(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111212661 B
(45)授权公告日 2023.09.12

(21)申请号 201980005015.8
(22)申请日 2019.09.11
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111212661 A
(43)申请公布日 2020.05.29
(30)优先权数据
62/729,925 2018.09.11 US
62/815,964 2019.03.08 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.04.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/050709 2019.09.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/056066 EN 2020.03.19
(73)专利权人 北京泰德制药股份有限公司
地址 100176 北京市大兴区北京经济技术开发区荣京东街8号
(72)发明人 陈思耕 卢迎春 哈努尔·拉希德 尼克拉斯·克努森 田丰
(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219
专利代理师 金海霞 杨青
(51)Int.Cl.
A61K 45/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 101090980 A,2007.12.19
US 2014046026 A1,2014.02.13
CN 1799625 A,2006.07.12
US 10035836 B1,2018.07.31
CN 103517718 A,2014.01.15
Deborah H. Charych等.NKTR-214, an Engineered Cytokine with Biased IL2 Receptor Binding, Increased Tumor Exposure, and Marked Efficacy in Mouse Tumor Models.《Clinical Cancer Research》.2016,第22卷(第3期),第680-690页.
审查员 夏庆鹏

权利要求书1页 说明书119页
序列表15页 附图19页

(54)发明名称

白介素-2多肽偶联物及其用途

(57)摘要

本发明提供了通过使用与影响表达白介素-2受体的细胞的生物活性分子相偶联的白介素-2(IL-2)变体来靶向表达所述白介素-2受体的细胞并特别是抑制此类细胞的生长的方法。

CN 111212661 B

1.一种包含非天然编码的氨基酸的IL-2多肽,所述IL-2多肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:2,其中所述非天然编码的氨基酸被替换在SEQ ID NO:2的第45或65位处,其中所述IL-2多肽被偶联到水溶性聚合物,其中所述水溶性聚合物被连接到所述非天然编码的氨基酸,其中所述非天然编码的氨基酸是对乙酰基苯丙氨酸,其中所述IL-2多肽与野生型IL-2相比与其IL-2Rα受体亚基的相互作用降低,其中所述水溶性聚合物是聚乙二醇(PEG),所述PEG具有10kDa至50kDa之间的分子量。

2.根据权利要求1所述的IL-2多肽,其中所述PEG具有20kDa的分子量。

3.权利要求1的IL-2多肽,其中所述PEG是直链或支链聚合物。

4.根据权利要求1所述的IL-2多肽,其中所述IL-2多肽被连接到生物活性分子。

5.根据权利要求1所述的IL-2多肽,其中所述IL-2多肽被连接到细胞毒性药剂或免疫刺激剂。

6.根据权利要求4所述的IL-2多肽,其中所述生物活性分子通过接头连接到所述IL-2多肽。

7.根据权利要求5所述的IL-2多肽,其中所述细胞毒性药剂或免疫刺激剂通过接头连接到所述IL-2多肽。

8.根据权利要求4所述的IL-2多肽,其中所述生物活性分子通过可切割或不可切割的接头连接到所述IL-2多肽。

9.根据权利要求5所述的IL-2多肽,其中所述细胞毒性药剂或免疫刺激剂通过可切割或不可切割的接头连接到所述IL-2多肽。

10.根据权利要求1至9任一项所述的IL-2多肽,其中所述IL-2多肽被糖基化。

11.一种制造根据权利要求1至10任一项所述的IL-2多肽的方法,所述方法包括将包含非天然编码的氨基酸的IL-2多肽与所述水溶性聚合物相接触。

12.一种组合物,其包含根据权利要求1至10任一项所述的IL-2多肽和可药用载体。

13.根据权利要求12所述的组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

白介素-2多肽偶联物及其用途

[0001] 对相关申请的引用

[0002] 本申请要求分别在2018年9月11日和2019年3月8日提交的各自题为“白介素-2多肽偶联物及其用途”(Interleukin-2 Polypeptide Conjugates and Their Uses)的美国临时申请号62/729,925和62/815,964的权益,每个所述临时申请的内容整体通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有通过EFS-Web以ASCII格式提交并整体通过引用并入本文的序列表。所述ASCII拷贝在2019年9月11日产生,名为AMBX_0227_PCT_ST25.txt,并且大小为27,729字节。

技术领域

[0005] 本发明提供了通过使用白介素-2(IL-2)变体来调节白介素-2的生物活性以及特别是调节特异性受体相互作用的方法,所述IL-2变体在所述IL-2蛋白的氨基酸序列中与白介素-2受体相互作用的位置处偶联到聚合物。

背景技术

[0006] 癌症是最重要的健康病症之一。在美国,癌症具有仅次于心脏病的第二大死亡率,占死亡人数的四分之一。人们普遍预计,癌症的发病率将随着美国人口的老龄化而增加,进一步加剧这种病症的影响。在1970年代和1980年代确立的当前用于癌症的治疗方案尚未发生太大变化。当在大多数晚期常见癌症中使用时,包括化疗、辐射和其他方式(包括较新的靶向疗法)在内的这些治疗显示出有限的总体生存获益,因为这些疗法主要靶向肿瘤块。

