-2缀合物，例如，在所述额外的治疗剂之前施用细胞因子缀合物(例如，IL-2缀合物)，或在施用所述额外的治疗剂之后施用细胞因子缀合物(例如，IL-2缀合物)。

[0219] 在一些情况下，所述额外的治疗剂包括化疗剂、免疫治疗剂、靶向疗法、放射疗法或其组合。说明性的额外的治疗剂包括但不限于烷基化剂，如六甲蜜胺、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、洛莫司汀、美法仑、奥沙利铂、替莫唑胺或噻替派；抗代谢物，如5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巯基嘌呤(6-MP)、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨、羟基脲、氨甲蝶呤或培美曲塞；蒽环类药物，如柔红霉素、多柔比星、表柔比星或伊达比星；拓扑异构酶I抑制剂，如托泊替康或伊立替康(CPT-11)；拓扑异构酶II抑制剂，如依托泊苷(VP-16)、替尼泊苷或米托蒽醌；有丝分裂抑制剂，如多西他赛、雌莫司汀、伊沙匹隆、紫杉醇、长春碱、长春新碱或长春瑞滨；或皮质类固醇，如泼尼松、甲泼尼龙或地塞米松。

[0220] 在一些情况下，所述额外的治疗剂包括一线疗法。如本文所用的，“一线疗法”包括针对患有癌症的受试者的主要治疗。在一些情况下，该癌症是原发性癌症。在其他情况下，

该癌症是转移性或复发性癌症。在一些情况下，该一线疗法包括化学疗法。在其他情况下，该一线治疗包括放射疗法。技术人员将容易理解，不同的一线治疗可能适用于不同类型的癌症。

[0221] 在一些情况下，细胞因子缀合物(例如，IL-2缀合物)与额外的治疗剂一起施用，该额外的治疗剂选自烷基化剂，如六甲蜜胺、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、洛莫司汀、美法仑、奥沙利铂、替莫唑胺或噻替派；抗代谢物，如5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巯基嘌呤(6-MP)、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨、羟基脲、氨甲蝶呤或培美曲塞；蒽环类药物，如柔红霉素、多柔比星、表柔比星或伊达比星；拓扑异构酶I抑制剂，如托泊替康或伊立替康(CPT-11)；拓扑异构酶II抑制剂，如依托泊苷(VP-16)、替尼泊苷或米托蒽醌；有丝分裂抑制剂，如多西他赛、雌莫司汀、伊沙匹隆、紫杉醇、长春碱、长春新碱或长春瑞滨；或皮质类固醇，如泼尼松、甲泼尼龙或地塞米松。

[0222] 在一些情况下，本文所述的细胞因子缀合物(例如，IL-2缀合物)与酶聚ADP核糖聚合酶(PARP)的抑制剂一起施用。示例性的PARP抑制剂包括但不限于奥拉帕尼(olaparib)(AZD-2281，Lynparza®，来自Astra Zeneca)、卢卡帕尼(rucaparib)(PF-01367338，Rubraca®，来自Clovis Oncology)、尼拉帕尼(niraparib)(MK-4827，Zejula®，来自Tesaro)、talazoparib(BMN-673，来自BioMarin Pharmaceutical Inc.)、维利帕尼(veliparib)(ABT-888，来自AbbVie)、CK-102(以前称CEP 9722，来自Teva Pharmaceutical Industries Ltd.)、E7016(来自Eisai)、iniparib(BSI 201，来自Sanofi)和pamiparib(BGB-290，来自BeiGene)。在一些情况下，该细胞因子缀合物(例如，IL-2缀合物)与PARP抑制剂如奥拉帕尼、卢卡帕尼、尼拉帕尼、talazoparib、维利帕尼、CK-102、E7016、iniparib或pamiparib联合施用。

[0223] 在一些情况下，本文所述的细胞因子缀合物(例如，IL-2缀合物)与免疫检查点抑制剂一起施用。示例性的检查点抑制剂包括：

[0224] PD-L1抑制剂，如Genentech的MPDL3280A(RG7446)，来自BioXcell的抗小鼠PD-L1抗体克隆10F.9G2(目录号BE0101)，来自Bristol-Meyer's Squibb的抗PD-L1单克隆抗体MDX-1105(BMS-936559)和BMS-935559，MSB0010718C，小鼠抗PD-L1克隆29E.2A3，和AstraZeneca的MEDI4736；

[0225] PD-L2抑制剂，如GlaxoSmithKline的AMP-224(Amplimmune)和rHIgM12B7；

[0226] PD-1抑制剂，如来自BioXcell的抗小鼠PD-1抗体克隆J43(目录号BE0033-2)，来自BioXcell的抗小鼠PD-1抗体克隆RMP1-14(目录号BE0146)，小鼠抗PD-1抗体克隆EH12，Merck的MK-3475抗小鼠PD-1抗体(Keytruda，派姆单抗(pembrolizumab)，lambrolizumab)，AnaptysBio的被称为ANB011的抗PD-1抗体，抗体MDX-1 106(ONO-4538)，Bristol-Myers Squibb的人IgG4单克隆抗体纳武单抗(Opdivo®，BMS-936558，MDX1106)，AstraZeneca的AMP-514和AMP-224，以及来自CureTech Ltd的Pidilizumab(CT-011)；

[0227] CTLA-4抑制剂，如Bristol Meyers Squibb的抗CTLA-4抗体伊匹木单抗(ipilimumab)(也被称为Yervoy®、MDX-010、BMS-734016和MDX-101)，来自Millipore的抗CTLA4抗体克隆9H10，Pfizer的曲美木单抗(tremelimumab)(CP-675,206，ticilimumab)，以及来自Abcam的抗CTLA4抗体克隆BNI3；

[0228] LAG3抑制剂,如来自eBioscience的抗Lag-3抗体克隆eBioC9B7W(C9B7W),来自LifeSpan Biosciences的抗Lag3抗体LS-B2237,来自Immutep的IMP321(ImmuFact),抗Lag3抗体BMS-986016,以及LAG-3嵌合抗体A9H12;

[0229] B7-H3抑制剂,如MGA271;

[0230] KIR抑制剂,如Lirilumab(IPH2101);

[0231] Cd137抑制剂,如urelumab(BMS-663513,Bristol-Myers Squibb)、PF-05082566(抗4-1BB,PF-2566,Pfizer)或XmAb-5592(Xencor);

[0232] PS抑制剂,如巴维昔单抗(Bavituximab);

[0233] 以及针对TIM3、CD52、CD30、CD20、CD33、CD27、OX40、GITR、ICOS、BTLA(CD272)、CD160、2B4、LAIR1、TIGHT、LIGHT、DR3、CD226、CD2或SLAM的抑制剂,如抗体或其片段(例如,单克隆抗体,人、人源化或嵌合抗体)、RNAi分子或小分子。

[0234] 在一些情况下,所述细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与派姆单抗、纳武单抗、曲美木单抗或伊匹木单抗联合施用。

[0235] 在一些情况下,本文所述的细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与诸如阿仑珠单抗、曲妥珠单抗、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、本妥昔单抗(brentuximab vedotin)、ado-曲妥珠单抗(ado-trastuzumab emtansine)或兰妥莫单抗(blinatumomab)等抗体一起施用。

[0236] 在一些情况下,细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与选自额外的细胞因子的额外的治疗剂一起施用。在一些情况下,所述额外的细胞因子增强和/或协同T效应细胞的扩充和/或增殖。在一些情况下,所述额外的细胞因子包括IL-1β、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21或TNFα。在一些情况下,所述额外的细胞因子是IL-7。在一些情况下,所述额外的细胞因子是IL-15。在一些情况下,所述额外的细胞因子是IL-21。在一些情况下,所述额外的细胞因子是TNFα。

[0237] 在一些情况下,细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与选自受体激动剂的额外的治疗剂一起施用。在一些情况下,该受体激动剂包括Toll样受体(TLR)配体。在一些情况下,该TLR配体包括TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8或TLR9。在一些情况下,该TLR配体包括合成配体,例如,Pam3Cys、CFA、MALP2、Pam2Cys、FSL-1、Hib-OMPC、聚I:C、聚A:U、AGP、MPLA、RC-529、MDF2β、CFA或鞭毛蛋白。在一些情况下,该细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与选自TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8和TLR9的一种或多种TLR激动剂一起施用。在一些情况下,该细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与选自Pam3Cys、CFA、MALP2、Pam2Cys、FSL-1、Hib-OMPC、聚I:C、聚A:U、AGP、MPLA、RC-529、MDF2β、CFA和鞭毛蛋白的一种或多种TLR激动剂一起施用。

[0238] 在一些实施方案中,细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与过继T细胞转移(ACT)疗法一起使用。在一个实施方案中,ACT涉及鉴定受试者中具有例如抗肿瘤活性的自体T淋巴细胞,在体外扩充该自体T淋巴细胞,随后将扩充的T淋巴细胞再输注到受试者中。在另一个实施方案中,ACT包括使用具有例如抗肿瘤活性的同种异体T淋巴细胞,在体外扩充该T淋巴细胞,随后将扩充的同种异体T淋巴细胞输注到有需要的受试者中。在一些情况下,本文所述的细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与自体T淋巴细胞一起使用,作为ACT疗法的一部分。在其他情况下,本文所述的细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与同种异体T淋巴细

胞一起使用,作为ACT疗法的一部分。在一些情况下,该细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与ACT疗法同时施用于有需要的受试者。在其他情况下,该细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与ACT疗法依次施用于有需要的受试者。

[0239] 在一些实施方案中,细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)用于自体和/或同种异体T细胞转移的离体激活和/或扩充。在这样的情况下,该细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)用来激活和/或扩充包含自体和/或同种异体T细胞的样品,并且任选地在将样品施用于有需要的受试者之前从该样品中去除该细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)。

[0240] 在一些实施方案中,细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与疫苗一起施用。在一些情况下,细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与溶瘤病毒联合使用。在这样的情况下,该细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)充当调节免疫应答的刺激剂。在一些情况下,该细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与溶瘤病毒一起使用,作为辅助疗法的一部分。示例性的溶瘤病毒包括T-Vec(Amgen)、G47Δ(Todo等人)、JX-594(Sillajen)、CG0070(Cold Genesys)和Reolysin(Oncolytics Biotech)。在一些情况下,该细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与诸如T-Vec、G47Δ、JX-594、CG0070或Reolysin等溶瘤病毒联合使用。

[0241] 在一些实施方案中,细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与放射疗法联合施用。

[0242] 在一些实施方案中,细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与手术联合施用。

病原体感染

[0243] 在一些实施方案中,本文描述了一种治疗有需要的受试者的病原体感染的方法,其包括向该受试者施用治疗有效量的本文所述的细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)。在一些情况下,该IL-2缀合物包含分离并纯化的IL-2多肽和缀合部分,其中相对于野生型IL-2多肽,该IL-2缀合物对IL-2受体α(IL-2Rα)亚基的亲和力降低。在一些情况下,该IL-2缀合物包含分离并纯化的IL-2多肽;以及在选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E60、E61、E62、K64、P65、E68、V69、N71、L72、M104、C105和Y107的氨基酸位置处与所述分离并纯化的IL-2多肽结合的缀合部分,其中氨基酸残基的编号对应于SEQ ID NO:1。在一些情况下,该IL-2缀合物优先与IL-2Rβ和IL-2Rβγ亚基相互作用以形成IL-2/IL-2Rβγ复合物,该复合物刺激和/或增强CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、NK细胞和/或NKT细胞的扩充。在另外的情况下,该IL-2缀合物有助于CD8+T细胞对病原体贮库(reservoir)的识别。

[0244] 在一些实施方案中,所述病原体感染是病毒感染,其中在用抗病毒疗法治疗后,病毒贮库(例如,静息的CD4+T细胞)保留在所治疗的宿主中。在这样的情况下,本文所述的细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)诱导CD8+T细胞(或细胞毒性T细胞)对病毒贮库的识别。在一些情况下,该细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)用作单一疗法,以将CD8+T细胞重导向至感染的静息细胞以供消除。在一些情况下,该细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)与额外的疗法联合使用,以将CD8+T细胞重导向至感染的静息细胞以供消除。示例性的额外的疗法包括抗病毒治疗,如阿昔洛韦、溴夫定、二十二醇、泛昔洛韦、膦甲酸、碘苷、喷昔洛韦、曲氟尿苷、伐昔洛韦和pritelivir。

[0245] 在一些实施方案中,所述病毒是DNA病毒或RNA病毒。该DNA病毒包括单链(ss)DNA病毒、双链(ds)DNA病毒或含有ss和ds DNA区两者的DNA病毒。该RNA病毒包括单链(ss)RNA病毒或双链(ds)RNA病毒。在一些情况下,该ssRNA病毒被进一步分类为正义RNA病毒或负义RNA病毒。

[0246] 示例性的dsDNA病毒包括来自以下科的病毒:肌病毒科(Myoviridae)、短尾病毒科(Podoviridae)、管状病毒科(Siphoviridae)、异疱疹病毒科(Alloherpesviridae)、疱疹病毒科(Herpesviridae)、贝类疱疹病毒科(Malacoherpesviridae)、脂毛病毒科(Lipothrixviridae)、棒状DNA病毒科(Rudiviridae)、腺病毒科(Adenoviridae)、Ampullaviridae、鳞翅目昆虫病毒科(Ascoviridae)、非洲猪瘟病病毒科(Asfaviridae)、杆状病毒科(Baculoviridae)、Bicaudaviridae、Clavaviridae、被脂病毒科(Corticoviridae)、福塞尔噬菌体科(Fuselloviridae)、球状病毒科(Globuloviridae)、古老病毒科(Guttaviridae)、Hytrosaviridae、虹膜病毒科(Iridoviridae)、马赛病毒科(Marseilleviridae)、Mimiviridae、Nimaviridae、Pandoraviridae、乳头状瘤病毒科(Papillomaviridae)、藻DNA病毒科(Phycodnaviridae)、原生病毒科(Plasmaviridae)、多DNA病毒、多瘤病毒科(Polyomaviridae)、痘病毒科(Poxviridae)、球脂病毒科(Sphaerolipoviridae)和覆盖层病毒科(Tectiviridae)。

[0247] 示例性的ssDNA病毒包括来自以下科的病毒:指环病毒科(Anelloviridae)、Bacillariodnaviridae、Bidnaviridae、圆环病毒科(Circoviridae)、双粒病毒科(Geminiviridae)、丝杆病毒科(Inoviridae)、微病毒科(Microviridae)、矮缩病毒科(Nanoviridae)、细小病毒科(Parvoviridae)和Spiraviridae。

[0248] 示例性的含有ss和ds DNA区两者的DNA病毒包括来自pleolipoviruses组的病毒。在一些情况下,pleolipoviruses包括西班牙盐盒菌(Haloarcula hispanica)多形性病毒1、盐几何菌属(Halogeometricum)多形性病毒1、盐红菌属(halorubrum)多形性病毒1、盐红菌属多形性病毒2、盐红菌属多形性病毒3和盐红菌属多形性病毒6。

[0249] 示例性的dsRNA病毒包括来自以下科的病毒:双RNA病毒科(Birnaviridae)、金色病毒科(Chrysoviridae)、囊病毒科(Cystoviridae)、Endornaviridae、减毒病毒科(Hypoviridae)、Megavirnaviridae、分体病毒科(Partitiviridae)、Picobirnaviridae、呼肠病毒科(Reoviridae)、轮状病毒(Rotavirus)和全病毒科(Totiviridae)。

[0250] 示例性的正义ssRNA病毒包括来自以下科的病毒:α弯曲病毒科(Alphaflexiviridae)、α四病毒科(Alphatetraviridae)、Alvernaviridae、动脉病毒科(Arteriviridae)、星状病毒科(Astroviridae)、杆状RNA病毒科(Barnaviridae)、β弯曲病毒科(Betaflexiviridae)、雀麦花叶病毒科(Bromoviridae)、嵌杯病毒科(Caliciviridae)、Carmotetraviridae、纺锤病毒科(Closteroviridae)、冠状病毒科(Coronaviridae)、二顺反子病毒科(Dicistroviridae)、黄病毒科(Flaviviridae)、γ弯曲病毒科(Gammaflexiviridae)、传染性软腐病病毒科(Iflaviridae)、轻病毒科(Leviviridae)、黄矮病毒科(Luteoviridae)、Marnaviridae、Mesoniviridae、裸露RNA病毒科(Narnaviridae)、野田村病毒科(Nodaviridae)、Permutotetraviridae、细小RNA病毒科(Picornaviridae)、马铃薯Y病毒科(Potyviridae)、杆状套病毒科(Roniviridae)、逆转录病毒科(Retroviridae)、Secoviridae、披膜病毒科(Togaviridae)、蕃茄丛矮病毒科(Tombusviridae)、芜菁黄花叶病毒科(Tymoviridae)和帚状病毒科(Virgaviridae)。

[0251] 示例性的负义ssRNA病毒包括来自以下科的病毒:沙粒病毒科(Arenaviridae)、Borna病毒科(Bornaviridae)、布尼亚病毒科(Bunyaviridae)、纤丝病毒科(Filoviridae)、Nyamiviridae、Ophioviridae、正粘病毒科(Orthomyxoviridae)、副粘病毒科

(Paramyxoviridae)和弹状病毒科(Rhabdoviridae)。

[0252] 在一些实施方案中,所述病原体感染是由以下病毒引起的:Abelson白血病病毒、Abelson鼠白血病病毒、Abelson病毒、急性喉气管支气管炎病毒、阿德莱德河病毒(Adelaide River virus)、腺伴随病毒群、腺病毒、非洲马病病毒、非洲猪瘟病毒、AIDS病毒、阿留申水貂病病毒、α逆转录病毒、甲病毒、ALV相关病毒、Amapari病毒、口蹄疫病毒属、水生呼肠病毒、虫媒病毒、虫媒病毒C、虫媒病毒A组、虫媒病毒B组、沙粒病毒组、阿根廷出血热病毒、阿根廷出血热病毒、动脉病毒属、星状病毒、Ateline疱疹病毒组、Aujezky病病毒、奥拉病毒、Ausduk病病毒、澳洲蝙蝠狂犬病病毒、禽腺病毒、禽幼红细胞增多症病毒、禽传染性支气管炎病毒、禽白血病病毒、禽造白细胞组织增生病毒、禽淋巴瘤病毒、禽成髓细胞瘤病毒、禽副粘病毒、禽肺脑炎病毒、禽网状内皮组织增生病毒、禽肉瘤病毒、禽C型逆转录病毒组、禽嗜肝DNA病毒、禽痘病毒、B病毒、B19病毒、Babanki病毒、狒狒疱疹病毒、杆状病毒、Barmah森林病毒、贝巴鲁病毒、Berrimah病毒、β逆转录病毒、双rna病毒、Bittner病毒、BK病毒、黑港渠病毒、蓝舌病毒、玻利维亚出血热病毒、Boma病病毒、羊边境病病毒、博纳病病毒、牛α-疱疹病毒1、牛α-疱疹病毒2、牛冠状病毒、牛短暂热病毒、牛免疫缺陷病毒、牛白血病病毒、牛造白细胞组织增生病毒、牛乳头炎病毒、牛乳头瘤病毒、牛丘疹性口炎病毒、牛细小病毒、牛合胞体病毒、牛C型肿瘤病毒、牛病毒性腹泻病毒、Buggy Creek病毒、弹状病毒群、布尼奥罗病毒超群、布尼亚病毒、伯基特淋巴瘤病毒、布汪巴热、CA病毒、嵌杯样病毒、加利福尼亚脑炎病毒、骆驼痘病毒、金丝雀痘病毒、犬疱疹病毒、犬冠状病毒、犬瘟热病毒、犬疱疹病毒、犬微小病毒、犬细小病毒、Cano Delgadito病毒、山羊关节炎病毒、山羊脑炎病毒、山羊疱疹病毒、山羊痘病毒属、心病毒、豚鼠疱疹病毒1、猕猴疱疹病毒1、1型猕猴疱疹病毒、猕猴疱疹病毒2、水疱性口炎-印度病毒、Changuinola病毒、水道猫鱼病毒、查里维勒河病毒、水痘病毒、切昆贡亚病毒、黑猩猩疱疹病毒、白鲑呼肠弧病毒(chub reovirus)、鲑鱼病毒、Cocal病毒、银鲑呼肠孤病毒、性交疹病毒、科罗拉多壁虱热病毒、科蜱病毒、哥伦比亚SK病毒、感冒病毒、接触性脓疱皮炎病毒、绵羊接触性脓疱皮炎病毒、冠状病毒、科里帕塔病毒、鼻病毒、牛痘病毒、柯萨奇病毒、CPV(胞质型多角体病毒)、蟋蟀麻痹病毒、克里米亚-刚果出血热病毒、副流感病毒2型、隐病毒、质型多角体病毒、巨细胞病毒、巨细胞病毒组、胞质型多角体病毒、鹿乳头瘤病毒、δ逆转录病毒、登革病毒、浓核病毒、依赖病毒、佐立病毒、diploma病毒、果蝇C病毒、鸭乙型肝炎病毒、鸭肝炎病毒1、鸭肝炎病毒2、十二指肠病毒、杜温哈格病毒、变形翼病毒DWV(Deformed wing virus DWV)、东方马脑炎病毒、东方马脑脊髓炎病毒、EB病毒、埃博拉病毒、埃博拉样病毒、艾柯病毒、艾柯病毒、艾柯病毒10、艾柯病毒28、艾柯病毒9、鼠痘病毒、EEE病毒、EIA病毒、EIA病毒、脑炎病毒、脑心肌炎组病毒、脑心肌炎病毒、肠道病毒、酶升高病毒、酶升高病毒(LDH)、流行性出血热病毒、兽疫出血病病毒、EB病毒、马α疱疹病毒1、马α疱疹病毒4、马疱疹病毒2、马流产病毒、马动脉炎病毒、马脑病病毒、马传染性贫血病毒、马麻疹病毒、马鼻肺炎病毒、马鼻病毒、Eubenangu病毒、欧洲麋鹿乳头瘤病毒、欧洲猪瘟病毒、沼泽病毒、Eyach病毒、猫疱疹病毒1、猫嵌杯样病毒、猫纤维瘤病毒、猫疱疹病毒、猫免疫缺陷病毒、猫传染性腹膜炎病毒、猫白血病/肉瘤病毒、猫白血病病毒、猫白细胞减少症病毒、猫细小病毒、猫肉瘤病毒、猫合胞体病毒、线状病毒、弗兰德尔斯病毒、黄病毒、口蹄疫病毒、摩根堡病毒、Four Corners汉坦病毒、禽腺病毒1、禽痘病毒、弗林德病毒、γ逆转录病毒、GB肝炎病毒、GB病毒、德国麻疹病毒、盖塔病毒、长臂猿白血病病毒、腺热病

毒、山羊痘病毒、golden shinner病毒、枯叶蛾病毒、鹅细小病毒、颗粒症病毒、Gross病毒、地松鼠乙型肝炎病毒、A组虫媒病毒、Guanarito病毒、豚鼠巨细胞病毒、豚鼠C型病毒、汉坦病毒、汉坦病毒、文蛤呼肠孤病毒、野兔纤维瘤病毒、HCMV(人巨细胞病毒)、血液吸附病毒2、日本血凝集病毒、出血热病毒、hendra病毒、亨尼波病毒、嗜肝性DNA病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒组、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、己型肝炎病毒、庚型肝炎病毒、非甲非乙型肝炎病毒、肝炎病毒、肝炎病毒(非人类)、肝脑脊髓炎呼肠孤病毒3、嗜肝病毒、灰苍鹭乙型肝炎病毒、疱疹B病毒、单纯疱疹病毒、单纯疱疹病毒1、单纯疱疹病毒2、疱疹病毒、疱疹病毒7、蜘蛛猴疱疹病毒、人疱疹病毒、疱疹病毒感染、松鼠猴疱疹病毒、猪疱疹病毒、水痘疱疹病毒、高地J病毒、Hirame弹状病毒、猪霍乱病毒、人腺病毒2、人α疱疹病毒1、人α疱疹病毒2、人α疱疹病毒3、人嗜B淋巴细胞病毒、人β疱疹病毒5、人冠状病毒、人巨细胞病毒组、人泡沫病毒、人γ疱疹病毒4、人γ疱疹病毒6、人甲型肝炎病毒、人疱疹病毒1组、人疱疹病毒2组、人疱疹病毒3组、人疱疹病毒4组、人疱疹病毒6、人类疱疹病毒8、人免疫缺陷病毒、人免疫缺陷病毒1、人免疫缺陷病毒2、人乳头瘤病毒、人T细胞白血病病毒、人T细胞白血病病毒I、人T细胞白血病病毒II、人T细胞白血病病毒III、人T细胞淋巴瘤病毒I、人T细胞淋巴瘤病毒II、人嗜T淋巴细胞病毒1、人嗜T淋巴细胞病毒2、人嗜T淋巴细胞病毒I、人嗜T淋巴细胞病毒II、人嗜T淋巴细胞病毒III、姬蜂病毒、婴儿胃肠炎病毒、牛传染性鼻气管炎病毒、传染性造血组织坏死病毒、传染性胰腺坏死病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、丁型流感病毒、流感病毒pr8、昆虫虹彩病毒、昆虫病毒、虹彩病毒、日本乙型脑炎病毒、日本脑炎病毒、JC病毒、胡宁病毒、卡波西肉瘤相关疱疹病毒、克麦罗沃病毒、Kilham大鼠病毒、Klamath病毒、Kolongo病毒、朝鲜出血热病毒、孔巴病毒、科萨努尔森林热病毒、Kyzylagach病毒、La Crosse病毒、乳酸脱氢酶升高病毒、乳酸脱氢酶病毒、拉戈斯蝙蝠病毒、Langur病毒、兔细小病毒、拉沙热病毒、拉沙病毒、潜伏大鼠病毒、LCM病毒、渗漏病毒、慢病毒、兔病毒、白血病病毒、白血病病毒、粗糙皮肤病病毒、淋巴结病相关病毒、淋巴细胞隐病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、淋巴组织增生病毒组、Machupo病毒、假狂犬病病毒、哺乳动物B型肿瘤病毒组、哺乳动物B型逆转录病毒、哺乳动物C型逆转录病毒组、哺乳动物D型逆转录病毒、乳腺瘤病毒、Mapuera病毒、马尔堡病毒、马尔堡样病毒、Mason-Pfizer猴病毒、哺乳动物腺病毒、Mayaro病毒、ME病毒、麻疹病毒、Menangle病毒、门哥病毒、门哥病毒、米德尔堡病毒、副痘苗病毒、貂肠炎病毒、小鼠细小病毒、MLV相关病毒、MM病毒、莫科拉病毒、软疣痘病毒、传染性软疣病毒、猴B病毒、猴痘病毒、单负病毒目、麻疹病毒、Mount Elgon蝙蝠病毒、小鼠巨细胞病毒、小鼠脑脊髓炎病毒、小鼠肝炎病毒、小鼠K病毒、小鼠白血病病毒、小鼠乳腺瘤病毒、小鼠细小病毒、小鼠肺炎病毒、小鼠脊髓灰质炎病毒、小鼠多瘤病毒、小鼠肉瘤病毒、小鼠痘病毒、莫桑比克病毒、Mucambo病毒、粘膜病病毒、腮腺炎病毒、鼠β疱疹病毒1、鼠巨细胞病毒2、鼠巨细胞病毒组、鼠脑脊髓炎病毒、鼠肝炎病毒、鼠白血病病毒、鼠诱发结节病毒、鼠多瘤病毒、鼠肉瘤病毒、鼠巨细胞病毒、墨累河谷脑炎病毒、粘液瘤病毒、粘液病毒、新城疫病毒、腮腺炎粘液病毒、内罗毕绵羊病病毒、内罗毕病毒、Nanirnavirus、纳里瓦病毒、Ndumo病毒、牛皮肤结节病毒、纳尔逊湾病毒、嗜神经病毒、新世界沙粒病毒、新生儿肺炎病毒、新城疫病毒、Nipah病毒、非致细胞病病毒、诺沃克病毒、核型多角体病毒(NPV)、乳头颈病毒(nipple neck virus)、阿尼昂尼昂病毒、Ockelbo病毒、致癌病毒、致癌病毒样颗粒、致癌RNA病毒、环状病毒、羊传染性口疮病毒、奥罗波克病毒、正嗜肝

DNA病毒、正粘病毒、正痘病毒、正呼肠孤病毒、Orungo、绵羊乳头瘤病毒、绵羊卡他性热病毒、猫头鹰猴疱疹病毒、Palyam病毒、乳头瘤病毒、长毛兔乳头瘤病毒、乳多空病毒、副流感病毒、1型副流感病毒、2型副流感病毒、3型副流感病毒、4型副流感病毒、副粘病毒、副痘病毒、副痘苗病毒、细小病毒、细小病毒B19、细小病毒组、瘟病毒、白蛉病毒、海豹瘟热病毒、微小脱氧核糖核酸病毒、微小核糖核酸病毒、猪巨细胞病毒、鸽痘病毒、皮里病毒、皮春纳病毒、小鼠肺炎病毒、肺炎病毒、脊髓灰质炎病毒、脊髓灰质炎病毒、多DNA病毒、多面形病毒、多瘤病毒、多瘤病毒、牛多瘤病毒、长尾猴多瘤病毒、人多瘤病毒2、猕猴多瘤病毒1、鼠多瘤病毒1、鼠多瘤病毒2、狒狒多瘤病毒1、狒狒多瘤病毒2、棉尾兔多瘤病毒、Pongine疱疹病毒1、猪流行性腹泻病毒、猪血凝性脑脊髓炎病毒、猪细小病毒、猪传播性胃肠炎病毒、猪C型病毒、痘病毒、痘病毒、天花病毒、Prospect Hill病毒、原病毒、假牛痘病毒、假性狂犬病病毒、鹦鹉痘病毒、鹌鹑痘病毒、兔纤维瘤病毒、兔肾空泡形成病毒、兔乳头状瘤病毒、狂犬病病毒、浣熊细小病毒、浣熊痘病毒、Ranikhet病毒、大鼠巨细胞病毒、大鼠细小病毒、大鼠病毒、Rauscher病毒、重组痘苗病毒、重组病毒、呼肠孤病毒、呼肠孤病毒1、呼肠孤病毒2、呼肠孤病毒3、爬行动物C型病毒、呼吸道感染病毒、呼吸道合胞病毒、呼吸道病毒、网状内皮组织增生病病毒、弹状病毒、弹状病毒carpia、棒状病毒属、鼻病毒、根前毛菌病毒、裂谷热病毒、Riley病毒、牛瘟病毒、RNA肿瘤病毒、罗斯河病毒、轮状病毒、胭脂红病毒、劳斯肉瘤病毒、风疹病毒、麻疹病毒、风疹病毒、俄罗斯秋季脑炎病毒、SA 11猿猴病毒、SA2病毒、Sabia病毒、鹭山病毒、猴疱疹病毒1、唾液腺病毒、白蛉热病毒组、Sandjimba病毒、SARS病毒、SDAV(唾泪腺炎病毒)、海豹痘病毒、西门利克森林病毒、汉城病毒、绵羊痘病毒、肖普纤维瘤病毒、肖普乳头瘤病毒、猿猴泡沫病毒、猿猴甲型肝炎病毒、猿猴人免疫缺陷病毒、猿猴免疫缺陷病毒、猿猴副流感病毒、猿猴嗜T淋巴细胞病毒、猿猴病毒、猿猴病毒40、单纯疱疹病毒、辛诺瓦病毒、辛德毕斯病毒、天花病毒、南美出血热病毒、麻雀痘病毒、泡沫病毒、松鼠纤维瘤兔痘病毒、松鼠猴逆转录病毒、SSV1病毒组、STLV(猿猴嗜T淋巴细胞病毒)I型、STLV(猿猴嗜T淋巴细胞病毒)II型、STLV(猿猴嗜T淋巴细胞病毒)III型、牛丘疹口炎病毒、豚鼠唾腺巨细胞病毒、猪α疱疹病毒1、猪疱疹病毒2、猪痘病毒、沼泽地热病毒、猪痘病毒、瑞士小鼠白血病病毒、TAC病毒、Tacaribe复合病毒、Tacaribe病毒、塔纳痘病毒、Taterapox病毒、丁鲷呼肠孤病毒、Theiler脑脊髓炎病毒、Theiler病毒、索戈托病毒、Thottapalayam病毒、蜱传脑炎病毒、Tioman病毒、披膜病毒、环曲病毒、肿瘤病毒、树鼩病毒、火鸡鼻气管炎病毒、火鸡痘病毒、C型逆转录病毒、D型肿瘤病毒、D型逆转录病毒组、溃疡性疾病弹状病毒、乌纳病毒、乌孔涅米病毒组、痘苗病毒、空泡形成病毒、水痘带状疱疹病毒、水痘病毒、Varicola病毒、重型天花病毒、天花病毒、Vasin Gishu病病毒、VEE病毒、委内瑞兰马脑炎病毒、委内瑞拉马脑脊髓炎病毒、委内瑞拉出血热病毒、水疱性口炎病毒、水疱病毒、Vilyuisk病毒、蝰蛇逆转录病毒、病毒性出血性败血症病毒、Visna Maedi病毒、绵羊髓鞘脱落病毒、田鼠痘病毒、VSV(水疱性口炎病毒)、Wallal病毒、Warrego病毒、疣病毒、WEE病毒、西尼罗病毒、西方马脑炎病毒、西方马脑脊髓炎病毒、沃达罗河病毒、冬季呕吐病毒、旱獭乙型肝炎病毒、毛猴肉瘤病毒、伤瘤病毒、WRSV病毒、雅巴猴瘤病毒、雅巴病毒、亚塔痘病毒、黄热病毒或Yug Bogdanovac病毒。

[0253] 在一些实施方案中,所述病原体感染是由逆转录病毒引起的。示例性的逆转录病毒包括但不限于人免疫缺陷病毒(HIV)、人T细胞白血病病毒(HTLV)、莫洛尼鼠白血病病毒

(MuLV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、禽造白细胞组织增生和肉瘤病毒,或Mason-Pfizer猴病毒。

[0254] 在一些实施方案中,将本文所述的细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)施用于具有逆转录病毒感染或处于潜伏期中的受试者,以减少和/或消除处于静息期的受感染细胞。在一些情况下,该逆转录病毒包括人免疫缺陷病毒(HIV)、人T细胞白血病病毒(HTLV)、莫洛尼鼠白血病病毒(MuLV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、禽造白细胞组织增生和肉瘤病毒,或Mason-Pfizer猴病毒。在一些情况下,该细胞因子缀合物将CD8+T细胞重导向,以识别并消除处于静息期的受感染细胞。

[0255] 在一些情况下,所述细胞因子缀合物是IL-2缀合物。在一些实施方案中,将该IL-2缀合物施用于具有逆转录病毒感染或在潜伏期中的受试者,以减少和/或消除处于静息期的受感染细胞。在一些情况下,该逆转录病毒包括人免疫缺陷病毒(HIV)、人T细胞白血病病毒(HTLV)、莫洛尼鼠白血病病毒(MuLV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、禽造白细胞组织增生和肉瘤病毒,或Mason-Pfizer猴病毒。在一些情况下,该IL-2缀合物将CD8+T细胞重导向,以识别并消除处于静息期的受感染细胞。在另外的情况下,该IL-2缀合物与抗逆转录病毒疗法联合施用于受试者。

[0256] 在一些实施方案中,所述逆转录病毒是HIV。在一些情况下,将本文所述的细胞因子缀合物(例如,IL-2缀合物)施用于患有获得性免疫缺陷综合征(AIDS)或处于潜伏期中的受试者,以减少和/或消除处于静息期的HIV感染的细胞(例如CD4+T细胞)。在一些情况下,该细胞因子缀合物是IL-2缀合物。在一些情况下,该IL-2缀合物与抗逆转录病毒疗法联合施用于受试者。示例性的HIV抗逆转录病毒疗法包括:

[0257] 核苷逆转录酶抑制剂(NRTI),如阿巴卡韦、恩曲他滨、拉米夫定、富马酸替诺福韦二吡呋酯和齐多夫定;

[0258] 非核苷逆转录酶抑制剂(NNRTI),如依非韦伦、依曲韦林、奈韦拉平或利匹韦林;

[0259] 蛋白酶抑制剂(PI),如阿扎那韦、达芦那韦、呋山那韦、利托那韦、沙奎那韦和替拉那韦;

[0260] 融合抑制剂,如恩夫韦肽;

[0261] CCR5拮抗剂,如马拉韦罗;

[0262] 整合酶抑制剂,如度鲁特韦(dolutegravir)和拉替拉韦(raltegravir);

[0263] 附着后抑制剂,如依巴珠单抗;

[0264] 药代动力学增强剂,如ac cobicistat;以及

[0265] 混合物,如阿巴卡韦和拉米夫定;阿巴卡韦、度鲁特韦和拉米夫定;阿巴卡韦、拉米夫定和齐多夫定;阿扎那韦和考比司他;比昔格韦、恩曲他滨和替诺福韦阿拉芬酰胺;达芦那韦和考比司他;度鲁特韦和利匹韦林;依非韦伦、恩曲他滨和富马酸替诺福韦二吡呋酯;依非韦伦、拉米夫定和富马酸替诺福韦二吡呋酯;依非韦伦、拉米夫定和富马酸替诺福韦二吡呋酯;艾维雷韦(Elvitegravir)、考比司他、恩曲他滨和替诺福韦阿拉芬酰胺富马酸酯;艾维雷韦、考比司他、恩曲他滨和富马酸替诺福韦二吡呋酯;恩曲他滨、利匹韦林和替诺福韦阿拉芬酰胺;恩曲他滨、利匹韦林和富马酸替诺福韦二吡呋酯;恩曲他滨和替诺福韦阿拉芬酰胺;恩曲他滨和富马酸替诺福韦二吡呋酯;拉米夫定和富马酸替诺福韦二吡呋酯;拉米夫定和齐多夫定;以及洛匹那韦和利托那韦。

[0266] 在一些情况下，将所述IL-2缀合物与抗逆转录病毒疗法联合施用于受试者，该抗逆转录病毒疗法例如是核苷逆转录酶抑制剂(NRTI)，如阿巴卡韦、恩曲他滨、拉米夫定、富马酸替诺福韦二吡呋酯和齐多夫定；非核苷逆转录酶抑制剂(NNRTI)，如依非韦伦、依曲韦林、奈韦拉平或利匹韦林；蛋白酶抑制剂(PI)，如阿扎那韦、达芦那韦、呋山那韦、利托那韦、沙奎那韦和替拉那韦；融合抑制剂，如恩夫韦肽；CCR5拮抗剂，如马拉韦罗；整合酶抑制剂，如度鲁特韦和拉替拉韦；附着后抑制剂，如依巴珠单抗；药代动力学增强剂，如accobicistat；或混合物，如阿巴卡韦和拉米夫定；阿巴卡韦、度鲁特韦和拉米夫定；阿巴卡韦、拉米夫定和齐多夫定；阿扎那韦和考比司他；比昔格韦、恩曲他滨和替诺福韦阿拉芬酰胺；达芦那韦和考比司他；度鲁特韦和利匹韦林；依非韦伦、恩曲他滨和富马酸替诺福韦二吡呋酯；依非韦伦、拉米夫定和富马酸替诺福韦二吡呋酯；依非韦伦、拉米夫定和富马酸替诺福韦二吡呋酯；艾维雷韦、考比司他、恩曲他滨和替诺福韦阿拉芬酰胺富马酸酯；艾维雷韦、考比司他、恩曲他滨和富马酸替诺福韦二吡呋酯；恩曲他滨、利匹韦林和替诺福韦阿拉芬酰胺；恩曲他滨、利匹韦林和富马酸替诺福韦二吡呋酯；恩曲他滨和替诺福韦阿拉芬酰胺；恩曲他滨和富马酸替诺福韦二吡呋酯；拉米夫定和富马酸替诺福韦二吡呋酯；拉米夫定和齐多夫定；以及洛匹那韦和利托那韦。

[0267] 在一些实施方案中，所述病毒是肝炎病毒，例如甲型、乙型、丙型、丁型或戊型肝炎病毒。在一些情况下，将本文所述的细胞因子缀合物(例如，IL-2缀合物)施用于具有肝炎感染或处于潜伏期中的受试者，以减少和/或消除处于静息期的受感染细胞。在一些情况下，该细胞因子缀合物将CD8+T细胞重导向，以识别并消除处于静息期的受感染细胞。

[0268] 在一些情况下，所述细胞因子缀合物是IL-2缀合物。在一些实施方案中，将所述IL-2缀合物施用于具有肝炎感染或在潜伏期中的受试者，以减少和/或消除处于静息期的受感染细胞。在一些情况下，该IL-2缀合物将CD8+T细胞重导向，以识别并消除处于静息期的受感染细胞。在一些情况下，该IL-2缀合物与抗病毒疗法联合施用于受试者。针对肝炎的示例性抗病毒疗法包括利巴韦林；NS3/4A蛋白酶抑制剂，如帕利瑞韦(paritaprevir)、西咪匹韦(simeprevir)和格佐匹韦(grazoprevir)；NS5A蛋白酶抑制剂，如雷迪帕韦(ledipasvir)、奥比他韦(ombitasvir)、艾尔巴韦(elbasvir)和达卡他韦(daclatasvir)；NS5B核苷酸/核苷和非核苷聚合酶抑制剂，如索非布韦(sofosbuvir)和达萨布韦(dasabuvir)；以及组合，如雷迪帕韦-索非布韦、达萨布韦-奥比他韦-帕利瑞韦-利托那韦；艾尔巴韦-格佐匹韦、奥比他韦-帕利瑞韦-利托那韦、索非布韦-velpatasvir、索非布韦-velpatasvir-voxilaprevir和glecaprevir-pibrentasvir；以及干扰素，如聚乙二醇干扰素α-2a、聚乙二醇干扰素α-2b和干扰素α-2b。在一些情况下，将IL-2缀合物与抗病毒疗法联合施用于受试者，该抗病毒疗法例如是利巴韦林；NS3/4A蛋白酶抑制剂，如帕利瑞韦(paritaprevir)、西咪匹韦(simeprevir)和格佐匹韦(grazoprevir)；NS5A蛋白酶抑制剂，如雷迪帕韦(ledipasvir)、奥比他韦(ombitasvir)、艾尔巴韦(elbasvir)和达卡他韦(daclatasvir)；NS5B核苷酸/核苷和非核苷聚合酶抑制剂，如索非布韦(sofosbuvir)和达萨布韦(dasabuvir)；以及组合，如雷迪帕韦-索非布韦、达萨布韦-奥比他韦-帕利瑞韦-利托那韦；艾尔巴韦-格佐匹韦、奥比他韦-帕利瑞韦-利托那韦、索非布韦-velpatasvir、索非布韦-velpatasvir-voxilaprevir和glecaprevir-pibrentasvir；以及干扰素，如聚乙二醇干扰素α-2a、聚乙二醇干扰素α-2b和干扰素α-2b。

细胞群体扩充方法

[0269] 在一些实施方案中，本文另外描述了扩充淋巴细胞群体，例如CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、NK细胞和/或NKT细胞群体的方法，或扩充Treg细胞群体的方法。在一些情况下，该方法包括使细胞与本文所述的细胞因子缀合物接触，并使该细胞因子与细胞因子受体相互作用以形成复合物，其中该复合物刺激不同淋巴细胞群体的扩充。

[0270] 在一些情况下，扩充CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体的方法包括使细胞群体与以上描述的分离并修饰的IL-2多肽接触足以诱导与IL-2Rβ形成复合物的时间，从而刺激Teff和/或NK细胞群体的扩充。在一些情况下，扩充CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、NK细胞和/或NKT细胞群体的方法包括：(a)使细胞群体与本文所述的IL-2缀合物接触；以及(b)使IL-2与IL-2Rβ和IL-2Rγ亚基相互作用以形成IL-2/IL-2Rβγ复合物；其中所述IL-2缀合物对IL-2Rα亚基的亲和力降低，并且其中所述IL-2/IL-2Rβγ复合物刺激CD4+辅助细胞、CD8+效应幼稚和记忆细胞、NK细胞和/或NKT细胞的扩充。如上所述，该IL-2缀合物包含分离并纯化的IL-2多肽；以及在选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E60、E61、E62、K64、P65、E68、V69、N71、L72、M104、C105和Y107的氨基酸位置处与所述分离并纯化的IL-2多肽结合的缀合部分，其中氨基酸残基的编号对应于SEQ ID NO:1。在一些情况下，该氨基酸位置选自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72和Y107。在一些情况下，该氨基酸位置选自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72和Y107。在一些情况下，该氨基酸位置选自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、P65、V69、L72和Y107。在一些情况下，该氨基酸位置选自T37、T41、F42、F44、Y45、P65、V69、L72和Y107。在一些情况下，该氨基酸位置选自R38和K64。在一些情况下，该氨基酸位置选自E61、E62和E68。在一些情况下，该氨基酸位置在E62。

[0271] 在一些情况下，所述IL-2缀合物使细胞群体中的CD4+T调节性(Treg)细胞扩充少于20％、15％、10％、5％或1％。在一些情况下，所述IL-2缀合物不扩充所述细胞群体中的CD4+Treg细胞。在一些情况下，与分离并修饰的IL-2多肽一起孵育后，细胞群体中Teff细胞与Treg细胞之比至少为2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、50:1或100:1。在一些情况下，与分离并修饰的IL-2多肽一起孵育后，细胞群体中Teff细胞与Treg细胞之比约为2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、50:1或100:1。

[0272] 在一些情况下，所述足以诱导与IL-2Rβ形成复合物的时间至少为5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、8小时、10小时、12小时、18小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天或7天。在一些情况下，所述足以诱导与IL-2Rβ形成复合物的时间约为5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、8小时、10小时、12小时、18小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天或7天。

[0273] 在一些情况下，所述方法是体内方法。

[0274] 在一些情况下，所述方法是体外方法。

[0275] 在一些情况下，所述方法是离体方法。

细胞因子多肽的产生

[0276] 在一些情况下，包含天然氨基酸突变或非天然氨基酸突变的本文所述的细胞因子(例如，白介素、IFN或TNF)多肽是重组产生或化学合成的。在一些情况下，例如通过宿主细

胞系统或在无细胞系统中重组产生本文所述的细胞因子(例如,IL-2)多肽。

[0277] 在一些情况下,所述细胞因子(例如,IL-2)多肽通过宿主细胞系统重组产生。在一些情况下,该宿主细胞是真核细胞(例如,哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞或植物细胞)或原核细胞(例如,革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌)。在一些情况下,真核宿主细胞是哺乳动物宿主细胞。在一些情况下,哺乳动物宿主细胞是稳定的细胞系,或者是已将目的遗传物质并入其自身基因组中并具有在多代细胞分裂后表达该遗传物质产物的能力的细胞系。在其他情况下,哺乳动物宿主细胞是瞬时细胞系,或者是已将目的遗传物质并入其自身基因组中并且不具有在多代细胞分裂后表达该遗传物质产物的能力的细胞系。

[0278] 示例性的哺乳动物宿主细胞包括293T细胞系、293A细胞系、293FT细胞系、293F细胞、293H细胞、A549细胞、MDCK细胞、CHO DG44细胞、CHO-S细胞、CHO-K1细胞、Expi293F™细胞、Flp-In™ T-REx™ 293细胞系、Flp-In™-293细胞系、Flp-In™-3T3细胞系、Flp-In™-BHK细胞系、Flp-In™-CHO细胞系、Flp-In™-CV-1细胞系、Flp-In™-Jurkat细胞系、FreeStyle™ 293-F细胞、FreeStyle™ CHO-S细胞、GripTite™ 293MSR细胞系、GS-CHO细胞系、HepaRG™细胞、T-REx™ Jurkat细胞系、Per.C6细胞、T-REx™-293细胞系、T-REx™-CHO细胞系和T-REx™-HeLa细胞系。

[0279] 在一些实施方案中,真核宿主细胞是昆虫宿主细胞。示例性的昆虫宿主细胞包括果蝇S2细胞、Sf9细胞、Sf21细胞、High Five™细胞和expresSF+®细胞。

[0280] 在一些实施方案中,真核宿主细胞是酵母宿主细胞。示例性的酵母宿主细胞包括巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)酵母菌株,如GS115、KM71H、SMD1168、SMD1168H和X-33,以及酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)酵母菌株,如INVScl。

[0281] 在一些实施方案中,真核宿主细胞是植物宿主细胞。在一些情况下,该植物细胞包括来自藻类的细胞。示例性的植物细胞系包括来自莱茵衣藻(Chlamydomonas reinhardtii)137c或细长聚球藻(Synechococcus elongatus)PPC 7942的株。

[0282] 在一些实施方案中,宿主细胞是原核宿主细胞。示例性的原核宿主细胞包括BL21、Mach1™、DH10B™、TOP10、DH5α、DH10Bac™、OmniMax™、MegaX™、DH12S™、INV110、TOP10F'、INVαF、TOP10/P3、ccdB Survival、PIR1、PIR2、Stbl2™、Stbl3™或Stbl4™。

[0283] 在一些情况下,用于产生本文所述的IL-2多肽的合适的多核酸分子或载体包括来源于真核或原核来源的任何合适的载体。示例性的多核酸分子或载体包括来自细菌(例如大肠杆菌)、昆虫、酵母(例如巴斯德毕赤酵母)、藻类或哺乳动物来源的载体。细菌载体包括,例如,pACYC177、pASK75、pBAD载体系列、pBADM载体系列、pET载体系列、pETM载体系列、pGEX载体系列、pHAT、pHAT2、pMal-c2、pMal-p2、pQE载体系列、pRSET A、pRSET B、pRSET C、pTrcHis2系列、pZA31-Luc、pZE21-MCS-1、pFLAG ATS、pFLAG CTS、pFLAG MAC、pFLAG Shift-12c、pTAC-MAT-1、pFLAG CTC或pTAC-MAT-2。

[0284] 昆虫载体包括,例如,pFastBac1、pFastBac DUAL、pFastBac ET、pFastBac HTa、pFastBac HTb、pFastBac HTc、pFastBac M30a、pFastBact M30b、pFastBac、M30c、pVL1392、pVL1393、pVL1393 M10、pVL1393M11、pVL1393 M12、FLAG载体如pPolh-FLAG1或pPolh-MAT2,或者MAT载体如pPolh-MAT1或pPolh-MAT2。

[0285] 酵母载体包括,例如,Gateway® pDEST™ 14载体、Gateway® pDEST™ 15载体、

Gateway® pDEST™ 17载体、Gateway® pDEST™ 24载体、Gateway® pYES-DEST52载体、pBAD-DEST49 Gateway® 目的载体、pAO815毕赤酵母载体、pFLD1巴斯德毕赤酵母载体、pGAPZA,B,&C巴斯德毕赤酵母载体、pPIC3.5K毕赤酵母载体、pPIC6 A、B和C毕赤酵母载体、pPIC9K毕赤酵母载体、pTEF1/Zeo、pYES2酵母载体、pYES2/CT酵母载体、pYES2/NT A、B和C酵母体或pYES3/CT酵母载体。

[0286] 藻类载体包括,例如,pChlamy-4载体或MCS载体。

[0287] 哺乳动物载体包括,例如,瞬时表达载体或稳定表达载体。示例性的哺乳动物瞬时表达载体包括p3xFLAG-CMV 8、pFLAG-Myc-CMV19、pFLAG-Myc-CMV 23、pFLAG-CMV 2、pFLAG-CMV 6a,b,c、pFLAG-CMV 5.1、pFLAG-CMV 5a,b,c、p3xFLAG-CMV 7.1、pFLAG-CMV 20、p3xFLAG-Myc-CMV 24、pCMV-FLAG-MAT1、pCMV-FLAG-MAT2、pBICEP-CMV 3或pBICEP-CMV 4。示例性的哺乳动物稳定表达载体包括pFLAG-CMV 3、p3xFLAG-CMV 9、p3xFLAG-CMV 13、pFLAG-Myc-CMV 21、p3xFLAG-Myc-CMV 25、pFLAG-CMV 4、p3xFLAG-CMV 10、p3xFLAG-CMV 14、pFLAG-Myc-CMV 22、p3xFLAG-Myc-CMV 26、pBICEP-CMV 1或pBICEP-CMV 2。

[0288] 在一些情况下,无细胞系统用于产生本文所述的细胞因子(例如,IL-2)多肽。在一些情况下,无细胞系统包含来自细胞的细胞质和/或细胞核组分的混合物,并且适用于体外核酸合成。在一些情况下,无细胞系统利用原核细胞组分。在其他情况下,无细胞系统利用真核细胞组分。核酸合成是在基于例如果蝇细胞、爪蟾卵、古菌或HeLa细胞的无细胞系统中获得的。示例性的无细胞系统包括大肠杆菌S30 Extract系统、大肠杆菌T7 S30系统或PURExpress®、XpressCF和XpressCF+。

[0289] 无细胞翻译系统各不相同地包含组分,如质粒、mRNA、DNA、tRNA、合成酶、释放因子、核糖体、伴侣蛋白、翻译起始和延伸因子、天然和/或非天然氨基酸和/或用于蛋白质表达的其他组分。任选地修饰这类组分以提高产率、增加合成速率、增加蛋白质产物的保真度或掺入非天然氨基酸。在一些实施方案中,本文所述的细胞因子是使用US 8,778,631、US 2017/0283469、US 2018/0051065、US 2014/0315245或US 8,778,631中描述的无细胞翻译系统合成的。在一些实施方案中,无细胞翻译系统包含修饰的释放因子,乃至从系统中去除一种或多种释放因子。在一些实施方案中,无细胞翻译系统包含降低的蛋白酶浓度。在一些实施方案中,无细胞翻译系统包含修饰的tRNA,其具有重新分配的用来编码非天然氨基酸的密码子。在一些实施方案中,本文所述的用于掺入非天然氨基酸的合成酶在无细胞翻译系统中使用。在一些实施方案中,在将tRNA添加到无细胞翻译系统之前,使用酶促或化学方法向该tRNA预先加载非天然氨基酸。在一些实施方案中,用于无细胞翻译系统的组分获自修饰的生物体,如修饰的细菌、酵母或其他生物体。

[0290] 在一些实施方案中,经由表达宿主系统或通过无细胞系统,以环状排列的形式生成细胞因子(例如,IL-2)多肽。

包含非天然氨基酸的细胞因子多肽的产生

[0291] 可以在本公开中使用正交或扩展的遗传密码,其中将存在于细胞因子(例如,IL-2)多肽的核酸序列中的一个或多个特定密码子分配以编码非天然氨基酸,使得可以通过使用正交tRNA合成酶/tRNA对将其遗传掺入到细胞因子(例如,IL-2)中。该正交tRNA合成酶/tRNA对能够使tRNA加载非天然氨基酸,并且能够响应于密码子将该非天然氨基酸掺入多肽

链中。

[0292] 在一些情况下,所述密码子是琥珀、赭石、卵白石密码子或四联密码子。在一些情况下,该密码子对应于将用来携带非天然氨基酸的正交tRNA。在一些情况下,该密码子是琥珀密码子。在其他情况下,该密码子是正交密码子。

[0293] 在一些情况下,所述密码子是四联密码子,其可以被正交核糖体ribo-Q1解码。在一些情况下,该四联密码子如Neumann等人,"Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome,"Nature,464(7287):441-444(2010)中所述。

[0294] 在一些情况下,本公开中使用的密码子是重新编码的密码子,例如,同义密码子或用替代密码子替换的稀有密码子。在一些情况下,重新编码的密码子如Napolitano等人,"Emergent rules for codon choice elucidated by editing rare argine codons in Escherichia coli,"PNAS,113(38):E5588-5597(2016)所述。在一些情况下,重新编码的密码子如Ostrov等人,"Design,synthesis,and testing toward a 57-codon genome,"Science 353(6301):819-822(2016)所述。

[0295] 在一些情况下,使用非天然核酸,从而导致向细胞因子(例如IL-2)中掺入一个或多个非天然氨基酸。示例性的非天然核酸包括但不限于尿嘧啶-5-基、次黄嘌呤-9-基(I)、2-氨基腺嘌呤-9-基、5-甲基胞嘧啶(5-me-C),5-羟甲基胞嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,2-氨基腺嘌呤,腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其他烷基衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物,2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶,5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶,5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶,6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫尿嘧啶,8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代(尤其是5-溴)、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤,8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤,以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。某些非天然核酸,如5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2取代的嘌呤、N-6取代的嘌呤、O-6取代的嘌呤、2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、提高双链体形成的稳定性的那些非天然核酸、通用核酸、疏水性核酸、混杂核酸、大小扩展的核酸、氟化核酸、5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶(5-me-C),5-羟甲基胞嘧啶,黄嘌呤,次黄嘌呤,2-氨基腺嘌呤,腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基、其他烷基衍生物,腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物,2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶,5-卤代尿嘧啶,5-卤代胞嘧啶,5-丙炔基($-C\equiv C-CH_3$)尿嘧啶,5-丙炔基胞嘧啶,嘧啶核酸的其他炔基衍生物,6-偶氮尿嘧啶,6-偶氮胞嘧啶,6-偶氮胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶),4-硫尿嘧啶,8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤代(尤其是5-溴)、5-三氟甲基、其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶,7-甲基鸟嘌呤,7-甲基腺嘌呤,2-F-腺嘌呤,2-氨基-腺嘌呤,8-氮杂鸟嘌呤,8-氮杂腺嘌呤,7-脱氮鸟嘌呤,7-脱氮腺嘌呤,3-脱氮鸟嘌呤,3-脱氮腺嘌呤,三环嘧啶,吩噁嗪胞苷([5,4-b][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮),吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮),G-夹,吩噁嗪胞苷(例如9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮),咔唑胞苷(2H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-2-酮),吡啶并吲哚胞苷(H-吡啶并[3',2':4,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮),其中嘌呤或嘧

啶碱基被其他杂环替代的那些,7-脱氮-腺嘌呤,7-脱氮鸟苷,2-氨基吡啶,2-吡啶酮,氮杂胞嘧啶,5-溴胞嘧啶,溴尿嘧啶,5-氯胞嘧啶,氯化胞嘧啶,环胞嘧啶,阿糖胞苷,5-氟胞嘧啶,氟嘧啶,氟尿嘧啶,5,6-二氢胞嘧啶,5-碘胞嘧啶,羟基脲,碘尿嘧啶,5-硝基胞嘧啶,5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-氟尿嘧啶和5-碘尿嘧啶,2-氨基-腺嘌呤,6-硫代-鸟嘌呤,2-硫代-胸腺嘧啶,4-硫代-胸腺嘧啶,5-丙炔基-尿嘧啶,4-硫代-尿嘧啶,N4-乙基胞嘧啶,7-脱氮鸟嘌呤,7-脱氮-8-氮杂鸟嘌呤,5-羟基胞嘧啶,2'-脱氧尿苷,2-氨基-2'-脱氧腺苷,以及在下列文件中描述的那些:美国专利3,687,808;4,845,205;4,910,300;4,948,882;5,093,232;5,130,302;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121;5,596,091;5,614,617;5,645,985;5,681,941;5,750,692;5,763,588;5,830,653和6,005,096;WO 99/62923;Kandimalla等人,(2001)Bioorg.Med.Chem.9:807-813;The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering,Kroschwitz,J.I.,编,John Wiley&Sons,1990,858-859;Englisch等人,Angewandte Chemie,International Edition,1991,30,613;以及Sanghvi,第15章,Antisense Research and Applications,Crookeand Lebleu Eds.,CRC Press,1993,273-288。其他碱基修饰可见于,例如,美国专利3,687,808;Englisch等人,Angewandte Chemie,International Edition,1991,30,613;和Sanghvi,第15章,Antisense Research and Applications,第289-302页,Crooke and Lebleu编,CRC Press,1993。

[0296] 包含各种杂环碱基和各种糖部分(和糖类似物)的非天然核酸是本领域可得到的,并且在一些情况下,所述核酸包含一种或数种不同于天然存在的核酸的主要五碱基组分的杂环碱基。例如,在一些情况下,该杂环碱基包括尿嘧啶-5-基、胞嘧啶-5-基、腺嘌呤-7-基、腺嘌呤-8-基、鸟嘌呤-7-基、鸟嘌呤-8-基、4-氨基吡咯并[2.3-d]嘧啶-5-基、2-氨基-4-氧代吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基、2-氨基-4-氧代吡咯并[2.3-d]嘧啶-3-基基团,其中嘌呤通过9-位,嘧啶通过1-位,吡咯并嘧啶通过7-位而吡唑并嘧啶通过1-位连接至核酸的糖部分。

[0297] 在一些实施方案中,核苷酸类似物也在磷酸部分被修饰。修饰的磷酸部分包括但不限于那些在两个核苷酸之间的连接处具有修饰的磷酸部分,并且含有,例如,硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基膦酸酯(包括3'-亚烷基膦酸酯和手性膦酸酯)、次膦酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫逐氨基磷酸酯、硫逐烷基膦酸酯、硫逐烷基磷酸三酯和硼烷磷酸酯。应当理解,两个核苷酸之间的这些磷酸酯或修饰的磷酸酯键是通过3'-5'键或2'-5'键,并且该键含有颠倒的极性,如3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'。也包括各种盐、混合盐和游离酸形式。许多美国专利教导了如何制备和使用含有修饰的磷酸酯的核苷酸,包括但不限于3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;和5,625,050。

[0298] 在一些实施方案中,非天然核酸包括2',3'-双脱氧-2',3'-双脱氢-核苷(PCT/US2002/006460)、5'-取代的DNA和RNA衍生物(PCT/US2011/033961;Saha等人,J.Org Chem.,1995,60,788-789;Wang等人,Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters,1999,9,

885-890;和Mikhailov等人,Nucleosides&Nucleotides,1991,10(1-3),339-343;Leonid等人,1995,14(3-5),901-905;和Eppacher等人,Helvetica Chimica Acta,2004,87,3004-3020;PCT/JP2000/004720;PCT/JP2003/002342;PCT/JP2004/013216;PCT/JP2005/020435;PCT/JP2006/315479;PCT/JP2006/324484;PCT/JP2009/056718;PCT/JP2010/067560),或制备成具有修饰碱基的单磷酸的5'-取代的单体(Wang等人,Nucleosides Nucleotides& Nucleic Acids,2004,23(1&2),317-337)。

[0299] 在一些实施方案中,非天然核酸在糖环的5'-位和2'-位包含修饰(PCT/US94/02993),如5'-CH_2-取代的2'-O保护的核苷(Wu等人,Helvetica Chimica Acta,2000,83,1127-1143和Wu等人,Bioconjugate Chem.1999,10,921-924)。在一些情况下,非天然核酸包括已准备好掺入到寡核苷酸中的酰胺连接的核苷二聚体,其中该二聚体中的3'连接的核苷(5'至3')包含2'-OCH_3和5'-(S)-CH_3(Mesmaeker等人,Synlett,1997,1287-1290)。非天然核酸可以包括2'-取代的5'-CH_2(或O)修饰的核苷(PCT/US92/01020)。非天然核酸可以包括5'-亚甲基膦酸DNA和RNA单体,以及二聚体(Bohringer等人,Tet.Lett.,1993,34,2723-2726;Collingwood等人,Synlett,1995,7,703-705;和Hutter等人,Helvetica Chimica Acta,2002,85,2777-2806)。非天然核酸可以包括具有2'-取代的5'-膦酸单体(US2006/0074035)和其他修饰的5'-膦酸单体(WO1997/35869)。非天然核酸可以包括5'-修饰的亚甲基膦酸单体(EP614907和EP629633)。非天然核酸可以包括在5'和6'位包含羟基的5'或6'-膦酸核糖核苷的类似物(Chen等人,Phosphorus,Sulfur and Silicon,2002,777,1783-1786;Jung等人,Bioorg.Med.Chem.,2000,8,2501-2509;Gallier等人,Eur.J.Org.Chem.,2007,925-933;和Hampton等人,J.Med.Chem.,1976,19(8),1029-1033)。非天然核酸可以包括5'-膦酸脱氧核糖核苷单体和具有5'-磷酸基团的二聚体(Nawrot等人,Oligonucleotides,2006,16(1),68-82)。非天然核酸可以包括具有6'-膦酸基团的核苷,其中5'或/和6'-位未被取代或被硫代叔丁基(SC(CH_3)$_3$)(及其类似物)、亚甲基氨基(CH_2NH_2)(及其类似物)或氰基(CN)(及其类似物)取代(Fairhurst等人,Synlett,2001,4,467-472;Kappler等人,J.Med.Chem.,1986,29,1030-1038;Kappler等人,J.Med.Chem.,1982,25,1179-1184;Vrudhula等人,J.Med.Chem.,1987,30,888-894;Hampton等人,J.Med.Chem.,1976,19,1371-1377;Geze等人,J.Am.Chem.Soc,1983,105(26),7638-7640;和Hampton等人,J.Am.Chem.Soc,1973,95(13),4404-4414)。

[0300] 在一些实施方案中,非天然核酸还包括糖部分的修饰。在一些情况下,核酸含有一种或多种其中糖基团已被修饰的核苷。此类糖修饰的核苷可赋予增强的核酸酶稳定性、提高的结合亲和力或一些其他有益的生物学性质。在某些实施方案中,核酸包含化学修饰的呋喃核糖环部分。化学修饰的呋喃核糖环的实例包括但不限于添加取代基(包括5'和/或2'取代基);桥接两个环原子以形成双环核酸(BNA);用S、N(R)或C(R_1)(R_2)(R=H、C_1-C_{12}烷基或保护基团)替代核糖基环的氧原子;及其组合。化学修饰的糖的实例可见于WO2008/101157、US2005/0130923和WO2007/134181。

[0301] 在一些情况下,修饰的核酸包含修饰的糖或糖类似物。因此,除了核糖和脱氧核糖外,糖部分还可以是戊糖、脱氧戊糖、己糖、脱氧己糖、葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖或糖"类似物"环戊基。该糖可以是吡喃糖基或呋喃糖基形式。糖部分可以是核糖、脱氧核糖、阿拉伯糖或2'-O-烷基核糖的呋喃糖苷,并且该糖可以以[α]或[β]异头构型连接至相应的杂

环碱基。糖修饰包括但不限于2'-烷氧基-RNA类似物、2'-氨基-RNA类似物、2'-氟-DNA和2'-烷氧基-或氨基-RNA/DNA嵌合体。例如，糖修饰可以包括2'-O-甲基-尿苷或2'-O-甲基-胞苷。糖修饰包括2'-O-烷基取代的脱氧核糖核苷和2'-O-乙二醇样核糖核苷。这些糖或糖类似物以及其中这些糖或类似物连接至杂环碱基(核酸碱基)的相应"核苷"的制备是已知的。也可以进行糖修饰并将其与其他修饰组合。

[0302] 对糖部分的修饰包括核糖和脱氧核糖的天然修饰以及非天然修饰。糖修饰包括但不限于在2'位的以下修饰:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O-烷基-O-烷基，其中该烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的C_1至C_{10}烷基或C_2至C_{10}烯基和炔基。2'糖修饰还包括但不限于-O[$(CH_2)_nO]_m$ CH_3、-O$(CH_2)_nOCH_3$、-O$(CH_2)_nNH_2$、-O$(CH_2)_nCH_3$、-O$(CH_2)_nONH_2$和-O$(CH_2)_nON[(CH_2)_n$ $CH_3)]_2$，其中n和m为1至约10。

[0303] 在2'位的其他修饰包括但不限于:C_1至C_{10}低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基、O-芳烷基、SH、SCH_3、OCN、Cl、Br、CN、CF_3、OCF_3、$SOCH_3$、SO_2 CH_3、ONO_2、NO_2、N_3、NH_2、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA裂解基团、报告基团、嵌入剂、用于改善寡核苷酸的药代动力学性质的基团，或用于改善寡核苷酸的药效学性质的基团，以及具有类似性质的其他取代基。也可以在糖上的其他位置进行类似的修饰，特别是在3'末端核苷酸上或2'-5'连接的寡核苷酸中的糖的3'位置，以及5'末端核苷酸的5'位置。修饰的糖还包括在诸如CH_2和S的桥接环氧处含有修饰那些糖。核苷酸糖类似物也可以具有代替呋喃戊糖基糖的糖模拟物，如环丁基部分。有许多美国专利教导了此类修饰的糖结构的制备，并且详述且描述了一系列碱基修饰，如美国专利4,981,957;5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633;4,845,205;5,130,302;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121,5,596,091;5,614,617;5,681,941;和5,700,920，其中每一个均通过引用整体并入本文。

[0304] 具有修饰的糖部分的核酸的实例包括但不限于包含5'-乙烯基、5'-甲基(R或S)、4'-S、2'-F、2'-OCH_3和2'-O$(CH_2)_2OCH_3$取代基的核酸。在2'位的取代基也可以选自烯丙基、氨基、叠氮基、硫代、O-烯丙基、O-(C_1-C_{10}烷基)、OCF_3、O$(CH_2)_2SCH_3$、O$(CH_2)_2$-O-N(R_m)(R_n)和O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)，其中每个R_m和R_n独立地为H或取代或未取代的C_1-C_{10}烷基。

[0305] 在某些实施方案中，本文所述的核酸包括一种或多种双环核酸。在某些这样的实施方案中，该双环核酸在4'核糖基环原子与2'核糖基环原子之间包含桥。在某些实施方案中，本文提供的核酸包括一种或多种双环核酸，其中该桥包含4'至2'双环核酸。这类4'至2'双环核酸的实例包括但不限于下式之一:4'-(CH_2)-O-2'(LNA);4'-(CH_2)-S-2';4'-$(CH_2)_2$-O-2'(ENA);4'-CH(CH_3)-O-2'和4'-CH(CH_2OCH_3)-O-2'及其类似物(参见美国专利7,399,845);4'-C(CH_3) (CH_3)-O-2'及其类似物(参见WO2009/006478、WO2008/150729、US2004/0171570、美国专利7,427,672、Chattopadhyaya等人,J.Org.Chem.,209,74,118-134和WO2008/154401)。还参见，例如:Singh等人,Chem.Commun.,1998,4,455-456;Koshkin等人,Tetrahedron,1998,54,3607-3630;Wahlestedt等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,2000,97,5633-5638;Kumar等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1998,8,2219-2222;Singh等人,

J.Org.Chem.,1998,63,10035-10039;Srivastava等人,J.Am.Chem.Soc.,2007,129(26)8362-8379;Elayadi等人,Curr.Opinion Invens.Drugs,2001,2,558-561;Braasch等人,Chem.Biol,2001,8,1-7;Oram等人,Curr.Opinion Mol.Ther.,2001,3,239-243;美国专利4,849,513;5,015,733;5,118,800;5,118,802;7,053,207;6,268,490;6,770,748;6,794,499;7,034,133;6,525,191;6,670,461;和7,399,845;国际公开WO2004/106356、WO1994/14226、WO2005/021570、WO2007/090071和WO2007/134181;美国专利公开US2004/0171570、US2007/0287831和US2008/0039618;美国临时申请60/989,574、61/026,995、61/026,998、61/056,564、61/086,231、61/097,787和61/099,844;以及国际申请PCT/US2008/064591、PCT US2008/066154、PCT US2008/068922和PCT/DK98/00393。

[0306] 在某些实施方案中,核酸包含连接的核酸。核酸可以使用任何核酸间键连接在一起。核酸间连接基团的两个主要类别由磷原子的存在或不存在来定义。代表性的含磷的核酸间键包括但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、甲基膦酸酯、氨基磷酸酯和硫代磷酸酯(P=S)。代表性的不含磷的核酸间连接基团包括但不限于亚甲基甲基亚氨基(-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-)、硫代二酯(-OC(O)-S-)、硫逐氨基甲酸酯(-O-C(O)(NH)-S-)、硅氧烷(-O-Si(H)$_2$-O-)和N,N*-二甲基肼(-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3))。在某些实施方案中,具有手性原子的核酸间键可被制备为外消旋混合物、单独的对映异构体,例如烷基膦酸酯和硫代磷酸酯。非天然核酸可以含有单个修饰。非天然核酸可在一个部分内或不同部分之间含有多个修饰。

[0307] 对核酸的骨架磷酸修饰包括但不限于甲基膦酸酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯(桥连或非桥连)、磷酸三酯、二硫代磷酸酯、phosphodithioate和硼烷磷酸酯,并且可以以任何组合使用。也可以使用其他非磷酸酯键。

[0308] 在一些实施方案中,骨架修饰(例如,甲基膦酸酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯和二硫代磷酸酯核苷酸间键)可以赋予修饰的核酸以免疫调节活性并且/或者增强其在体内的稳定性。

[0309] 在一些情况下,磷衍生物(或修饰的磷酸基团)连接至糖或糖类似物部分,并且可以是一磷酸、二磷酸、三磷酸、烷基膦酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、氨基磷酸酯等。含有修饰的磷酸酯键或非磷酸酯键的示例性多核苷酸可见于Peyrottes等人,1996,Nucleic Acids Res.24:1841-1848;Chaturvedi等人,1996,Nucleic Acids Res.24:2318-2323;和Schultz等人,(1996)Nucleic Acids Res.24:2966-2973;Matteucci,1997,“Oligonucleotide Analogs:an Overview”in Oligonucleotides as Therapeutic Agents,(Chadwick和Cardew编)John Wiley and Sons,New York,NY;Zon,1993,“Oligonucleoside Phosphorothioates”in Protocols for Oligonucleotides and Analogs,Synthesis and Properties,Humana Press,pp.165-190;Miller等人,1971,JACS 93:6657-6665;Jager等人,1988,Biochem.27:7247-7246;Nelson等人,1997,JOC 62:7278-7287;美国专利5,453,496;和Micklefield,2001,Curr.Med.Chem.8:1157-1179。

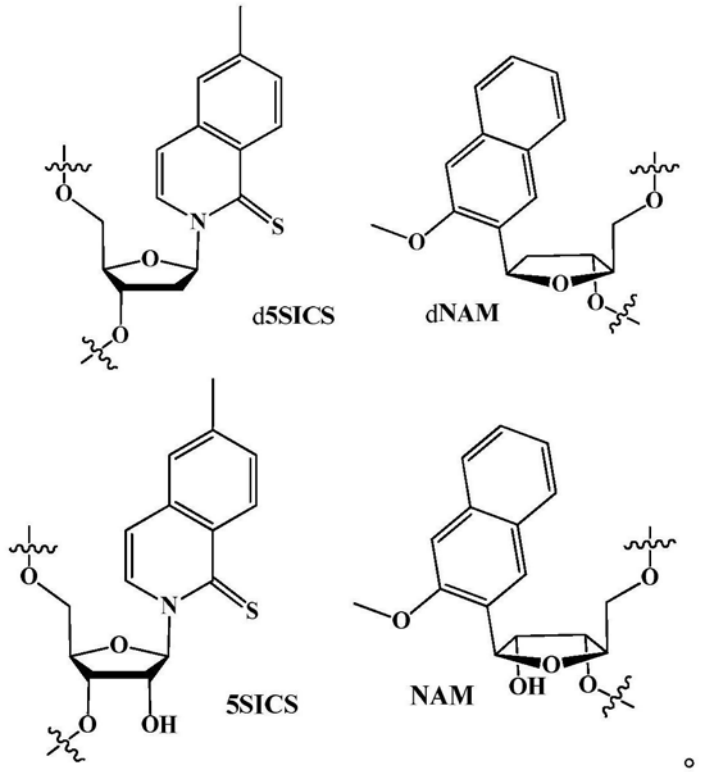
[0310] 在一些情况下,骨架修饰包括用替代部分如阴离子、中性或阳离子基团代替磷酸二酯键。此类修饰的实例包括:阴离子核苷间键;N3’至P5’氨基磷酸酯修饰;硼酸磷酸酯DNA;原寡核苷酸(prooligonucleotide);中性核苷间键,如甲基膦酸酯;酰胺连接的DNA;亚甲基(甲基亚氨基)键;甲乙缩醛(formacetal)和硫代甲乙缩醛(thioformacetal)键;含有磺酰基的骨架;吗啉代寡核苷酸;肽核酸(PNA);和带正电荷的脱氧核糖核酸胍(DNG)寡核苷

酸(Micklefield,2001,Current Medicinal Chemistry 8:1157-1179)。修饰的核酸可以包含嵌合或混合的骨架,该骨架包含一种或多种修饰,例如磷酸酯键的组合,如磷酸二酯键和硫代磷酸酯键的组合。

[0311] 针对磷酸的取代物包括例如短链烷基或环烷基核苷间键、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间键,或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键。这些包括具有吗啉基键的那些(部分由核苷的糖部分形成);硅氧烷骨架;硫化物、亚砜和砜骨架;甲乙酰基(formacetyl)和硫代甲乙酰基骨架;亚甲基甲乙酰基和硫代甲乙酰基骨架;含烯烃的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚氨基和亚甲基肼基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架;和其他具有混合N、O、S和CH_2组成部分的取代物。许多美国专利公开了如何制备和使用这些类型的磷酸替代,并且包括但不限于美国专利5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,264,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,610,289;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;和5,677,439。还应理解,在核苷酸取代物中,核苷酸的糖和磷酸部分都可以被例如酰胺型键(氨基乙基甘氨酸)(PNA)替代。美国专利5,539,082、5,714,331和5,719,262教导了如何制备和使用PNA分子,其中每一个均通过引用并入本文。还参见Nielsen等人,Science,1991,254,1497-1500。还可能将其他类型的分子(缀合物)连接至核苷酸或核苷酸类似物,以增强例如细胞摄取。缀合物可以化学连接至核苷酸或核苷酸类似物。这类缀合物包括但不限于脂质部分,如胆固醇部分(Letsinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1989,86,6553-6556),胆酸(Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Let.,1994,4,1053-1060),硫醚,例如己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人,Ann.KY.Acad.Sci.,1992,660,306-309;Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Let.,1993,3,2765-2770),硫代胆固醇(Oberhauser等人,Nucl.Acids Res.,1992,20,533-538),脂族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人,EM5OJ,1991,10,1111-1118;Kabanov等人,FEBS Lett.,1990,259,327-330;Svinarchuk等人,Biochimie,1993,75,49-54),磷脂,例如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙铵1-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-S-H-膦酸酯(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36,3651-3654;Shea等人,Nucl.Acids Res.,1990,18,3777-3783),多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人,Nucleosides&Nucleotides,1995,14,969-973),或金刚烷乙酸(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36,3651-3654)、棕榈基部分(Mishra等人,Biochem.Biophys.Acta,1995,1264,229-237),或十八烷基胺或己基氨基-羰基-氧基胆固醇部分(Crooke等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277,923-937)。许多美国专利教导了这类缀合物的制备,并且包括但不限于美国专利4,828,979;4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717;5,580,731;5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241;5,391,723;5,416,203;5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,

599,923;5,599,928和5,688,941。

[0312] 在一些情况下,所述非天然核酸进一步形成非天然碱基对。能够在体内条件下形成非天然DNA或RNA碱基对(UBP)的示例性非天然核苷酸包括但不限于5SICS、d5SICS、NAM、dNaM及其组合。在一些实施方案中,非天然核苷酸包括:



。

[0313] 在一些实施方案中,非天然碱基对生成Dumas等人,"Designing logical codon reassignment-Expanding the chemistry in biology,"Chemical Science,6:50-69(2015)描述的非天然氨基酸。

[0314] 将引入了本文公开的构建体或载体的宿主细胞在合适的培养基中培养或维持,从而产生tRNA、tRNA合成酶和目的蛋白质。该培养基还包含非天然氨基酸,使得目的蛋白质中掺入非天然氨基酸。

[0315] 正交tRNA合成酶/tRNA对使tRNA加载非天然氨基酸,并且响应于密码子将该非天然氨基酸掺入多肽链中。示例性的aaRS-tRNA对包括但不限于詹氏甲烷球菌(Methanococcus jannaschii)(Mj-Tyr)aaRS/tRNA对、大肠杆菌TyrRS(Ec-Tyr)/嗜热脂肪芽孢杆菌(B.stearothermophilus)$tRNA_{CUA}$对、大肠杆菌LeuRS(Ec-Leu)/嗜热脂肪芽孢杆菌$tRNA_{CUA}$对和吡咯赖氨酰-tRNA对。

[0316] 通过向宿主细胞中引入本文所述的包含tRNA和tRNA合成酶并包含具有一个或多个框内正交(终止)密码子的目的核酸序列的核酸构建体,来制备包含非天然氨基酸的细胞因子(例如,IL-2)多肽。将该宿主细胞暴露于包含非天然氨基酸的生理溶液,然后将该宿主细胞维持在允许表达目的蛋白质编码序列的条件下。响应于密码子,该非天然氨基酸掺入多肽链中。例如,一个或多个非天然氨基酸掺入细胞因子(例如,IL-2)多肽中。或者,两个或更多个非天然氨基酸可以在蛋白质的两个或更多个位点处掺入细胞因子(例如,IL-2)多肽中。

[0317] 当将多个非天然氨基酸掺入细胞因子(例如,IL-2)多肽中时,应当理解,需要将多个密码子引入编码核酸序列的所需位置,以使tRNA合成酶/tRNA对可以指导非天然氨基酸响应于密码子的掺入。可以将至少1、2、3、4个或更多个密码子编码核酸掺入目的核酸序列中。

[0318] 当期望将超过一种类型的非天然氨基酸掺入目的蛋白质的单个蛋白质中时,可以使用第二或另外的正交tRNA-tRNA合成酶对掺入第二或另外的非天然氨基酸;适当地,所述第二或另外的正交tRNA-tRNA合成酶对识别编码目的蛋白质的核酸中的不同密码子,使得可以在单个制备步骤中将所述两个或更多个非天然氨基酸特异性地掺入该蛋白质中的不同限定位点。在某些实施方案中,因此可以使用两个或更多个正交tRNA-tRNA合成酶对。

[0319] 一旦在宿主细胞中产生了掺入非天然氨基酸的细胞因子(例如,IL-2)多肽,就可以通过本领域已知的多种技术,包括酶促、化学和/或渗透裂解和物理破坏,从其中进行提取。可以通过本领域已知的标准技术,如制备型色谱法、亲和纯化或其他任何合适的技术,来纯化所述细胞因子(例如,IL-2)多肽。

[0320] 合适的宿主细胞可以包括细菌细胞(例如大肠杆菌),但是最合适的宿主细胞是真核细胞,例如昆虫细胞(例如果蝇,如黑腹果蝇(Drosophila melanogaster)、酵母细胞、线虫(例如秀丽隐杆线虫(C.elegans))、小鼠(例如小家鼠(Mus musculus))或哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或COS细胞、人293T细胞、HeLa细胞、NIH 3T3细胞和小鼠红白血病(MEL)细胞)或人细胞或其他真核细胞。其他合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。适当地,该宿主细胞是哺乳动物细胞——如人细胞或昆虫细胞。

[0321] 通常可以在本发明的实施方案中使用的其他合适的宿主细胞是在实施例部分中提到的那些细胞。可以通过常规转化或转染技术将载体DNA引入宿主细胞中。如本文所用的,术语“转化”和“转染”旨在表示用于将外来核酸分子(例如,DNA)引入宿主细胞中的多种公认的技术,包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质转染或电穿孔。转化或转染宿主细胞的合适的方法是本领域公知的。

[0322] 当创建细胞系时,通常优选制备稳定的细胞系。例如,对于哺乳动物细胞的稳定转染,已知根据所使用的表达载体和转染技术,只有一小部分细胞可以将外源DNA整合到其基因组中。为了鉴定和选择这些整合体,通常将编码选择性标记(例如,对抗生素的抗性)的基因与目的基因一起引入宿主细胞中。优选的选择性标记包括赋予对诸如G418、潮霉素或氨甲蝶呤等药物的抗性的选择性标记。可以将编码选择性标记的核酸分子在相同载体上引入宿主细胞中,或者可以在分开的载体上引入。可以通过药物选择来鉴定被引入的核酸分子稳定转染的细胞(例如,掺入了选择性标记基因的细胞将存活,而其他细胞则死亡)。

[0323] 在一个实施方案中,本文所述的构建体被整合到宿主细胞的基因组中。稳定整合的一个优点是可以实现各个细胞或克隆之间的均匀性。另一个优点是可以进行最佳生产者的选择。因此,期望创建稳定的细胞系。在另一个实施方案中,本文所述的构建体被转染到宿主细胞中。将构建体转染到宿主细胞中的优点是蛋白质产率可以最大化。在一个方面,描述了包含本文所述的核酸构建体或载体的细胞。

药物组合物和制剂

[0324] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物和制剂通过多种给药途径施用于受试者,所述途径包括但不限于肠胃外、口服、颊部、直肠、舌下或透皮给药途径。在一些情况下,

肠胃外给药包括静脉内、皮下、肌肉内、脑内、鼻内、动脉内、关节内、皮内、玻璃体内、骨内输注、腹膜内或鞘内(intratechal)给药。在一些情况下,该药物组合物被配制用于局部给药。在其他情况下,该药物组合物被配制用于全身给药。

[0325] 在一些实施方案中,所述药物制剂包括但不限于水性液体分散体、自乳化分散体、固溶体、脂质体分散体、气雾剂、固体剂型、粉末、立即释放制剂、控制释放制剂、速熔制剂、片剂、胶囊、丸剂、延迟释放制剂、延长释放制剂、脉冲释放制剂、多颗粒制剂(例如纳米颗粒制剂)以及立即释放和控制释放混合型制剂。

[0326] 在一些实施方案中,所述药物制剂包含基于与本文公开的组合物的相容性和所需剂型的释放谱特性而选择的载体或载体材料。示例性的载体材料包括,例如粘合剂、悬浮剂、崩解剂、填充剂、表面活性剂、增溶剂、稳定剂、润滑剂、湿润剂、稀释剂等。药学上相容的载体材料包括但不限于阿拉伯胶、明胶、胶态二氧化硅、甘油磷酸钙、乳酸钙、麦芽糖糊精、甘油、硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、胆固醇、胆固醇酯、酪蛋白酸钠、大豆卵磷脂、牛磺胆酸、磷脂酰胆碱、氯化钠、磷酸三钙、磷酸二钾、纤维素和纤维素缀合物、糖、硬脂酰乳酸钠、角叉菜胶、甘油单酯、甘油二酯、预胶化淀粉等。参见,例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第十九版(Easton,Pa.:Mack Publishing Company,1995),Hoover,John E.,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pennsylvania 1975,Liberman,H.A.和Lachman,L.编,Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Decker,New York,N.Y.,1980,以及Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第七版(Lippincott Williams&Wilkins1999)。

[0327] 在一些情况下,所述药物组合物被配制成免疫脂质体,其包含直接或间接地与脂质体的脂双层结合的多个IL-2缀合物。示例性的脂质包括但不限于脂肪酸;磷脂;固醇,如胆固醇;鞘脂,如鞘磷脂;糖鞘脂,如神经节苷脂、红细胞糖苷脂(globocide)和脑苷脂;表面活性胺,如硬脂胺、油胺和亚油胺。在一些情况下,该脂质包括阳离子脂质。在一些情况下,该脂质包括磷脂。示例性的磷脂包括但不限于磷脂酸(“PA”)、磷脂酰胆碱(“PC”)、磷脂酰甘油(“PG”)、磷脂酰乙醇胺(“PE”)、磷脂酰肌醇(“PI”)和磷脂酰丝氨酸(“PS”)、鞘磷脂(包括脑鞘磷脂)、卵磷脂、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、脑苷脂、二花生四烯酰基磷脂酰胆碱(“DAPC”)、二癸酰基-L-α-磷脂酰胆碱(“DDPC”)、二反油酰基酰磷脂酰胆碱(“DEPC”)、二月桂酰基磷脂酰胆碱(“DLPC”)、二亚油酰基磷脂、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(“DMPC”)、二油酰基磷脂酰胆碱(“DOPC”)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(“DPPC”)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(“DSPC”)、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱(“POPC”)、二花生酰基磷脂酰甘油(“DAPG”)、二癸酰基-L-α-磷脂酰甘油(“DDPG”)、二反油酰基磷脂酰甘油(“DEPG”)、二月桂酰基磷脂酰甘油(“DLPG”)、二亚油酰基磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油(“DMPG”)、二油酰基磷脂酰甘油(“DOPG”)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(“DPPG”)、二硬脂酰基磷脂酰甘油(“DSPG”)、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰甘油(“POPG”)、二花生酰基磷脂酰乙醇胺(“DAPE”)、二癸酰基-L-α-磷脂酰乙醇胺(“DDPE”)、二反油酰基磷脂酰乙醇胺(“DEPE”)、二月桂酰基磷脂酰乙醇胺(“DLPE”)、二亚油酰基磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(“DMPE”)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(“DOPE”)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(“DPPE”)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(“DSPE”)、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(“POPE”)、二花生酰基磷脂酰肌醇(“DAPI”)、二癸酰基-L-α-磷脂酰肌醇(“DDPI”)、二反油酰基磷脂酰肌醇(“DEPI”)、二月桂

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

[0328] 在一些情况下,所述药物制剂进一步包含pH调节剂或缓冲剂,其包括酸,如乙酸、硼酸、柠檬酸、乳酸、磷酸和盐酸;碱,如氢氧化钠、磷酸钠、硼酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠、乳酸钠和三羟甲基氨基甲烷;和缓冲液,如柠檬酸盐/右旋糖、碳酸氢钠和氯化铵。这类酸、碱和缓冲剂以使组合物的pH保持在可接受范围内所需的量包含在内。

[0329] 在一些情况下,所述药物制剂以使组合物的重量摩尔渗透压浓度处于可接受范围内所需的量包含一种或多种盐。这类盐包括具有钠、钾或铵阳离子和氯离子、柠檬酸根、抗坏血酸根、硼酸根、磷酸根、碳酸氢根、硫酸根、硫代硫酸根或亚硫酸氢根阴离子的盐,合适的盐包括氯化钠、氯化钾、硫代硫酸钠、亚硫酸氢钠和硫酸铵。

[0330] 在一些实施方案中,所述药物制剂包含但不限于糖,如海藻糖、蔗糖、甘露醇、麦芽糖、葡萄糖,或盐,如磷酸钾、柠檬酸钠、硫酸铵,和/或其他试剂,如肝素,以增加多肽的溶解度和体内稳定性。

[0331] 在一些情况下,所述药物制剂进一步包含稀释剂,该稀释剂用来稳定化合物,因为他们可以提供更稳定的环境。本领域中利用溶解于经缓冲的溶液(其也可以提供pH控制或维持)中的盐作为稀释剂,包括但不限于磷酸盐缓冲的盐水溶液。在某些情况下,稀释剂增加组合物的体积,以便于压制或产生对用于胶囊填充的均质掺合物而言足够的体积。这类化合物可包括,例如,乳糖、淀粉、甘露醇、山梨醇、右旋糖、诸如Avicel®等微晶纤维素、磷酸氢钙、磷酸二钙二水合物、磷酸三钙、磷酸钙、无水乳糖、喷雾干燥的乳糖、预胶化淀粉、诸如Di-Pac® (Amstar)等可压缩糖、甘露醇、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素乙酸硬脂酸酯、基于蔗糖的稀释剂、糖粉(confectioner's sugar)、单碱式硫酸钙一水合物、硫酸钙二水合物、乳酸钙三水合物、葡萄糖结合剂(dextrates)、经水解的谷类固体、直链淀粉、粉状纤维素、碳酸钙、甘氨酸、高岭土、甘露醇、氯化钠、肌醇、膨润土等。

[0332] 在一些情况下,所述药物制剂包含崩解试剂或崩解剂,以促进物质的分解或崩解。术语“崩解”包括当剂型与胃肠液接触时的溶解和分散。崩解剂的实例包括淀粉,例如天然淀粉,如玉米淀粉或马铃薯淀粉,预胶化淀粉如National 1551或Amijel®,或羟基乙酸淀粉钠如Promogel®或Explotab®,纤维素如木制品,甲基结晶纤维素,例如Avicel®、Avicel® PH101、Avicel® PH102、Avicel® PH105、Elcema® P100、Emcocel®、Vivacel®、MingTia®和Solka-Floc®,甲基纤维素,交联羧甲纤维素,或

交联的纤维素，如交联的羧甲基纤维素钠(Ac-Di-Sol®)、交联的羧甲基纤维素或交联的交联羧甲纤维素，交联的淀粉如羟基乙酸淀粉钠，交联的聚合物如交聚维酮，交联的聚乙烯吡咯烷酮，藻酸盐如藻酸或藻酸的盐如藻酸钠，粘土如Veegum®HV(硅酸铝镁)，胶如琼脂、瓜尔胶、刺槐豆胶、刺梧桐胶、果胶或黄蓍胶，羟基乙酸淀粉钠，膨润土，天然海绵，表面活性剂，树脂如阳离子交换树脂，柑橘渣，十二烷基硫酸钠，十二烷基硫酸钠与淀粉的组合，等等。

[0333] 在一些情况下，所述药物制剂包含填充剂，如乳糖、碳酸钙、磷酸钙、磷酸氢钙、硫酸钙、微晶纤维素、纤维素粉末、右旋糖、葡萄糖结合剂、葡聚糖、淀粉、预胶化淀粉、蔗糖、木糖醇、乳糖醇、甘露醇、山梨醇、氯化钠、聚乙二醇等。

[0334] 润滑剂和助流剂也任选地包含在本文所述的药物制剂中，以用于阻止、减少或抑制物质的粘附或摩擦。示例性的润滑剂包括，例如，硬脂酸，氢氧化钙，滑石，硬脂酰富马酸钠，碳氢化合物如矿物油，或氢化植物油如氢化大豆油(Sterotex®)，高级脂肪酸及其碱金属和碱土金属盐如铝盐、钙盐、镁盐、锌盐，硬脂酸，硬脂酸钠，甘油，滑石，蜡、Stearowet®，硼酸，苯甲酸钠，乙酸钠，氯化钠，亮氨酸，聚乙二醇(例如PEG-4000)或甲氧基聚乙二醇如Carbowax™，油酸钠，苯甲酸钠，山蒈酸甘油酯，聚乙二醇，十二烷基硫酸镁或十二烷基硫酸钠，胶态二氧化硅如yloid™、Cab-O-Sil®，淀粉如玉米淀粉，硅油，表面活性剂，等等。

[0335] 增塑剂包括用来软化微胶囊化材料或膜包衣以使它们较不易碎的化合物。合适的增塑剂包括，例如，诸如PEG300、PEG400、PEG600、PEG1450、PEG3350和PEG800等聚乙二醇、硬脂酸、丙二醇、油酸、三乙基纤维素和三醋精。增塑剂还可以起到分散剂或湿润剂的作用。

[0336] 增溶剂包括诸如三醋精、柠檬酸三乙酯、油酸乙酯、辛酸乙酯、十二烷基硫酸钠、多库酯钠、维生素E TPGS、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、N-羟乙基吡咯烷酮、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、羟丙基环糊精、乙醇、正丁醇、异丙醇、胆固醇、胆盐、聚乙二醇200-600、糖原质、还氧二元醇(transcutol)、丙二醇和异山梨醇二甲醚等化合物。

[0337] 稳定剂包括诸如任何抗氧化剂、缓冲剂、酸、防腐剂等化合物。示例性的稳定剂包括L-精氨酸盐酸盐、氨丁三醇、白蛋白(人)、柠檬酸、苯甲醇、苯酚、脱水磷酸氢二钠、丙二醇、间甲酚或间-甲酚、乙酸锌、聚山梨酯-20或吐温(Tween)®20或氨丁三醇。

[0338] 悬浮剂包括诸如以下的化合物，如聚乙烯吡咯烷酮，例如聚乙烯吡咯烷酮K12、聚乙烯吡咯烷酮K17、聚乙烯吡咯烷酮K25或聚乙烯吡咯烷酮K30，乙烯基吡咯烷酮/乙酸乙烯酯共聚物(S630)，聚乙二醇(例如聚乙二醇的分子量可以是约300至约6000，或约3350至约4000，或约7000至约5400)，羧甲基纤维素钠，甲基纤维素，羟丙基甲基纤维素，羟甲基纤维素乙酸硬脂酸酯，聚山梨酯-80，羟乙基纤维素，藻酸钠，树胶，例如黄蓍胶和阿拉伯胶、瓜尔胶、黄原胶类(包括黄原胶)，糖，纤维素制品，例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素，聚山梨酯-80，藻酸钠，聚乙氧基化失水山梨醇单月桂酸酯，聚乙氧基化失水山梨醇单月桂酸酯，聚维酮，等等。

[0339] 表面活性剂包括诸如以下的化合物，如十二烷基硫酸钠、多库酯钠、吐温60或80、三醋精、维生素E TPGS、失水山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯、聚山梨酯、泊洛沙姆(polaxomers)、胆盐、单硬脂酸甘油酯、环氧乙烷和环氧丙烷的共聚合物，例如

Pluronic® (BASF)等。另外的表面活性剂包括聚氧乙烯脂肪酸甘油酯和植物油，例如聚氧乙烯(60)氢化蓖麻油；和聚氧乙烯烷基醚和烷基苯基醚，例如辛苯昔醇10(octoxynol 10)、辛苯昔醇40。有时，包括表面活性剂以增强物理稳定性或用于其他目的。

[0340] 粘度增强剂包括，例如，甲基纤维素、黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素乙酸硬脂酸酯、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、卡波姆、聚乙烯醇、藻酸盐、阿拉伯胶、壳聚糖及其组合。

[0341] 湿润剂包括诸如油酸、单硬脂酸甘油酯、失水山梨醇单油酸酯、失水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯、多库酯钠、油酸钠、十二烷基硫酸钠、多库酯钠、三醋精、吐温80、维生素E TPGS、铵盐等化合物。

治疗方案

[0342] 在一些实施方案中，施用本文所述的药物组合物以用于治疗应用。在一些实施方案中，该药物组合物每天施用一次、每天施用两次、每天施用三次或更频繁。该药物组合物每天、每隔一天、隔日、每周五天、每周一次、每隔一周、每月两周、每月三周、每月一次、每月两次、每月三次或更频繁地施用。该药物组合物施用至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、18个月、2年、3年或更长时间。

[0343] 在患者的状态确实得到改善的情况下，根据医生的裁量，继续进行组合物的施用；或者，所施用的组合物的剂量暂时减少或暂时停止某段时间长度(即“休药期”)。在一些情况下，休药期的长度为2天至1年不等，仅举例来说，包括2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、15天、20天、28天、35天、50天、70天、100天、120天、150天、180天、200天、250天、280天、300天、320天、350天或365天。在休药期期间的剂量减少是10％-100％，仅举例来说，包括10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％。

[0344] 一旦患者的状况已发生改善，如果必要的话，施用维持剂量。随后，根据症状，将给药剂量或频率或二者降低至疾病、病症或病况的改善得以保持的水平。

[0345] 在一些实施方案中，对应于此量的给定药剂的量根据诸如具体化合物、疾病的严重程度、需要治疗的受试者或宿主的特性(例如体重)等因素而变化，不过仍根据该病例的具体情况以本领域已知的方式进行常规确定，所述情况包括例如所施用的具体药剂、给药途径和所治疗的受试者或宿主。在一些情况下，所需剂量方便地以单剂量或分剂量呈现，所述分剂量同时(或在短时间段内)或以适当的间隔施用，例如每天两次、三次、四次或更多次亚剂量。

[0346] 前述范围仅是建议性的，因为关于个体治疗方案的变量数目很大，并且偏离这些推荐值的相当大的偏差也并不罕见。这样的剂量根据许多变量而改变，这些变量不限于所使用的化合物的活性、所治疗的疾病或病况、给药模式、受试个体的需求、所治疗的疾病或病况的严重程度，以及从业医生的判断。

[0347] 在一些实施方案中，此类治疗方案的毒性和治疗效果通过标准药学程序在细胞培养物或实验动物中确定，包括但不限于LD50(群体中50％致死的剂量)和ED50(群体中50％治疗有效的剂量)的确定。毒性作用与治疗效果之间的剂量比为治疗指数，并且将其表示为LD50与ED50之间的比值。表现出高治疗指数的化合物是优选的。从细胞培养试验和动物研

究获得的数据用于制定在人体中使用的剂量范围。此类化合物的剂量优选地处于包括ED50且具有最小毒性的循环浓度的范围内。该剂量在该范围内变化，这取决于所使用的剂型和所采用的给药途径。

试剂盒/制品

[0348] 在某些实施方案中，本文公开了与本文所述的一种或多种方法和组合物一起使用的试剂盒和制品。这样的试剂盒包括载具、包装或容器，该容器被区室化为容纳一个或多个容器如小瓶、管等，每个容器包含在本文描述的方法中使用的一个单独元件。合适的容器包括，例如，瓶子、小瓶、注射器和试管。在一个实施方案中，该容器由多种材料如玻璃或塑料形成。

[0349] 本文提供的制品含有包装材料。药物包装材料的实例包括但不限于泡罩包装、瓶子、管、袋、容器、瓶子，和任何适于选定制剂和预期给药和治疗模式的包装材料。

[0350] 例如，所述容器包含本文公开的一种或多种细胞因子(例如，IL-2)多肽或细胞因子(例如，IL-2)缀合物，以及可选的本文所述的一种或多种药物赋形剂，以促进细胞因子(例如，IL-2)多肽或细胞因子(例如，IL-2)缀合物的递送。此类试剂盒进一步任选地包括关于其在本文所述方法中的应用的标识性描述或标签或说明书。

[0351] 试剂盒一般包括列出了内容物的标签和/或使用说明书，以及带有使用说明的包装插页。一般也包括一套说明书。

[0352] 在一个实施方案中，标签位于容器上或与容器相关联。在一个实施方案中，当构成标签的字母、数字或其他字符附着、模塑或铭刻于容器自身时，标签位于容器上；当它存在于也支撑容器的托座或载具内时，例如作为包装插页时，标签与容器相关联。在一个实施方案中，标签用来指示内容物将用于特定的治疗性应用。标签还指示内容物的使用说明，例如在本文所述方法中的使用说明。

[0353] 在某些实施方案中，所述药物组合物呈现于包装或分配器装置中，该包装或分配器装置包含一种或多种含有本文提供的化合物的单位剂型。例如，该包装包含金属或塑料箔，如泡罩包装。在一个实施方案中，该包装或分配器装置附有给药说明书。在一个实施方案中，该包装或分配器还附有监管药物生产、使用或销售的政府机构所规定的形式的、与容器相关联的告知书，该告知书反映出该机构批准该药物形式用于人类或兽医给药。例如，这样的告知书是由美国食品药品管理局对药物批准的标签，或批准的产品插页。在一个实施方案中，还制备含有在相容药物载体中配制的本文提供的化合物的组合物，将其置于适当的容器中，并且标示出用于治疗所示的病况。

某些术语

[0354] 除非另有定义，否则本文中使用的所有技术和科学术语均与所请求保护的主题所属领域的技术人员所一般了解的含义相同。应当理解，详细描述仅是示例性和说明性的，并非限制所请求保护的任何主题。在本申请中，除非另有特别说明，否则单数形式的使用包括复数形式。必须指出，除非上下文另有明确说明，否则如本说明书中所用的，单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指示物。在本申请中，除非另有说明，否则“或”的使用意指“和/或”。此外，术语“包括”以及其他形式如“包含”、“含有”和“具有”的使用不是限制性的。

[0355] 尽管本发明的各个特征可以在单个实施方案的语境中描述，但是这些特征也可以单独提供或以任何合适的组合提供。相反，尽管为了清楚起见，本文可以在单独的实施方案

的语境中描述本发明，但是本发明也可以在单个实施方案中实现。

[0356] 本说明书中提及“一些实施方案”、“实施方案”、“一个实施方案”或“其他实施方案”意指与该实施方案相关描述的特定特征、结构或特性包含在本发明的至少一些实施方案中，但不一定包含在所有实施方案中。

[0357] 如本文所用的，范围和量可以被表示为“约”特定值或范围。“约”还包括确切的量。因此，“约5μL”表示“约5μL”，并且还表示“5μL”。通常，术语“约”包括预期在实验误差内的量，例如，在15％、10％或5％内。

[0358] 本文所用的章节标题仅用于组织编排的目的，而不应解释为限制所描述的主题。

[0359] 如本文所用的，术语“个体”、“受试者”和“患者”是指任何哺乳动物。在一些实施方案中，该哺乳动物是人。在一些实施方案中，该哺乳动物是非人哺乳动物。这些术语都不需要或局限于以卫生保健工作者(例如，医生、注册护士、从业护士、医师助理、护理员或临终关怀工作人员)的监护(例如，持续的或间歇的)为特征的情形。

[0360] 如本文所用的，关于结合亲和力使用的术语“显著的”或“显著地”是指足以影响细胞因子(例如，IL-2多肽)与目标受体结合的细胞因子(例如，IL-2多肽)结合亲和力的变化。在一些情况下，该术语是指至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％或更大的变化。在一些情况下，该术语是指至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、50倍、100倍、500倍、1000倍或更大的变化。

[0361] 在一些情况下，关于一个或多个细胞群体通过细胞因子信号传导复合物的激活所使用的术语“显著的”或“显著地”是指足以激活该细胞群体的变化。在一些情况下，激活细胞群体的变化被测量为受体信号传导效力。在这样的情况下，可以提供EC50值。在其他情况下，可以提供ED50值。在另外的情况下，可以提供细胞因子的浓度或剂量。

[0362] 如本文所用的，术语“效力”是指产生目标效应所需的细胞因子(例如，IL-2多肽)的量。在一些情况下，术语“效力”是指激活目标细胞因子受体(例如，IL-2受体)所需的细胞因子(例如，IL-2多肽)的量。在其他情况下，术语“效力”是指激活目标细胞群体所需的细胞因子(例如，IL-2多肽)的量。在一些情况下，效力被测量为ED50(有效剂量50)，或产生最大效应的50％所需的剂量。在其他情况下，效力被测量为EC50(有效浓度50)，或在群体的50％中产生目标效应所需的剂量。

实施例

[0363] 提供这些实施例仅仅是为了说明性目的，而并非限制本文提供的权利要求书的范围。

实施例1

[0364] 激酶和细胞因子受体二聚化试验

[0365] 细胞处理

[0366] 按照标准程序，从冷冻储备液扩充PathHunter细胞系。将细胞以20μL的总体积接种到白壁384孔微孔板中，并在测试之前孵育适当的时间。

[0367] 激动剂格式

[0368] 为了确定激动剂，将细胞与样品一起孵育以诱导反应。对样品储备液进行中度稀释，以在测定缓冲液中生成5X样品。将约5μL的5X样品添加至细胞，并在37℃下孵育6至16小时(取决于该试验)。媒介物浓度为1％。

[0369] 信号检测

[0370] 对于激动剂和拮抗剂试验，分别通过单次加入12.5或15μL(50％v/v)PathHunter检测试剂混合物，随后在室温下孵育1小时，来生成测定信号。对于某些试验，使用高灵敏度检测试剂(PathHunter Flash Kit)检测活性以改善测定性能。在这些试验中，将等体积的检测试剂(25或30uL)加入孔中，然后在室温下孵育1小时。在用用于化学发光信号检测的PerkinElmer EnvisionTM仪器生成信号后，读取微孔板。

[0371] 数据分析

[0372] 使用CBIS数据分析套件(ChemInnovation,CA)分析化合物的活性。对于激动剂模式试验，利用下列公式计算活性百分比：

％活性＝100％x(测试样品的平均RLU-媒介物对照的平均RLU)/(对照配体的平均MAX RLU-媒介物对照的平均RLU)。

[0373] 对于拮抗剂模式试验，利用下列公式计算抑制百分比：

％抑制＝100％x(1-测试样品的平均RLU-媒介物对照的平均RLU)/(EC80对照的平均RLU-媒介物对照的平均RLU))。

实施例2

[0374] 用于鉴定没有IL-2Rα接合的聚乙二醇化IL-2化合物的基于细胞的筛选

[0375] 利用IL-2/异源三聚体受体信号传导复合物(PDB:2ERJ)的结构数据指导nAA-聚乙二醇化位点的设计，以特异性消除IL-2与IL-2受体α亚基(IL-2Rα)的相互作用。对示例性的IL-2缀合物进行功能分析：K35、F42、K43、E62和P65。使IL-2缀合物在大肠杆菌中表达为包涵体，使用标准程序纯化并重折叠，然后使用DBCO介导的无铜点击化学法对IL-2产物进行位点特异性聚乙二醇化，以将稳定的共价mPEG部分连接至AzK。

[0376] 在Discoverx(Fremont CA)使用PathHunter IL-2细胞因子受体试验根据功能活性筛选IL-2缀合物。该试验使用重组人U2OS细胞系，该细胞系表达IL-2受体β(IL-2Rβ)和γ(IL-2Rγ)亚基，每个亚基与分裂报告酶β-半乳糖苷酶的一半融合。第二细胞系已经被进一步工程化为表达IL-2Rα亚基。使用这两种细胞系的平行测试允许评估IL-2受体αβγ以及基础βγ复合物的变体激活。IL-2激动剂对IL-2βγ受体复合物的活性刺激受体二聚化和报告β-半乳糖苷酶的重建，这产生了化学发光信号。该试验以激动剂模式运行，以确定每种测试物的EC_{50}，并且IL2Rα阳性和阴性细胞类型之间的剂量-响应曲线谱的比较允许确定IL2Rα对观察到的活性的贡献。

[0377] 表1显示了针对30kD聚乙二醇化IL-2缀合物的基于细胞的筛选中，IL-2受体激动作用的EC50数据。

位点	βγ EC50 (nM)	αβγ EC50 (nM)	βγ/αβγ 比
天然	1.68	0.074	23
K35	6.75	0.15	45
F42	6.09	0.515	12
K43	9.84	0.131	75
E62	3	1.5	2
P65	23.8	4.44	5

[0378] 聚乙二醇化IL-2与人IL-2受体亚基的生物化学相互作用

[0379] 在Biosensor Tools LLC(Salt Lake City,UT)使用表面等离子体共振(SPR)测量了聚乙二醇化IL-2化合物与人IL-2受体亚基相互作用的动力学。对于这些研究,将人IgG1 Fc融合的L-2Rα(Sino Biological#10165-H02H)和β(Sino Biological#10696-H02H)胞外域捕获在Biacore蛋白A包被的CM4传感器芯片的表面上。使用Biacore 2000SPR仪器,采用以2μM天然IL-2(野生型IL-2;Thermo#PHC0021)、P65_30kD、P65_5kD、E62_30kD或E62_5kD开始的2倍稀释系列,一式两份对这些表面进行探查。注入测试样品60s,以允许测量缔合,随后仅缓冲液(洗涤)30s,以测量解离。将响应单位(RU,Y轴)对时间(s,X轴)作图。

[0380] 为了评价IL-2受体α亚基对IL-2与β结合的影响,以相对于β大约两倍过量地捕获α。采用以2.5μM开始的三倍稀释系列,将天然IL-2(野生型IL-2)、P65_30kD、P65_5kD、E62_30kD或E62_5kD施加到这些表面上。将结合数据拟合到包括整体漂移(bulk shift)的1:1相互作用模型,提取的动力学参数总结在表2A和表2B中。

表2A:IL-2变体与单个IL-2受体亚基表面——IL-2受体α表面的相互作用的动力学参数

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (μM)
IL-2天然	4.5±0.3x10^7	0.410±0.01	0.009±0.002
P65_30kD	114±36	0.018±0.008	158±21
P65_5kD	797±226	0.033±0.004	42±7
E62_30kD	333±88	0.050±0.01	162±7
E62_5kD	1010±41	0.035±0.002	34.4±0.3

表2B:IL-2变体与单个IL-2受体亚基表面——IL-2受体β表面的相互作用的动力学参数

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (μM)
IL-2天然	1.3±0.2x10^6	0.185±0.009	0.145±0.005
P65_30kD	1.8±0.2x10^5	0.370±0.01	2.09±0.09
P65_5kD	9.0±0.4x10^5	0.270±0.01	0.305±0.002
E62_30kD	1.8±0.4x10^5	0.208±0.006	1.14±0.01
E62_5kD	6.6±0.8x10^5	0.281±0.004	0.428±0.00

[0381] 在含有固定化IL-2Rα的传感器表面上,天然IL-2显示出快速缔合和缓慢解离的动力学,表明具有高亲和力结合(图4A)。相比之下,即使在2μM的最高测试浓度下,P65_30kD或E62_30kD都不与IL-2Rα表面相互作用(图4A)。含有固定化IL-2Rβ的表面显示出与天然IL-2(野生型IL-2)和IL-2P65_30kD相当的缔合和解离反应(图4B)。化合物之间对β亚基观察到的K_D的适度差异是由于IL-2P65_30kD相对于天然IL-2的缔合速率降低,这是由该聚乙二醇化化合物的流体动力学半径的变化(较低的扩散系数)以及大PEG部分对远处结合表面的非特异性屏蔽作用所预期的。这些结果提示,P65_30kD和E62_30kD在IL-2Rα相互作用方面存在缺陷,但在很大程度上保留了与IL-2Rβ的结合。

[0382] 原发性人白细胞减少系统(LRS)衍生的PBMC样品中IL-2P65_30kD和E62_kD的离体免疫应答概况分析

[0383] 为了确定IL-2P65_30kD和E62_30kD的差异受体特异性如何影响原代免疫细胞亚

群的活化，使用多色流式细胞术进行了人LRS衍生的外周血单核细胞(PBMC)样品中淋巴细胞活化的浓度-响应概况分析。这些研究是在PrimityBio LLC(Fremont,CA)进行的。用以最高浓度30μg/mL开始的5倍稀释系列的天然IL-2、P65_30kD或E62_30kD处理新鲜的LRS衍生的样品。孵育45min后，将样品固定并用抗体染色，以检测转录因子STAT5的磷酸化形式(pSTAT5)——IL-2受体信号传导复合物的上游接合和活化的标志物，以及一组表面标志物(表3)，以追踪特定T细胞和自然杀伤(NK)细胞亚群中的pSTAT5形成。

表3:用于LRS衍生的PBMC样品的流式细胞术研究的染色组

细胞类型	标志物概况
效应T细胞(Teff)	CD3+,CD4+,CD8+,CD127+
NK细胞	CD3-,CD16+
调节性T细胞(Treg)	CD3+,CD4+,CD8-,IL-2Rα+,CD127-

[0384] 以浓度-响应模式分析了流式细胞术数据的不同T细胞和NK细胞亚组的活化，在用天然IL-2(图5A)、E62_30kD(图5B)和P65_30kD(图5C)处理后读取pSTAT5积累。在NK和效应T细胞(CD3+CD8+)群体中，IL-2P65_30kD和IL-2E62_30kD相对于天然IL-2保留了效力，pSTAT5产生的EC_{50}值在天然IL-2的4-5倍之内(图5A)。相反，与天然IL-2相比，Treg亚群(CD3+CD4+IL-2Rα+CD127-)中IL-2P65_30kD的pSTAT5诱导的EC_{50}值降低了900倍，但仍然类似于NK和Teff细胞群体的EC_{50}(图5C)。尤其是在Treg群体中，IL-2P65_30kD的EC_{50}的这种显著增加，表明IL-2在这些位置处的聚乙二醇化允许IL-2受体的激动作用，但消除了IL-2相对于效应T细胞对Treg刺激的偏向。

表4.用所示IL-2变体处理的人LRS样品或CTLL-2增殖中pSTAT5信号传导的剂量响应EC50(EC50)

处理	NK 细胞	Treg 细胞	CD8+ T 细胞	CD8/Treg 比	CTLL-2
天然 IL-2	5150.5	62.5	25703.5	411.3	846
E62_30kD	12834	37213	66644	1.8	398,012
E62_5kD	5327.5	18146	41552.5	2.3	275,590
E62K	10305	11086	64037	5.8	58,213
P65_30kD	15741	40740.5	113638	2.8	677,198
P65_5kD	1920	6324.5	13769.5	2.2	194,924
K35_30kD	14021	358	63023	176.0	N.D.
F42_30kD	16397	36856	107944	2.9	123,936
K43_30kD	9004	4797	50504	10.5	N.D.

[0385] 从根据MFI图生成的剂量响应曲线计算EC50值(pg/mL)。

实施例3

[0386] 在幼稚(E3826-U1704)和B16-F10荷瘤(E3826-U1803)C57BL/6小鼠中的PK/PD研究

[0387] 研究设计总结在表5和表6中。在所示时间点通过心脏穿刺收集末梢血样品。研究E3826-U1704包括13个时间点(0.13、0.25、0.5、1、2、4、8、12、24、48、72、96和120小时)，每个时间点处死3只小鼠，而研究E3826-U1803包括9个时间点(2、8、12、24、48、72、120、168和240小时)，在每个时间点处死4-7只小鼠。收集研究E3826-U1803中的血浆和血细胞(在两项研究中)以及肿瘤，以进行PK和PD分析。

[0388] 使用合格的人IL-2ELISA测定(Abcam,Cambridge,UK)对血浆样品进行生物分析。

使用ELISA测定来确定来源于血浆的样品中阿地白介素、E62_30kD和P65_30kD以及内标的浓度。PK数据分析在NW Solutions(Seattle,WA)进行。将PK数据输入Phoenix WinNonlin v6.4(Certara/Pharsight,Princeton,NJ)中进行分析。使用静脉内推注给药模型,通过非房室方法分析组平均血浆浓度相对于时间的数据。

表5:PK/PD研究编号E3826-U1704——幼稚C57/BL6小鼠中的对照和测试治疗组

治疗	剂量*(mg/Kg)	途径，时间表	时间点	N
对照	0	IV，单剂量	13	3
阿地白介素	0.3	IV，单剂量	13	3
P65_30kD	0.3	IV，单剂量	13	3
E62_30kD	0.3	IV，单剂量	13	3

*剂量是指P65_30kD IL-2多肽的量

表6:PK/PD研究编号E3826-U1803—对照和测试治疗组—B16F-10黑素瘤荷瘤小鼠

治疗	剂量(mg/kg)	途径，时间表	时间点	N
无(给药前)	0 mg/kg	无	1	6
媒介物对照	0 mg/kg	IV，单剂量	9	3
P65_30kD	1 mg/kg	IV，单剂量	9	4
P65_30kD	3 mg/kg	IV，单剂量	9	4

[0389] 图6中绘制了0.3mg/kg的P65_30kD、E62_30kD、E62_5kD和阿地白介素的血浆浓度曲线。

[0390] 在研究E3826-U1704中,相对于阿地白介素,P65_30kD和E62_30kD均表现出优异的PK曲线,总结在表3中。在单次静脉内推注阿地白介素后,在给药后0.03h(给药后的第一个测量时间点)观察到Tmax,且直到给药后4h的平均血浆浓度是可测量的。在单次静脉内推注P65_30kD和E62_30kD后,在给药后0.03h观察到Tmax,并且直到给药后120h(最后的测量时间点)的平均血浆浓度是可测量的。在单独的研究中,在静脉内给予E62_5kD后,在给药后0.133hr观察到T_{max},并且直到给药后12hr的平均血浆浓度是可测量的。

[0391] 基于C_{max}和AUC_{0-t}的暴露如下:P65_30kD>>E62_30kD>>E62_5kD>阿地白介素。具有较小PEG的E62_5kD的PK曲线更接近于rIL-2。基于Cmax和AUC0-t,P65_30kD暴露分别是阿地白介素的5.5倍和200倍。另外,与阿地白介素相比,P65_30kD显示出延长23倍的t1/2(13.3h对0.57h)以及降低约198倍的CL(6.58mL/h/Kg对1300mL/h/Kg)。对于P65_30kD和E62_30kD而言,其分布体积(分别为82.4和92.3mL/Kg)相对于阿地白介素降低了约4.2至4.7倍,并且类似于小鼠的血容量(85mL/Kg;[Boersen 2013])。这提示,P65_30kD和E62_30kD大部分分布在体循环内。

表7:C57BL/6雌性小鼠中的P65_30kD PK参数

参数	单位	P65_30kD		E62_30kD	E62_5kD	阿地白介素
T_{max}	h	0.030		0.030	0.133	0.030
C_{max}	ng/mL	4,870		4,230	936	884

AUC_{0-t}	h*ng/mL	45,600		37,100	798	229
R^2		0.992		0.986	0.851	0.900
AUC_{INF}	h*ng/mL	45,600		37,100	807	230
$t_{1/2}$	h	13.300		14.500	2.56	0.573
CL	mL/h/Kg	6.580		8.07	372	1300
V_{ss}	mL/Kg	82.4		92.3	404	390

备注:R^2是每个浓度-时间曲线的终末期的拟合优度参数。

所有参数均显示为3个有效数字。

实施例4

[0392] 外周血区室中的药效学观察

[0393] STAT5磷酸化和细胞增殖的诱导(早期分子标志物Ki-67和细胞计数)用作药效学读出,以相对于其药代动力学评估P65_30kD的药理学概况。对于P65_30kD和阿地白介素,在CD8+效应T细胞中,pSTAT5PD标志物显示出良好的与PK的相关性(表7)。在NK和CD8+T细胞中均观察到pSTAT5的持续升高,直到72h,而在Treg中直到24h。在给予阿地白介素的小鼠中,仅在2h后,pSTAT5诱导恢复到基线水平(图7)。STAT5磷酸化可被解释为CD8+效应T细胞和NK细胞的延迟增殖反应(72-120hr),但Treg则不然(图8A-8C),对CD8+效应T细胞的表型分析揭示了该群体内CD44+记忆细胞的显著扩充(图9A-9B)。

[0394] 在B16-F10荷瘤(E3826-U1803)C57BL/6小鼠的肿瘤区室中的药效学观察

[0395] 表8显示了在B16-F10荷瘤小鼠中以3mg/kg给予单剂量P65_30kD后的血浆和肿瘤药物浓度。肿瘤半衰期是血浆半衰期的两倍(24.4对12.6),表明P65_30kD穿透肿瘤并保留在肿瘤中。曲线的尾端相交,表示血浆的清除比肿瘤快。对于1mg/kg和3mg/kg剂量,肿瘤:血浆AUC比分别为9.7%和8.4%。

表8:B16-F10荷瘤C57BL/6雌性小鼠中的P65_30kD血浆和肿瘤PK参数

参数	P65_30kD (3 mg/kg)	
	血浆	肿瘤
T_{max} (h)	*2.00	8
C_{max} (ng/mL)	40000	1550
t1/2 (h)	12.60	24.4
AUC_{0-t} (h*ng/mL)	656,000	55200
R^2	0.974	0.988
AUC_{INF} (h*ng/mL)	656,000	55200

[0396] 图10A-图10B显示了B16F10肿瘤中P65_30kD对NK和CD+T细胞的扩充。图10A显示了以3g/kg用单次静脉内推注剂量的P65_30kD治疗后,肿瘤CD3+T细胞群体中NK细胞、CD8+细胞和Treg的百分比。治疗后5天,通过流式细胞术分析肿瘤样品的免疫细胞群体。每个数据点代表每个时间点的3次重复的平均值±SEM。呈现的细胞群体数据来自第5天的肿瘤样品,而CD8/Treg比是从第7天的样品计算出的。图10B显示了在以3mg/kg用单次静脉内推注剂量的P65_30kD治疗后7天,CD8+效应细胞与CD4+调节性T细胞之比。每个数据点代表每个时间点的3次重复的平均值±SEM。

[0397] Balb/c小鼠E3826-U1802中的MTD研究

[0398] 在Crown Biosciences,Inc.(San Diego,CA),在幼稚雌性Balb/c小鼠中进行了

P65_30kD的剂量范围研究。研究设计示于表9中。在7个时间点(0.25、1、4、12、24、34、48和72h)经下颌下静脉抽取血样。收集血浆和血细胞用于PK和PD分析。

[0399] 使用可商购获得的ELISA试剂盒,分析所有血浆样品中的人IL-2以及小鼠IL-2、TNF-α、IFNγ、IL-5和IL-6细胞因子。

表9:PK/PD和MTD研究编号E3826-U1802——幼稚Balb/C小鼠中的对照和测试治疗组

治疗	剂量 (mg/kg)	途径，时间表	时间点	N
幼稚	0 mg/kg		0	3
媒介物对照	0 mg/kg	IV，BID x 3	3	3
阿地白介素	0.01 mg/kg	IV，BID x 3	3	3
阿地白介素	0.03 mg/kg	IV，BID x 3	3	3
阿地白介素	0.1 mg/kg	IV，BID x 3	3	3
阿地白介素	1.0 mg/kg	IV，BID x 3	3	3
阿地白介素	3.0 mg/kg	IV，BID x 3	3	3
阿地白介素	5.0 mg/kg	IV，BID x 3	3	3
P65_30kD	0.01 mg/kg	IV，单剂量	3	3
P65_30kD	0.03 mg/kg	IV，单剂量	3	3
P65_30kD	0.1 mg/kg	IV，单剂量	3	3
P65_30kD	1.0 mg/kg	IV，单剂量	3	3
P65_30kD	3.0 mg/kg	IV，单剂量	3	3
P65_30kD	5.0 mg/kg	IV，单剂量	3	3
#P65_30kD	0.3 mg/kg	IV，单剂量	8	3

*除72hr时间点以外的所有时间点均经由下颌下静脉进行血液采集。72hr时间点是末梢血采集。

#仅0.3mg/kg剂量的PP65_30kD用于PKPD评价

[0400] 使用Balb/c小鼠在MTD研究中的毒理学观察

[0401] 与高剂量IL-2相关的主要毒性是血管渗漏综合征和相关的细胞因子释放综合征(CRS)。为了在小鼠中对此进行评价,以0.01-5.0mg/kg剂量范围的剂量进行P65_30kD的单剂量静脉内给药(表10)。所进行的分析是血液学、组织病理学、器官重量和细胞因子分析。采用P65_30kD或阿地白介素,相对于媒介物对照小鼠,在血液学、组织病理学或体重方面未观察到异常。关于细胞因子分析,观察到阿地白介素升高了血浆IL-5水平,从1mg/kg开始直至5mg/kg(图11A)。对于P65_30kD,仅在5mg/kg剂量时观察到IL-5的适度增加,与阿地白介素相比这是较小的(图11B)。对于阿地白介素和P65_30kD,均观察到IFNγ的全身水平的瞬时升高。

实施例5

[0402] 在食蟹猴中的PK/PD-研究编号:20157276

[0403] 在以0.3mg/kg施用单次静脉内剂量后,在非幼稚食蟹猴中评价了P65_30kD的药代动力学和药效学概况。该研究在Charles River Laboratories,Inc.(Reno,NV)进行,而PK数据分析在NW Solutions(Seattle,WA)进行。在给药前和给药后的21个时间点(0.5、1、2、

4、8、12、24、36、48、72、120、144、168、192和240h)采集血样。收集血浆和血细胞用于PK和PD分析。所选择的时间点用于PK、PD、细胞群体和血液学分析。

[0404] 使用可商购获得的ELISA试剂盒,分析所有血浆样品中的人IL-2(PK读出)。

[0405] 表10显示了食蟹猴中的P65_30kD PK参数。

表10

			0.3 mg/kg		
			动物 2699	动物 2705	平均值
ROA	参数	单位	估计值		
IV	T_{max}	hr	0.500	0.500	0.500
	C_{max}	ng/mL	11000	11400	11200
	AUC_{0-t}	hr*ng/mL	121000	120000	121000
	$t_{1/2}$	hr	13.4	13.9	13.6
	CL	mL/hr/kg	2.47	2.49	2.48
	V_{ss}	mL/kg	29.0	32.1	30.5

[0406] 在单次静脉内推注给药后,在给药后0.5h(给药后的第一个测量时间点)观察到Tmax,并且直到给药后168h(最后一次测量)的平均血浆浓度是可测量的。P65_30kD的$t_{1/2}$和AUC分别为13.6h和121000hr*ng/mL。

[0407] 血液学参数-食蟹猴-研究编号:20157276

[0408] 对于血液学参数,评价时间点对应于给药前第-1天和给药后第1、3、6、8、10、12、14、17、19、21天。

[0409] 图12示出了绝对白细胞计数和分类计数。数据代表平均值±SD(N=2只动物/剂量组)。

[0410] 对白细胞(WBC)亚群的分析揭示,WBC计数的主要增加是由于淋巴细胞群体的扩充,这与P65_30kD的机制一致。嗜酸性粒细胞没有升高。

实施例6

[0411] 表11示出了本文所述的IL-2序列。

名称	序列	SEQ ID NO:
IL-2 (智人(Homo sapiens)) (成熟形式)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	1
IL-2 (智人(Homo sapiens)) (前体) NCBI登录号: AAB46883.1	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLE HLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFCQSIISTLT	2

[0412] 虽然本文已经示出并描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员明显的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。本领域技术人员在不脱离本发明的情况下现将想到许多变化、改变和替代。应当理解,在实施本发明的过程中可以采用本文所述的本发明

实施方案的各种替代方案。旨在以所附权利要求书限定本发明的范围，并且由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

序列表

<110> 辛索克斯公司

<120> 用于治疗增生性和感染性疾病的细胞因子缀合物

<130> 46085-710.601

<140>

<141>

<150> 62/540,781

<151> 2017-08-03

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 2

<211> 153

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15
Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110
Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125
Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140
Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成肽
<400> 3
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 除脯氨酸外的任意氨基酸

<400> 4
Val Pro Gly Xaa Gly
1 5
<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述:合成多肽
<400> 5
Phe Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro
1 5 10 15
Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
20 25 30

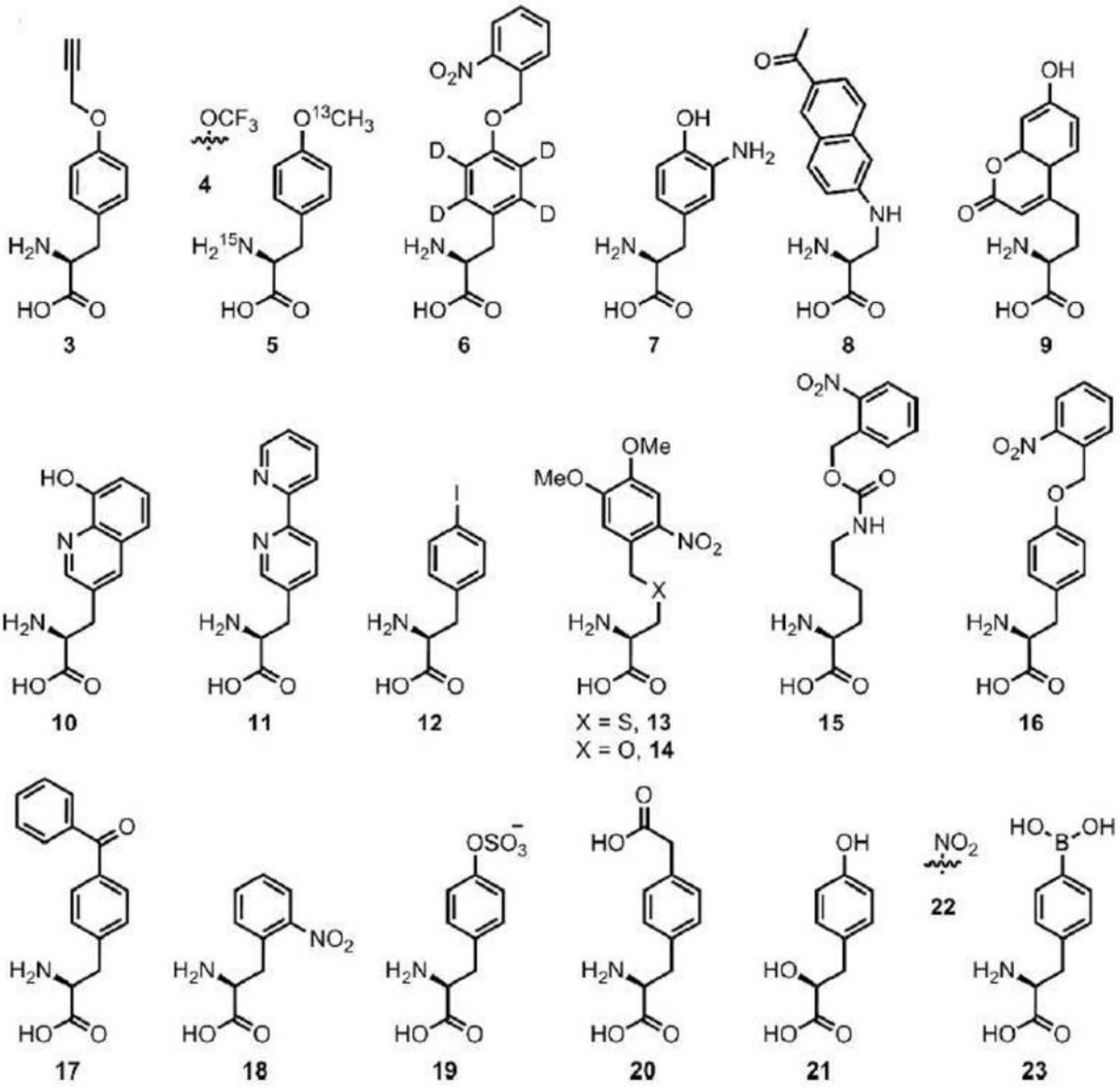


图1

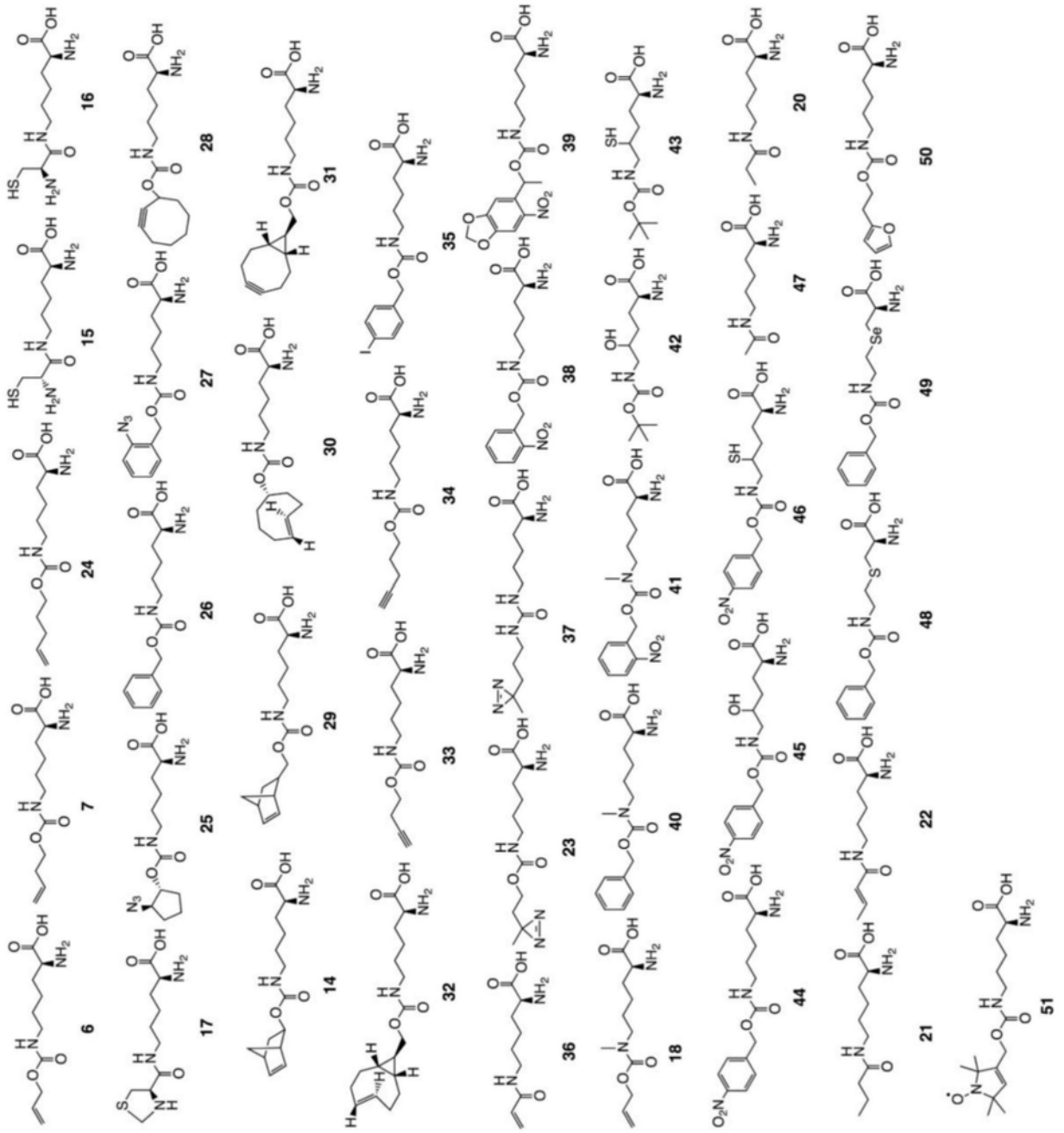


图2A

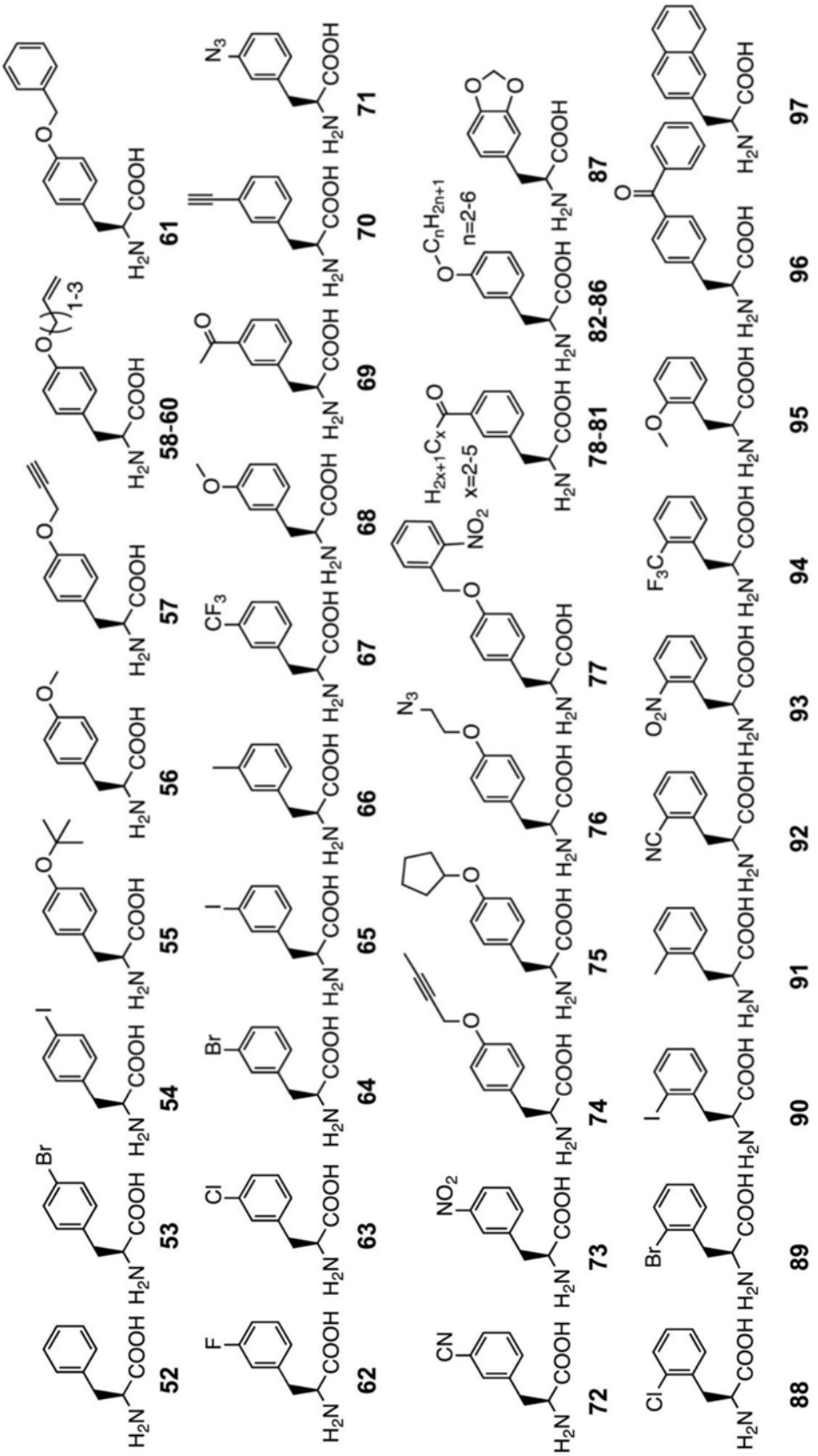


图2B

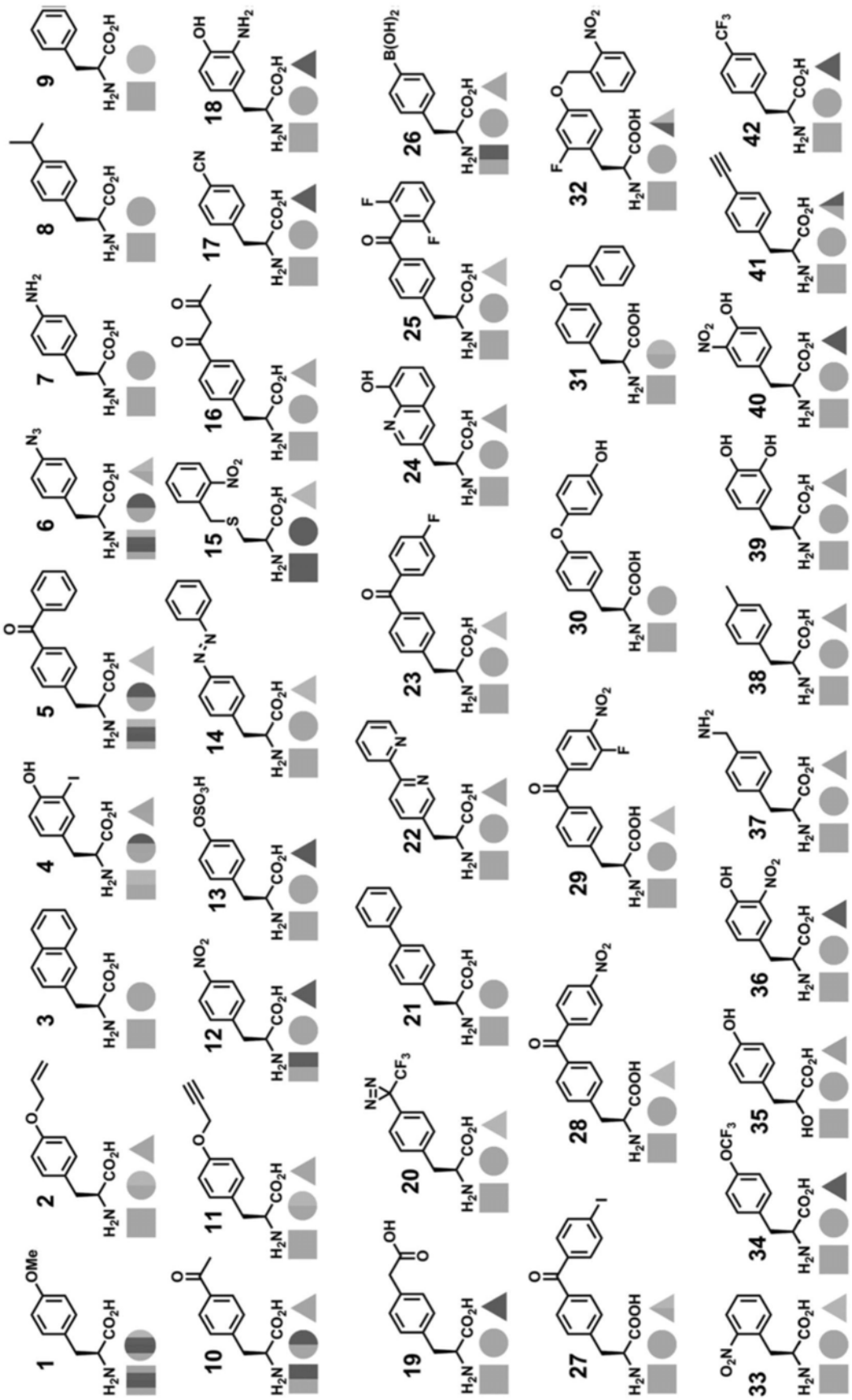


图3A

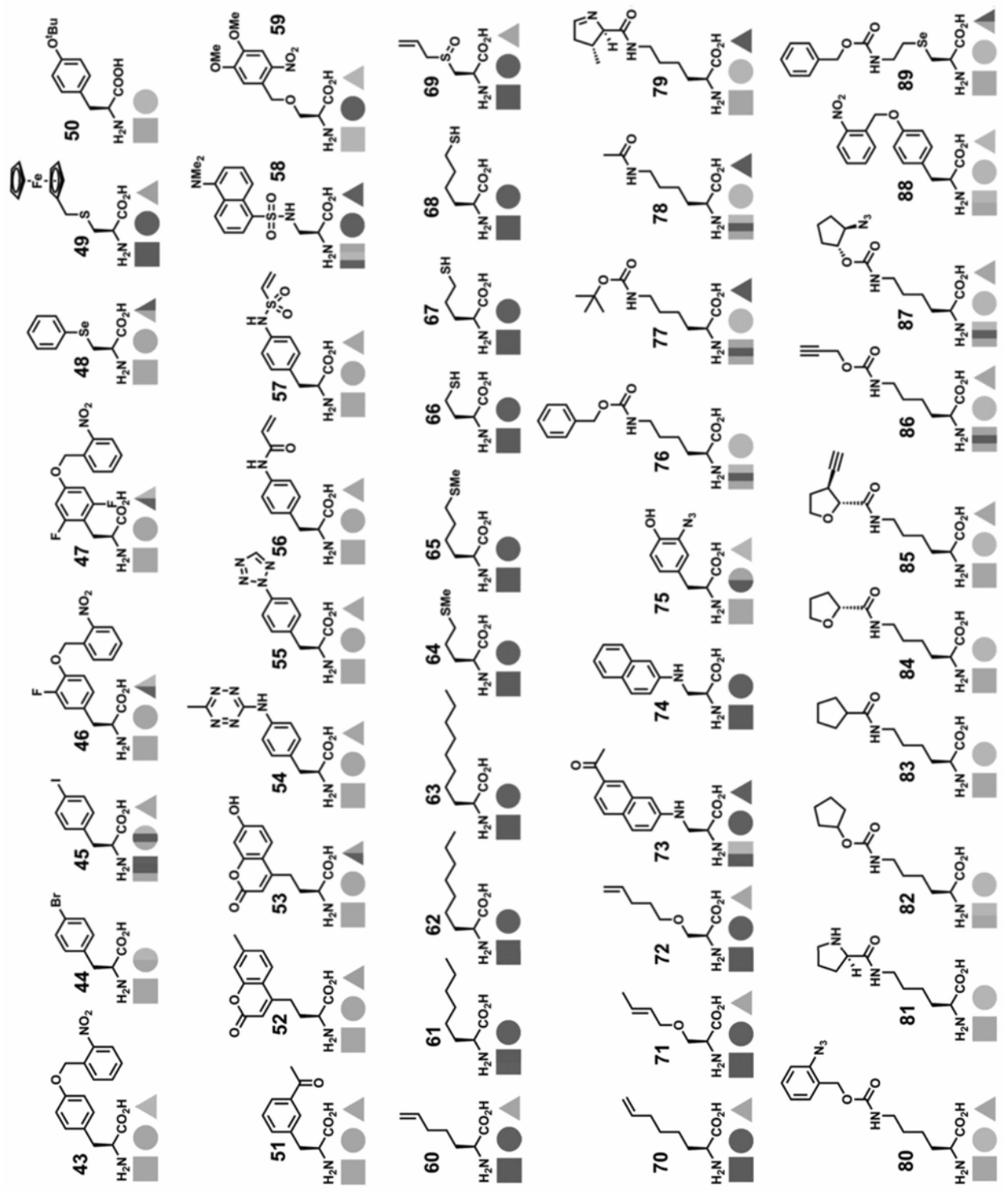


图3B

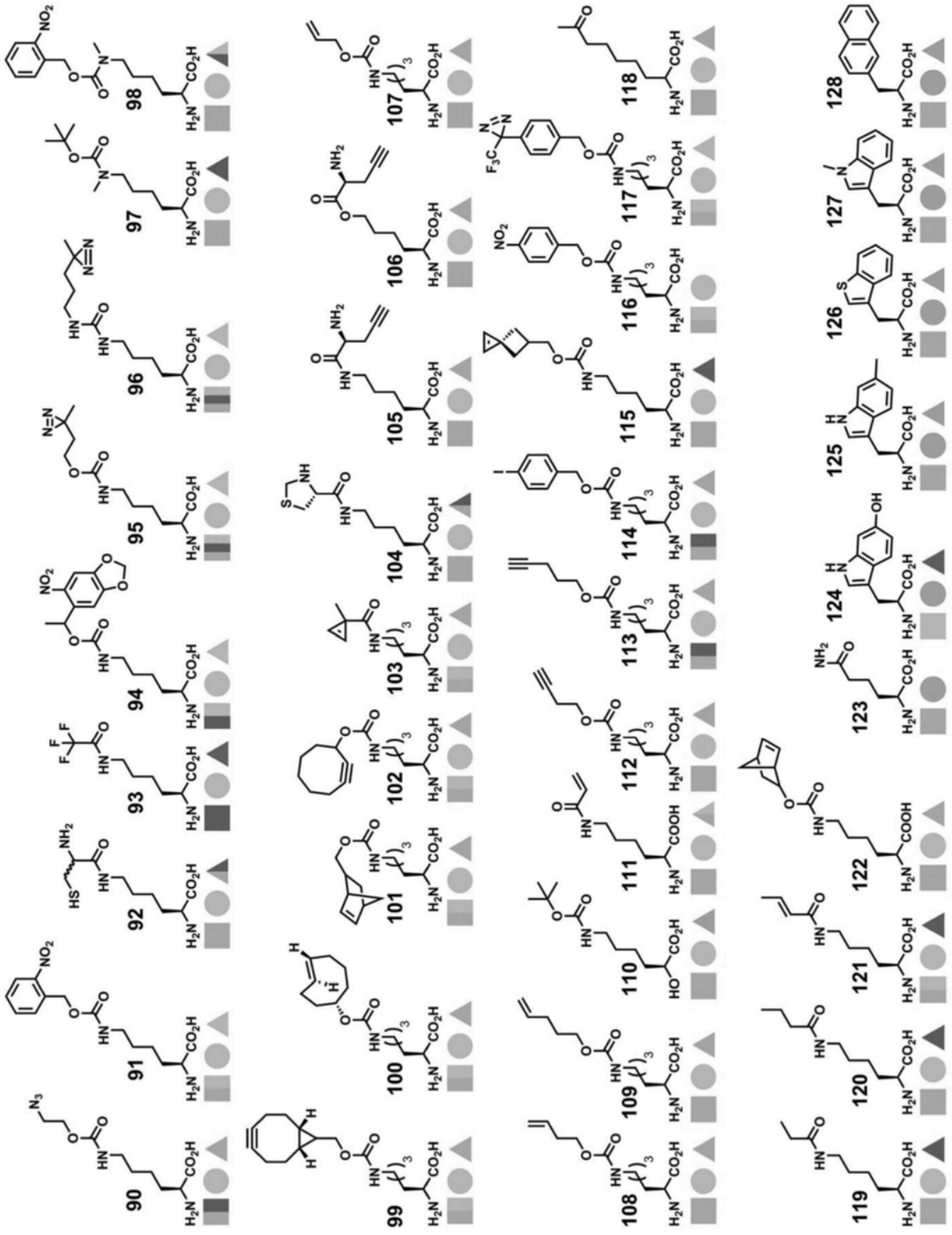


图3C

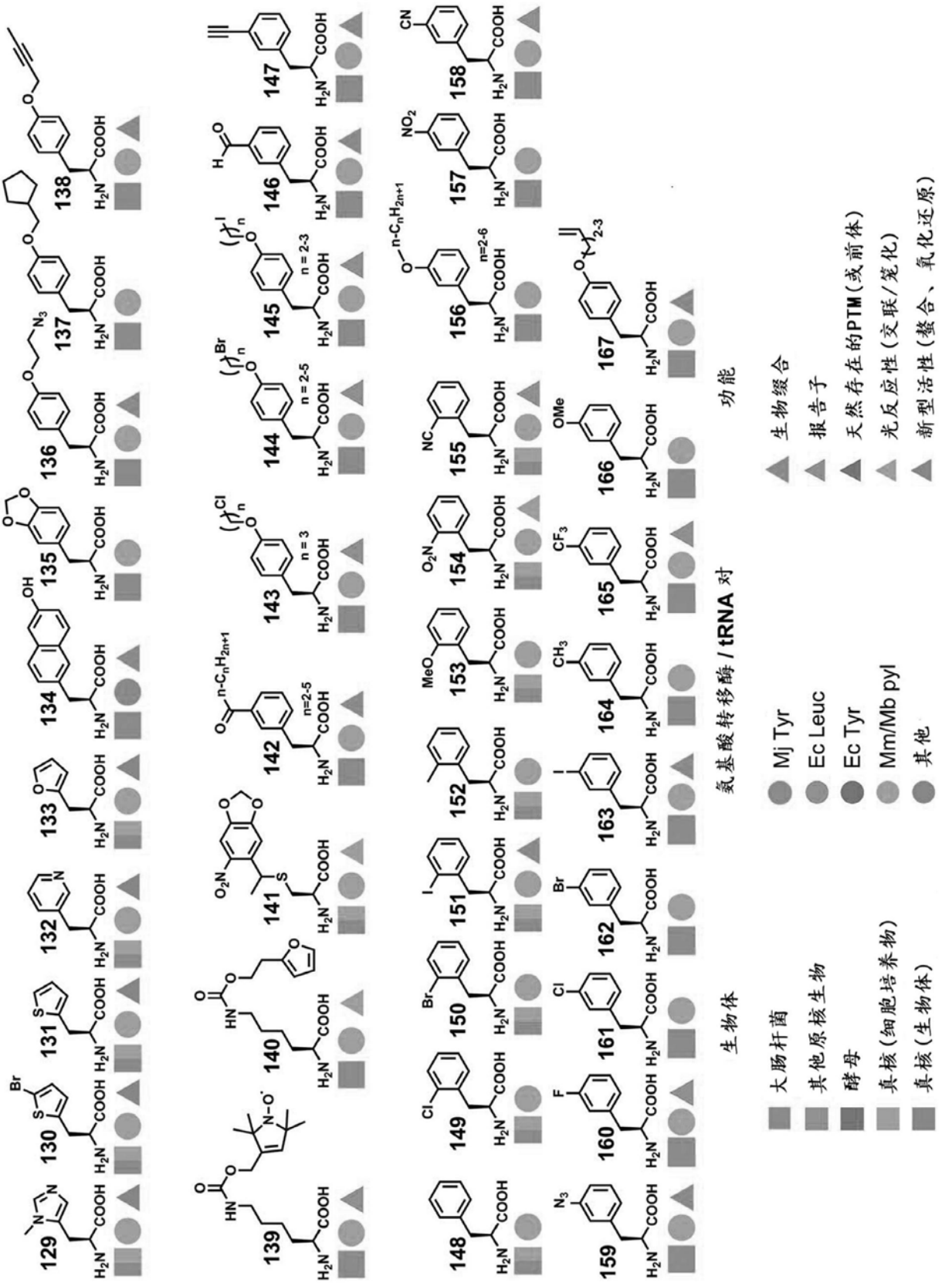

生物体
大肠杆菌
其他原核生物
酵母
真核(细胞培养物)
真核(生物体)
氨基酸转移酶 / tRNA 对
Mj Tyr
Ec Leuc
Ec Tyr
Mm/Mb pyl
其他
功能
生物缀合
报告子
天然存在的PTM(或前体)
光反应性(交联/笼化)
新型活性(整合、氧化还原)

图3D

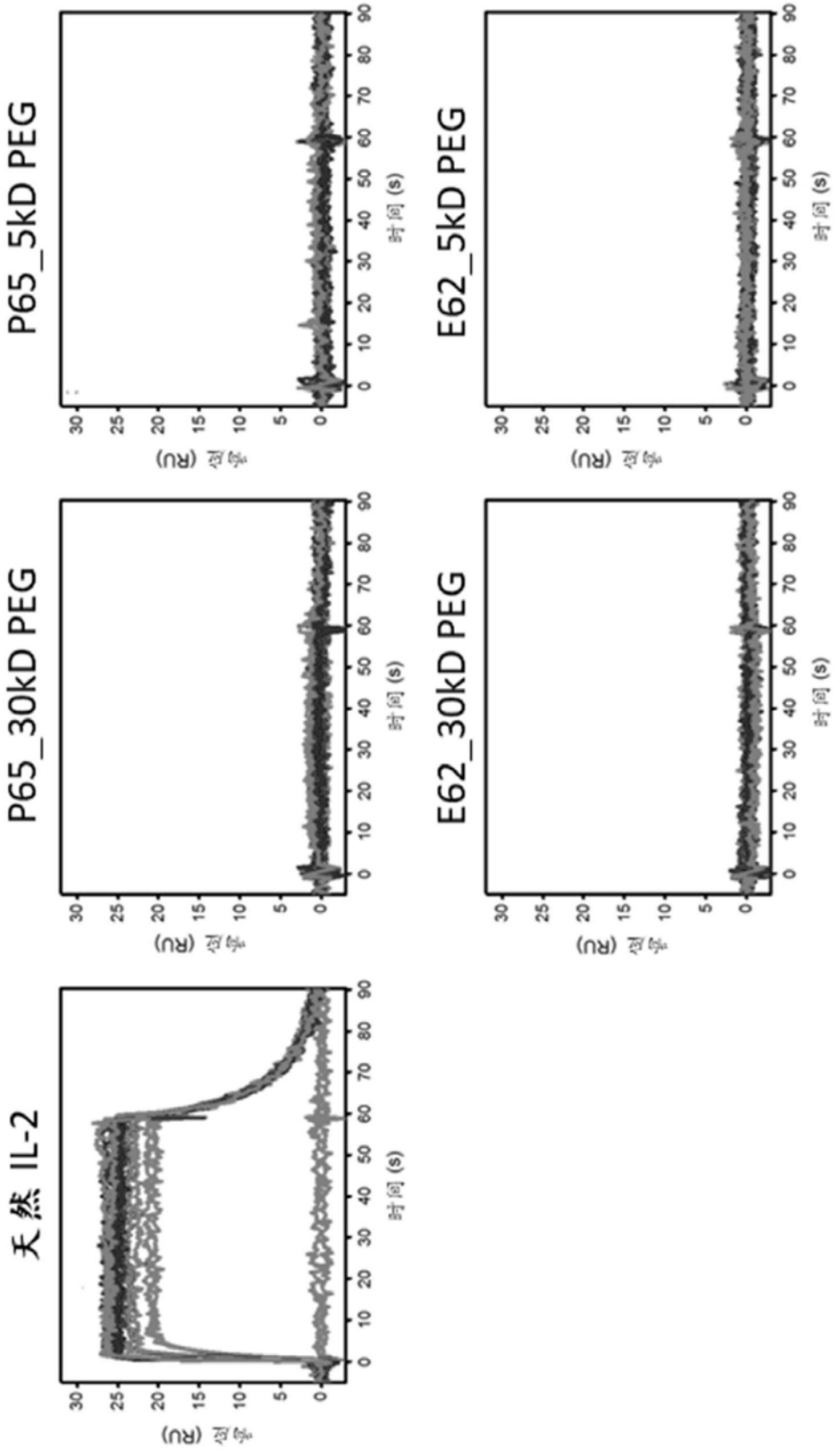

P65_5kD PEG
E62_5kD PEG
P65_30kD PEG
E62_30kD PEG
天然 IL-2
响应 (RU)
时间 (s)

图4A

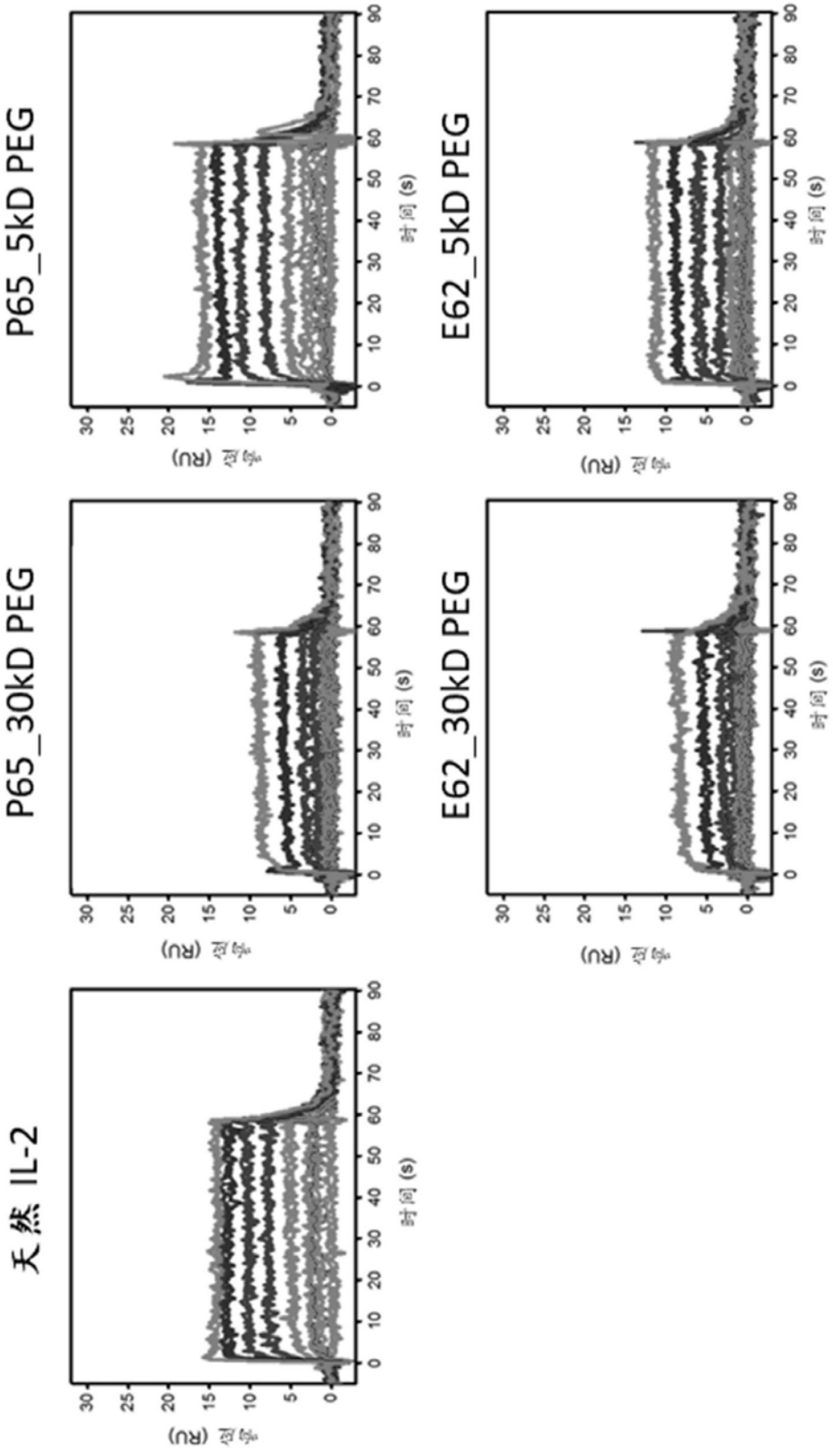

P65_5kD PEG
E62_5kD PEG
P65_30kD PEG
E62_30kD PEG
天然 IL-2
响应 (RU)
时间 (s)

图4B

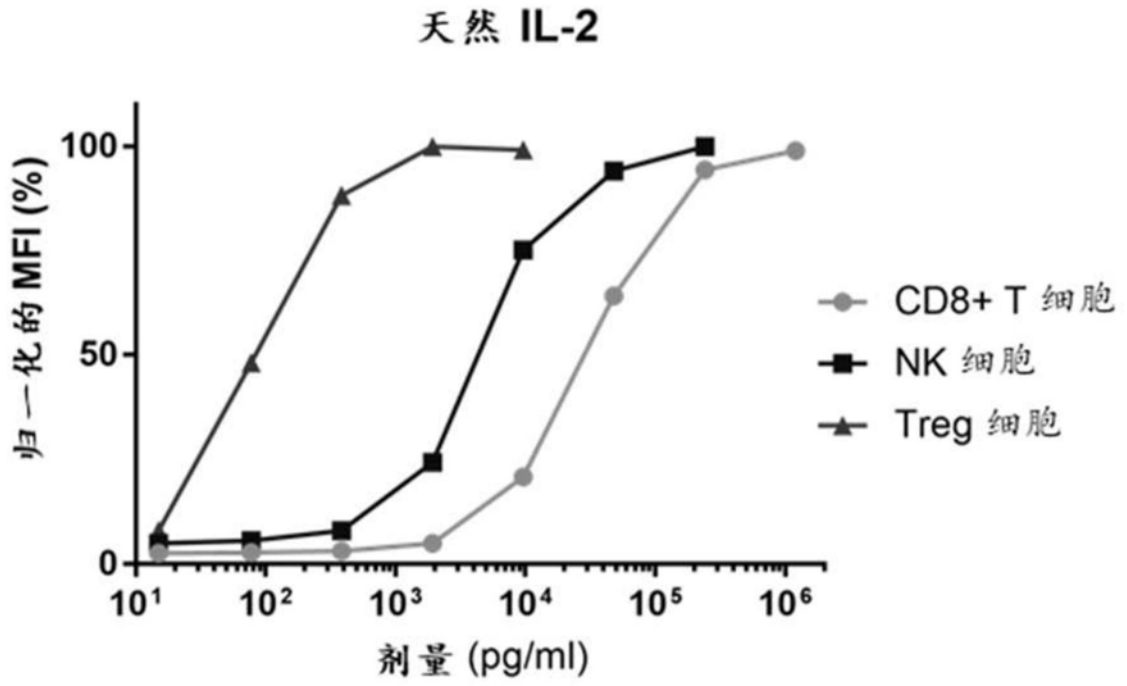

天然 IL-2
归一化的 MFI (%)
100
50
0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
剂量 (pg/ml)
CD8+ T 细胞
NK 细胞
Treg 细胞

图5A

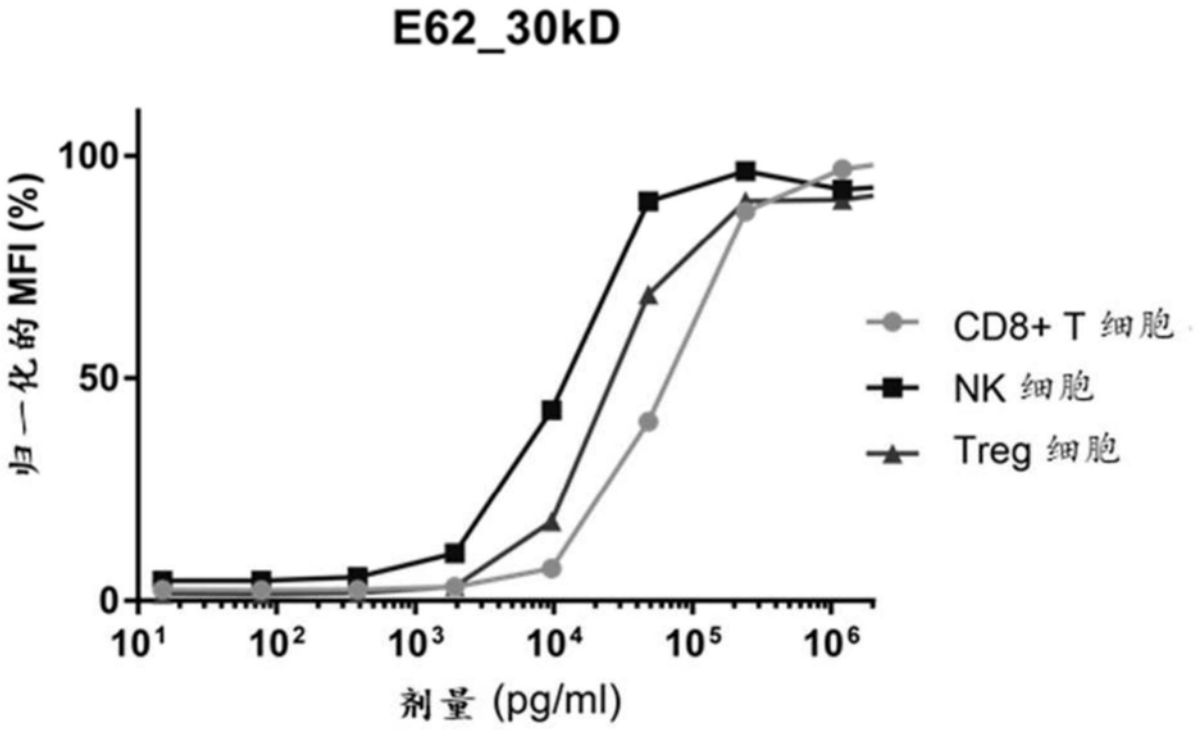

E62_30kD
归一化的 MFI (%)
100
50
0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
剂量 (pg/ml)
CD8+ T 细胞
NK 细胞
Treg 细胞

图5B

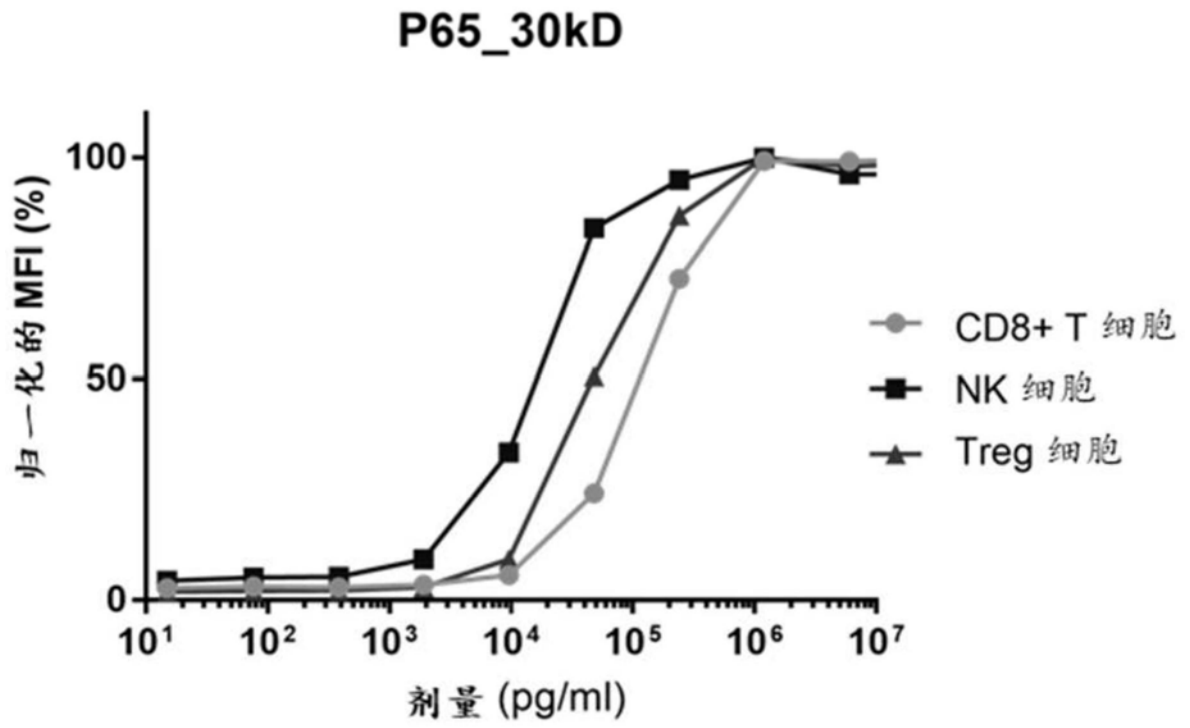


图5C

在向雌性 C57BL/6 小鼠单次静脉内推注阿地白介素或 P65_30KD 和 E62_30KD、E62_5KD 后的平均（±SD）血浆浓度-时间曲线

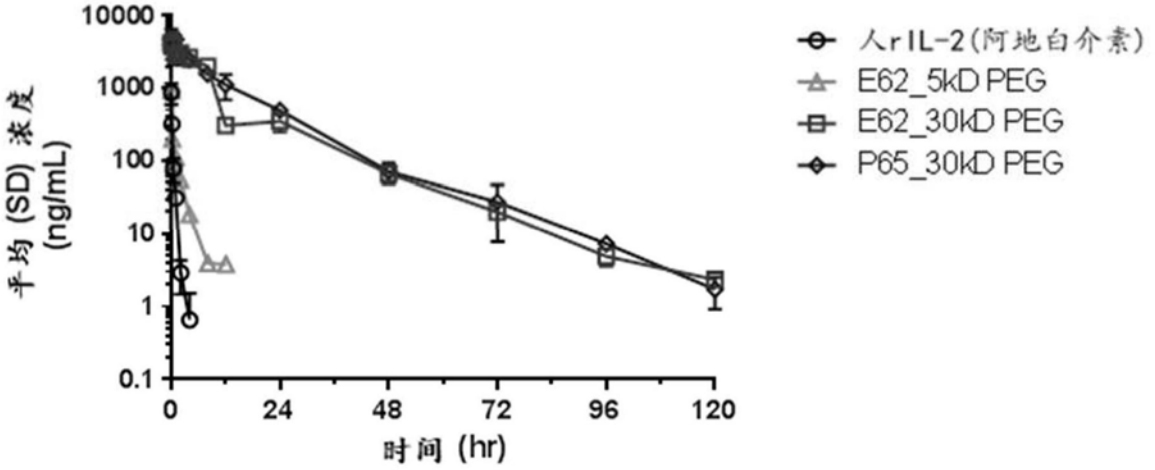


图6

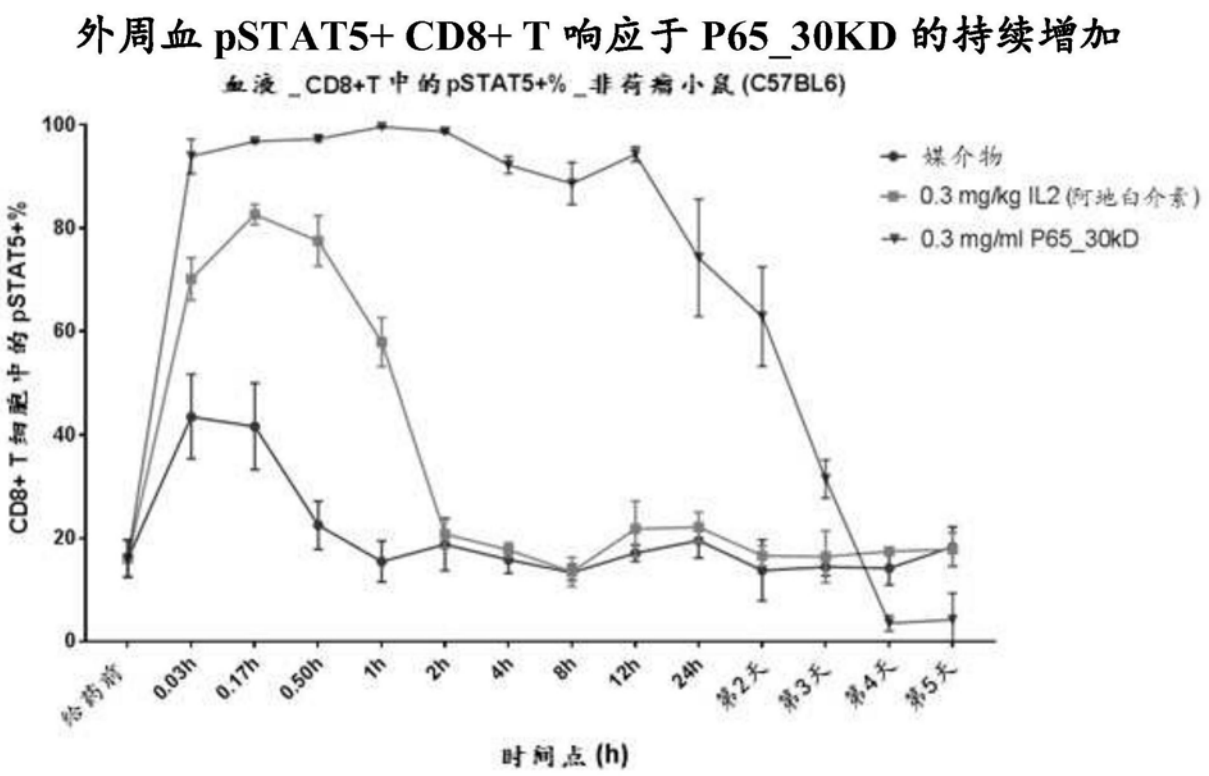

外周血 pSTAT5+ CD8+ T 响应于 P65_30KD 的持续增加
血液 _CD8+T 中的pSTAT5+% _非荷瘤小鼠(C57BL6)
媒介物
0.3 mg/kg IL2 (阿地白介素)
0.3 mg/ml P65_30kD
CD8+ T细胞中的pSTAT5+%
时间点 (h)

图7

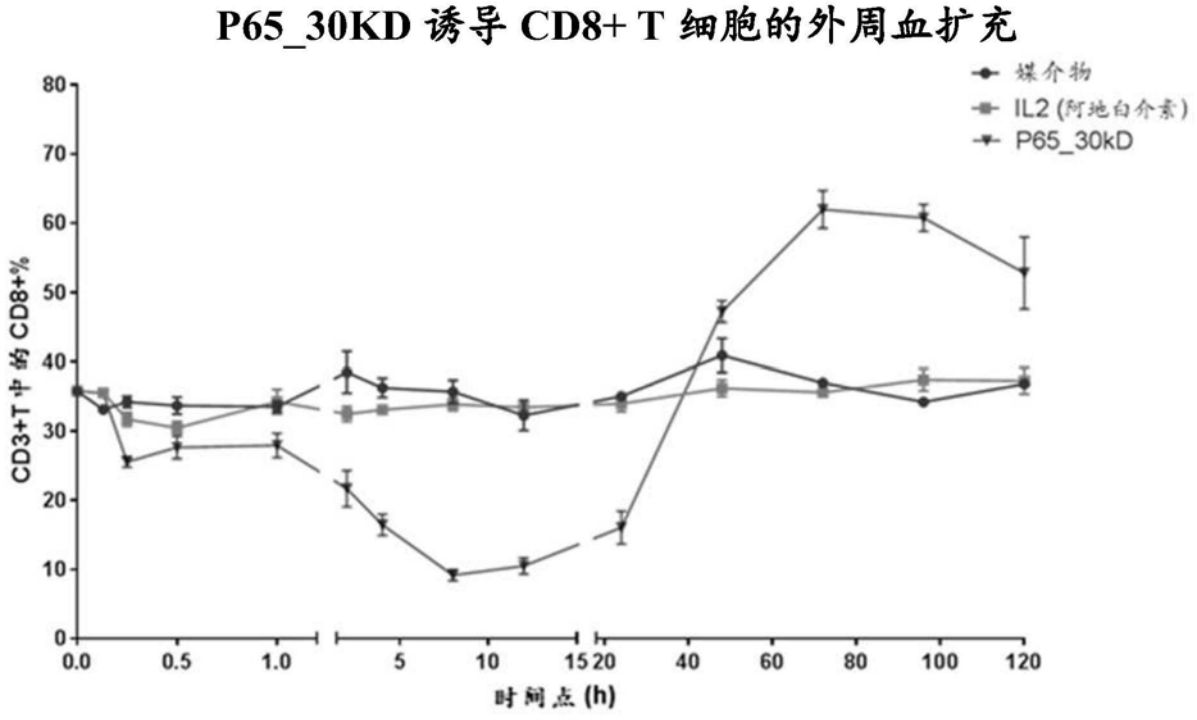

P65_30KD 诱导 CD8+ T 细胞的外周血扩充
媒介物
IL2 (阿地白介素)
P65_30kD
CD3+T 中的 CD8+%
时间点 (h)

图8A

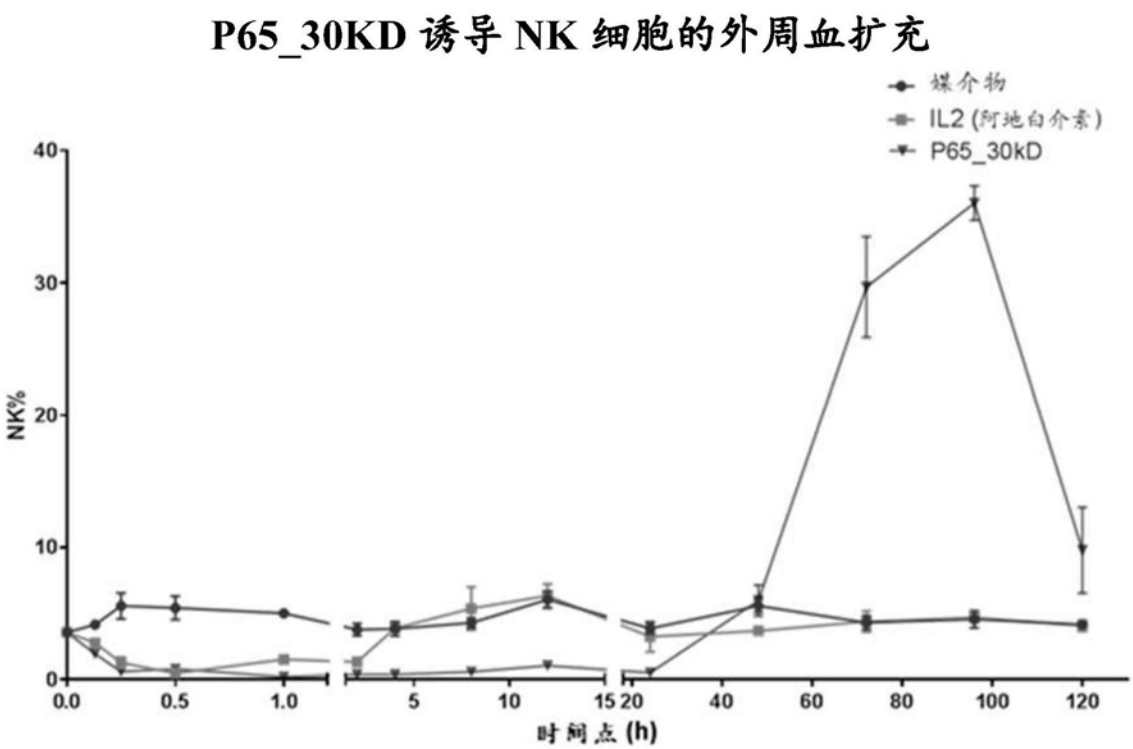

P65_30KD 诱导 NK 细胞的外周血扩充
媒介物
IL2 (阿地白介素)
P65_30kD
NK%
40
30
20
10
0
0.0
0.5
1.0
5
10
15
20
40
60
80
100
120
时间点 (h)

图8B

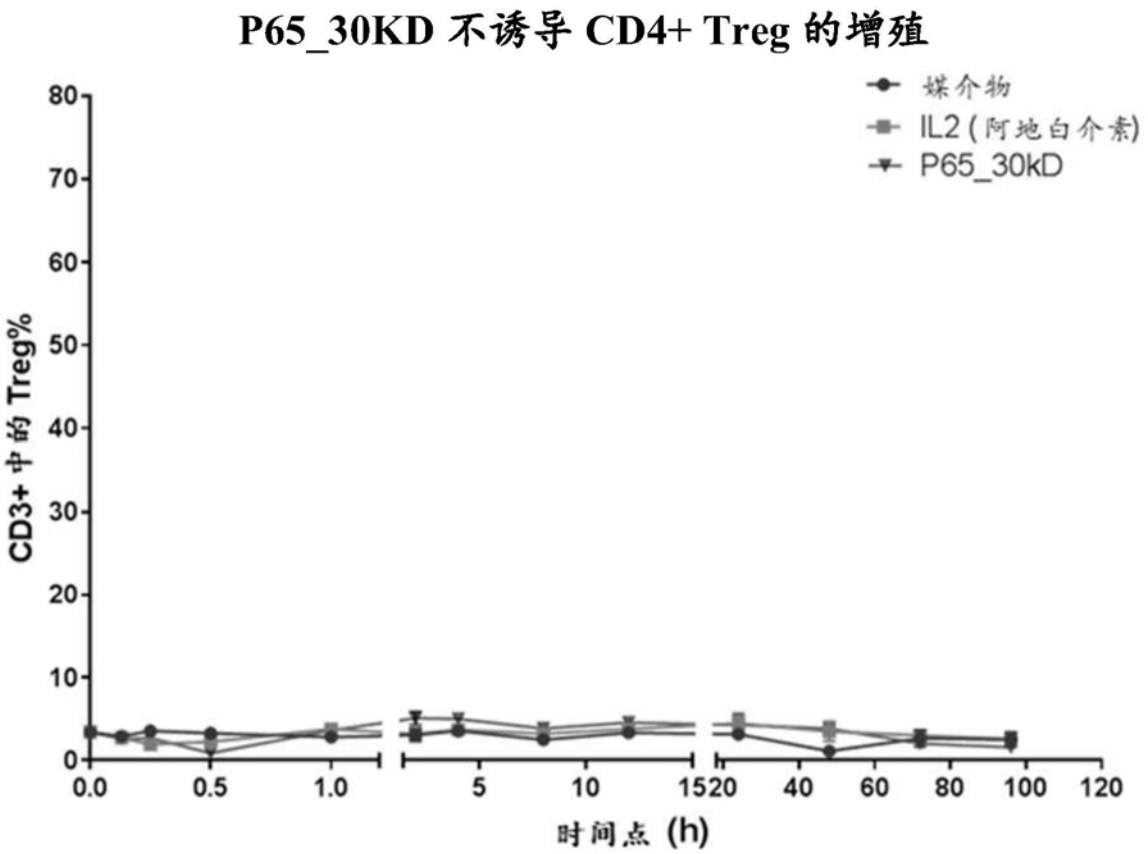

P65_30KD 不诱导 CD4+ Treg 的增殖
媒介物
IL2 (阿地白介素)
P65_30kD
CD3+ 中的 Treg%
时间点 (h)

图8C

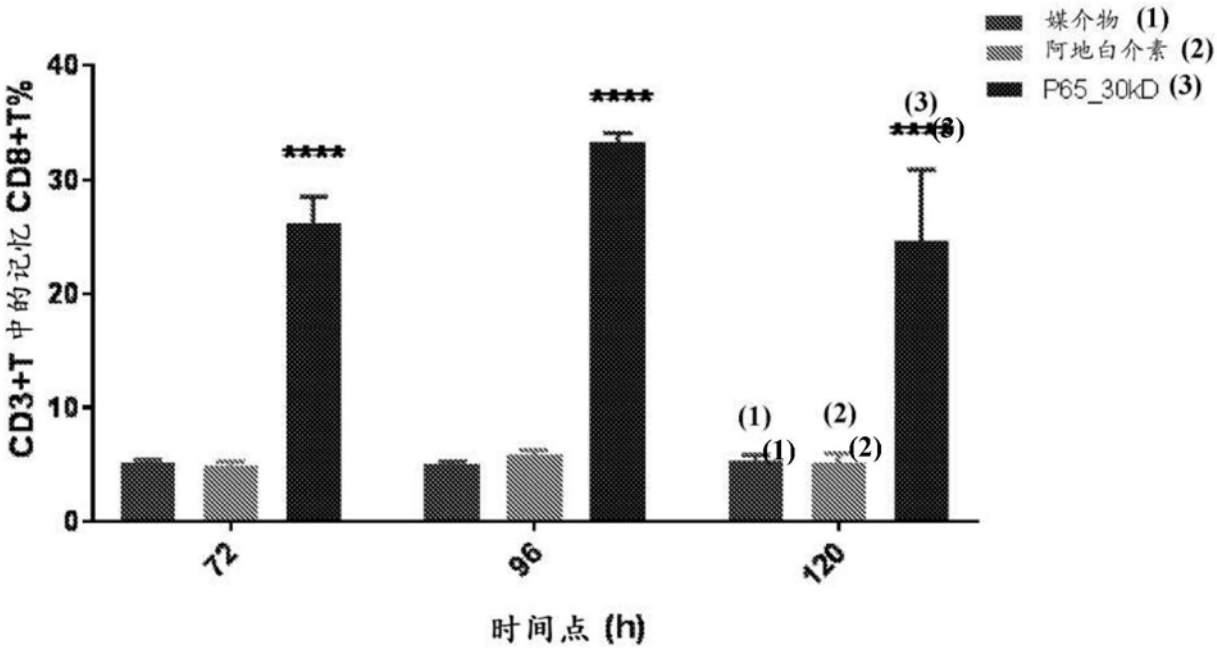

P65_30KD 诱导 CD8+ T 效应记忆细胞扩充
媒介物 (1)
阿地白介素 (2)
P65_30kD (3)
CD3+T 中的记忆 CD8+T%
时间点 (h)

图9A

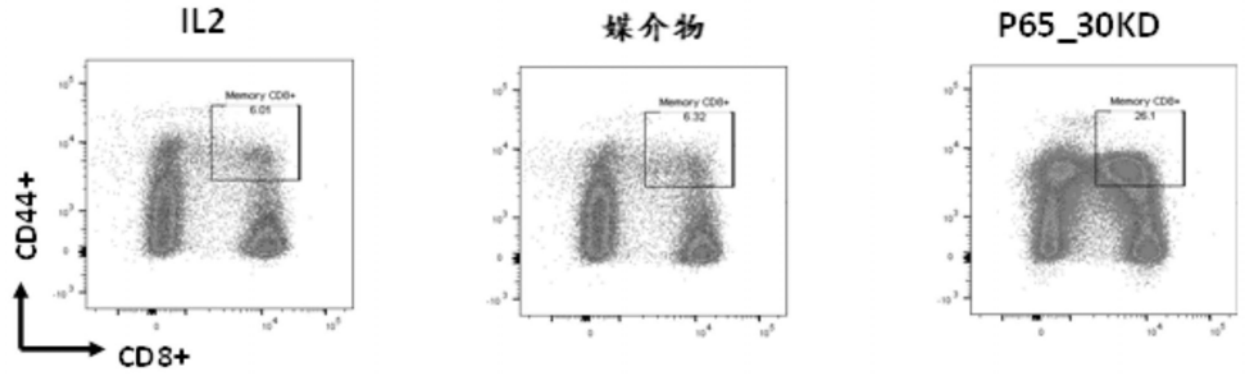

IL2
媒介物
P65_30KD
CD44+
CD8+
Memory CD8+
6.01
Memory CD8+
6.32
Memory CD8+
26.1

图9B

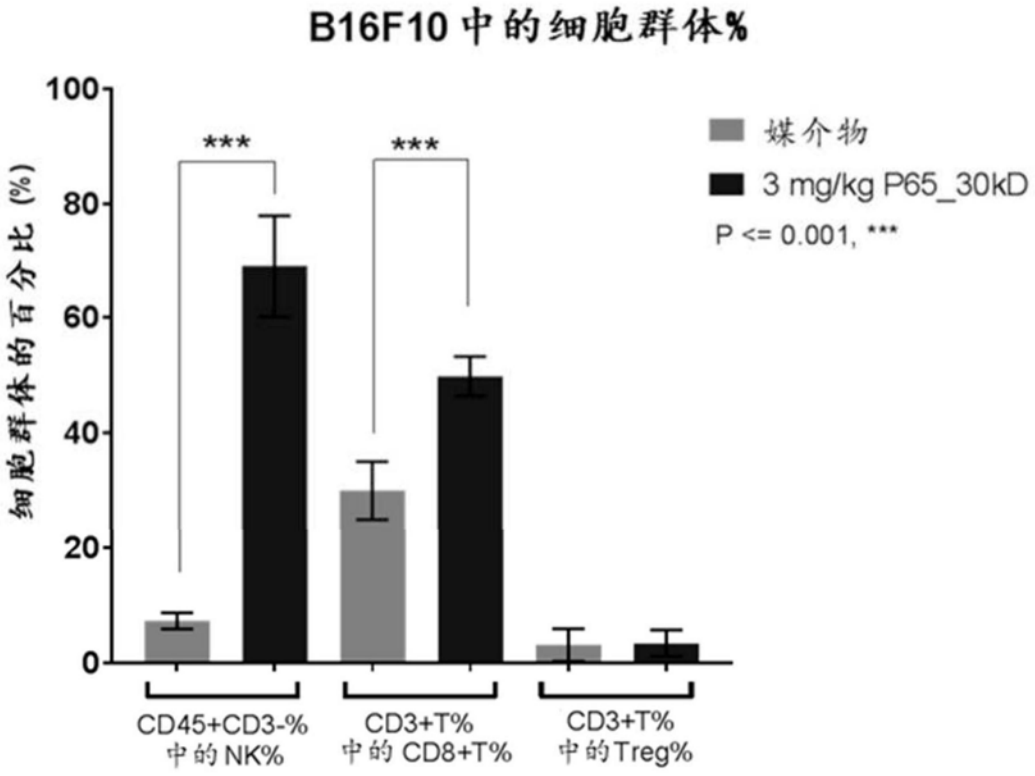

B16F10 中的细胞群体%
细胞群体的百分比 (%)
100
80
60
40
20
0
***
***
媒介物
3 mg/kg P65_30kD
P <= 0.001, ***
CD45+CD3-%
中的 NK%
CD3+T%
中的 CD8+T%
CD3+T%
中的Treg%

图10A

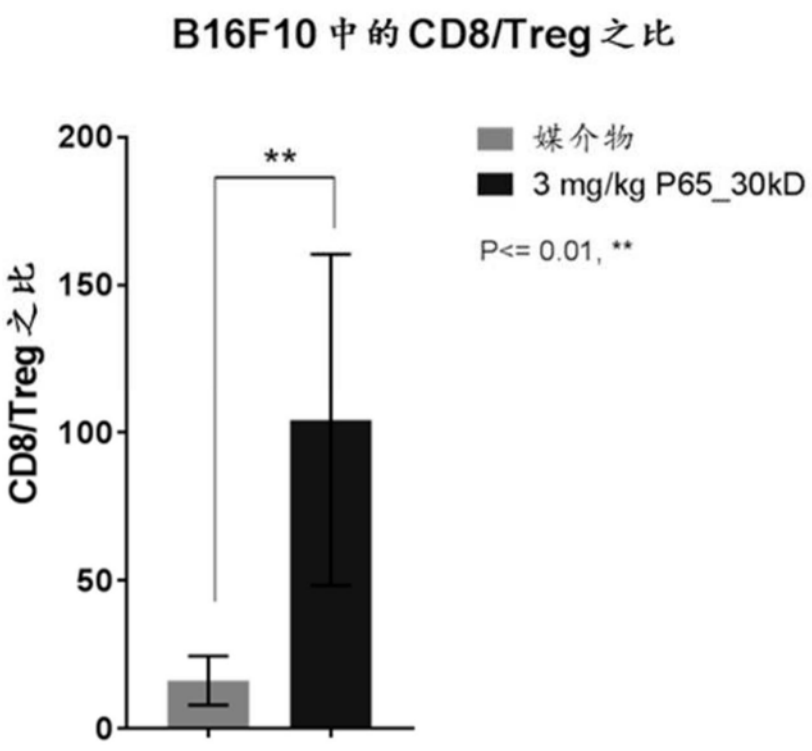

B16F10 中的 CD8/Treg 之比
CD8/Treg 之比
200
150
100
50
0
**
媒介物
3 mg/kg P65_30kD
P<= 0.01, **

图10B

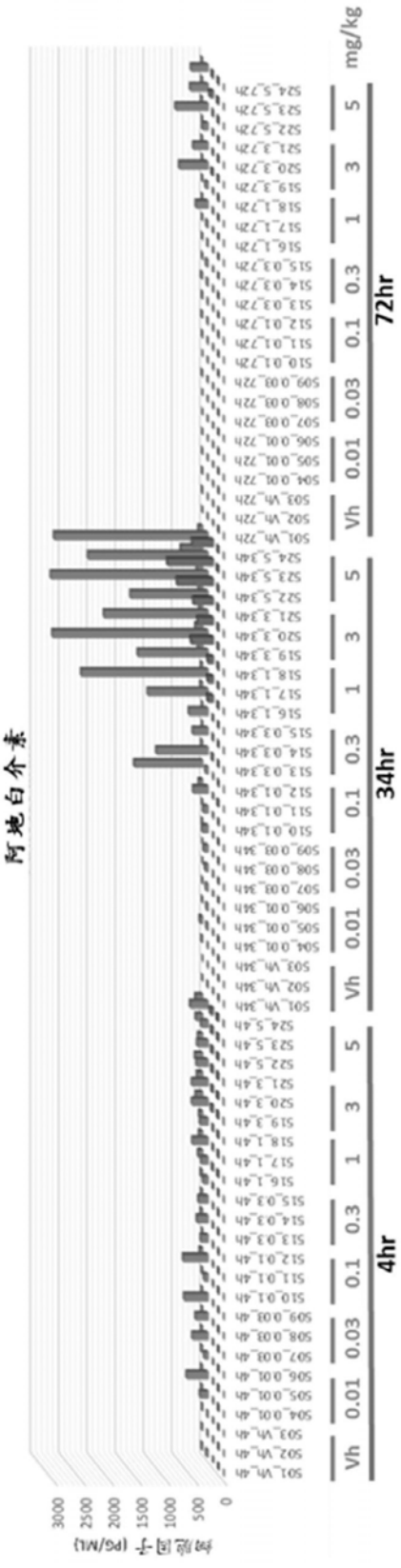

阿地白介素
mg/kg
Vh 0.01 0.03 0.1 0.3 1 3 5
4hr
34hr
72hr
细胞因子 (PG/ML)
0 500 1000 1500 2000 2500 3000

图 11A

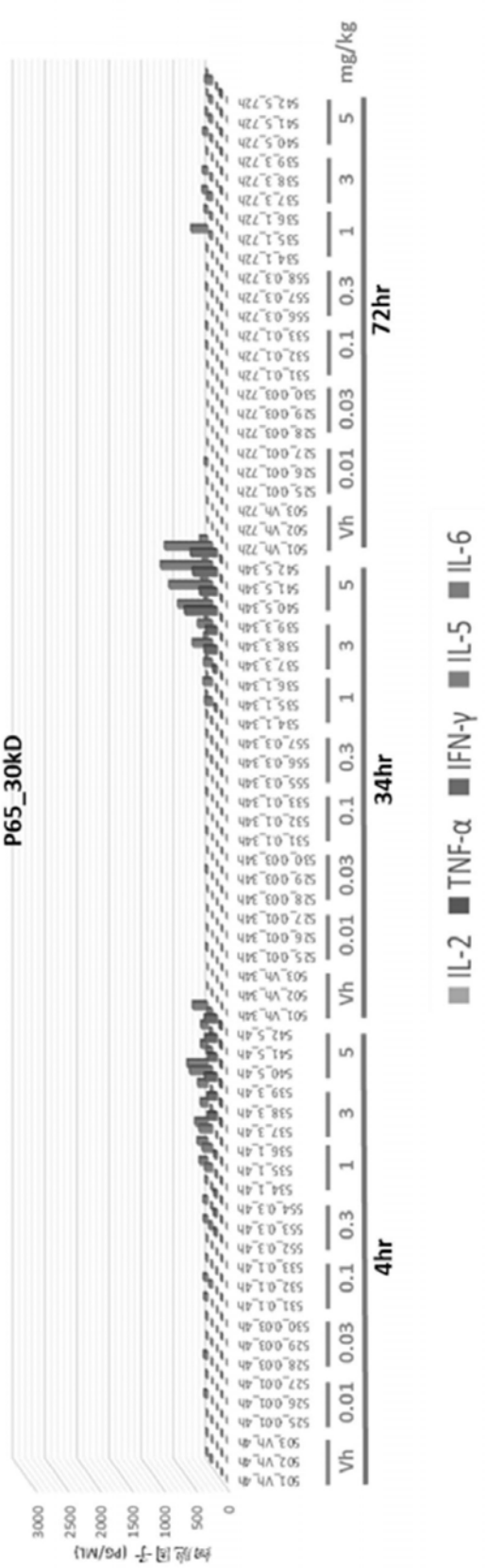

P65_30kD
mg/kg
Vh 0.01 0.03 0.1 0.3 1 3 5
4hr
34hr
72hr
IL-2 TNF-α IFN-γ IL-5 IL-6
细胞因子 (PG/ML)
0 500 1000 1500 2000 2500 3000

图 11B

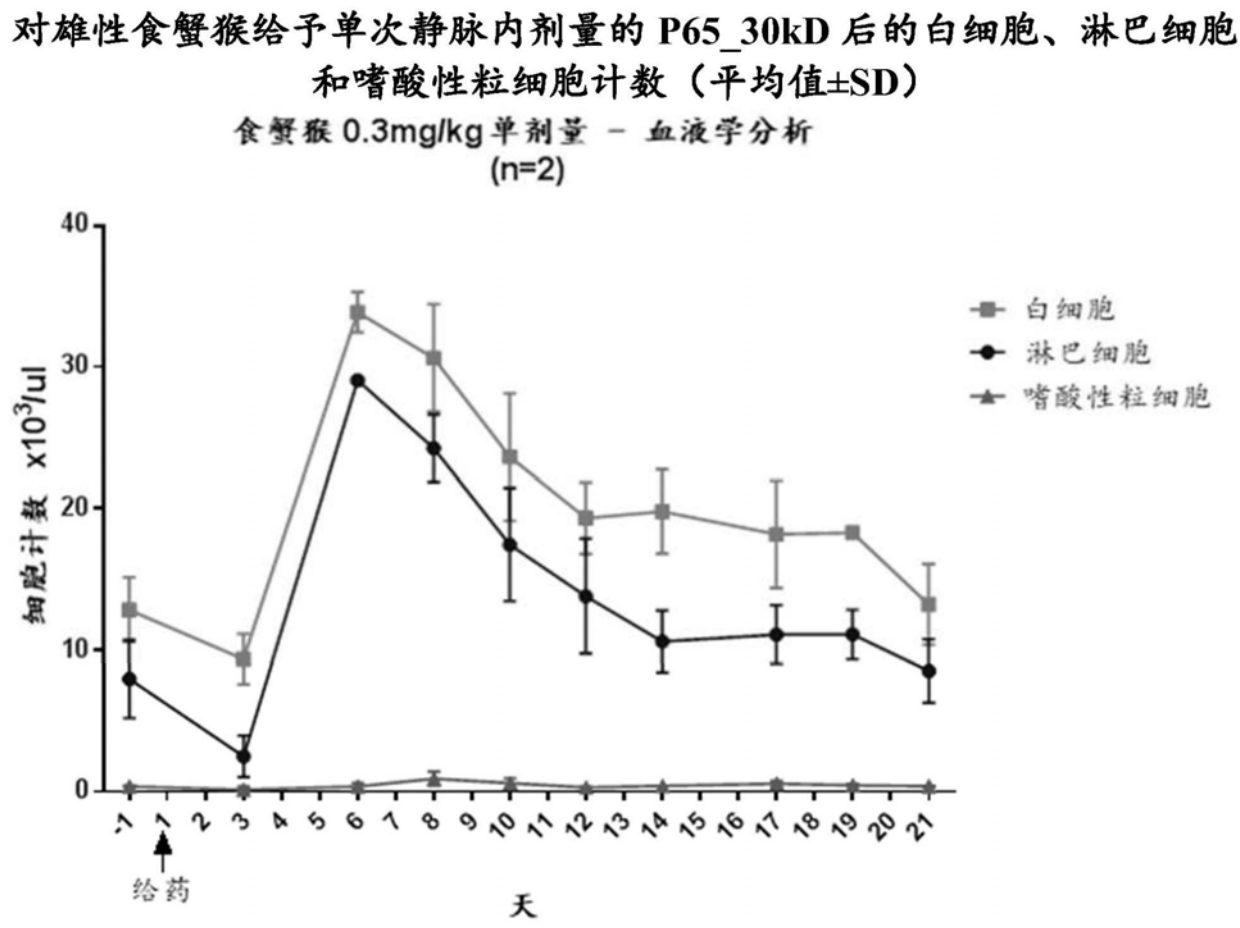

对雄性食蟹猴给予单次静脉内剂量的 P65_30kD 后的白细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞计数（平均值±SD）
食蟹猴 0.3mg/kg 单剂量 – 血液学分析
(n=2)
细胞计数 x10³/ul
40
30
20
10
0
白细胞
淋巴细胞
嗜酸性粒细胞
-1
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
给药
天

图12