[0007] 更具体来说,迄今为止,常规的癌症诊断和疗法试图选择性地检测并根除主要是快速生长的赘生性细胞(即形成肿瘤块的细胞)。标准的肿瘤学治疗方案通常主要被设计成给药没有过度的毒性的最高剂量的辐射或化学治疗剂,即通常被称为“最大耐受剂量”(MTD)或“未观察到不良反应的水平”(NOAEL)。许多常规癌症化疗(例如烷基化药剂如环磷酰胺、抗代谢药如5-氟尿嘧啶和植物生物碱如长春新碱)和常规放疗主要通过干扰参与细胞生长和DNA复制的细胞机制来发挥它们对癌细胞的毒性效应。化疗方案通常还包括给药化学治疗剂的组合以试图提高治疗功效。尽管可以获得大量不同的化学治疗剂,但这些疗法具有许多缺点。例如,由于对不论是正常还是恶性的快速生长的细胞的非特异性副作用,化学治疗剂众所周知是有毒的;例如,化学治疗剂引起显著且通常是危险的副作用,包括骨髓抑制、免疫抑制和胃肠道不适等。

[0008] 癌症干细胞

[0009] 癌症干细胞包含肿瘤的独特子群体(通常为0.1-10%左右),其相对于其余90%左右的肿瘤(及肿瘤块)来说具有更高的肿瘤原性,生长相对更慢或沉寂,并且与肿瘤块相比通常相对更具化疗耐药性。考虑到常规疗法和方案大部分被设计成攻击快速增殖的细胞(即构成肿瘤块的那些癌细胞),因此与快速生长的肿瘤块相比通常生长缓慢的癌症干细胞

可能对常规疗法和方案相对更有抗性。癌症干细胞可以表现出使它们相对更具化疗耐药性的其他特点，例如多药耐药性和抗凋亡途径。上述因素构成了标准肿瘤治疗方案未能在具有晚期癌症的大多数患者中确保长期益处，即未能足够地靶向并根除癌症干细胞的关键原因。在某些情况下，癌症干细胞是肿瘤的生成细胞(即它是构成肿瘤块的癌细胞的祖先)。

[0010] IL-2已被用于治疗几种癌症，例如肾细胞癌和转移性黑素瘤。可商购的IL-2 Aldesleukin®是一种重组蛋白，其是非糖基化的，具有移除的丙氨酸-1并用丝氨酸-125代替残基半胱氨酸-125(Whittington等，1993)。尽管IL-2是癌症治疗中最早的FDA批准的细胞因子，但已显示IL-2在以高剂量使用时表现出严重副作用。这极大限制了它在潜在患者上的应用。所述严重副作用的潜在机制已被归因于IL-2与其受体之一IL-2Rα的结合。通常，IL-2不仅可以与其包括IL-2Rα(或CD25)、IL-2Rβ(或CD122)和IL-2Rγ(或CD132)(当所有三种受体存在于组织中时)在内的受体形成异三聚体复合物，而且可以与IL-2Rβ和IL-2Rγ形成异二聚体复合物。在临床背景中，当使用高剂量IL-2时，IL-2开始结合IL-2αβγ，其是T_{reg}细胞中的主要受体形式。T_{reg}细胞的抑制效应引起在癌症免疫疗法中应用IL-2的不想要的效应。为了减轻IL-2的副作用，以前已使用了许多方法。Nektar制造了一种形式的IL-2，其使用6个PEG化的赖氨酸来掩蔽IL-2表面上的IL2Rα结合区(Charych等，2016)。这种PEG化的IL-2形式具有延长的半衰期，包含单和多PEG化的形式的混合物，含有非常大量的PEG，而且显示出改善的副作用。然而，来自于活性研究的结果显示，在这种非均质6-PEG化的IL-2混合物中有效的PEG化的IL-2形式是仅仅单PEG化的形式。因此，需要调节IL-2的副作用的具有均质的明确的产物组成的更有效的PEG化的IL-2。

[0011] 将非遗传编码的氨基酸并入到蛋白质中的能力允许引入可以为天然存在的官能团例如赖氨酸的ε-NH_2、半胱氨酸的巯基-SH、组氨酸的亚氨基等提供有价值的替选物的化学官能团。某些化学官能团已知对20种常见的遗传编码的氨基酸中存在的官能团是惰性的，但干净高效地反应形成稳定的键。例如，在本领域中已知叠氮基和乙炔基在水性条件下，在催化量的铜存在下经历Huisgen[3+2]环加成反应。参见例如Tornoe等，(2002)J.Org.Chem.67:3057-3064;和Rostovtsev等，(2002)Angew.Chem.Int.Ed.41:2596-2599。通过例如在蛋白质结构中引入叠氮基组成部分，人们能够并入对蛋白质中存在的胺、巯基、羧酸、羟基化学惰性，但与乙炔组成部分顺利且高效地反应以形成环加成产物的官能团。重要的是，在不存在乙炔组成部分的情况下，所述叠氮基在其他蛋白质侧链存在下和生理条件下保持化学惰性和无反应性。

[0012] 除了其他问题之外，本发明致力于解决与IL-2多肽偶联物的活性和生产相关的问题，并且也致力于生产具有改进的生物或药理性能例如对肿瘤的提高的活性和/或改进的偶联和/或改进的治疗半衰期的IL-2多肽。本发明的IL-2多肽靶向已知表达三聚体IL-2受体(α、β和γ)的Treg细胞和主要表达IL-2受体的β和γ二聚体的CD8细胞两者。本发明的IL-2多肽减少与Treg细胞的α受体的结合并促进与CD8细胞的β和γ二聚体的偏倚性结合，从而为IL-2受体α在其中高表达的疾病或病症提供了改进的治疗应用和改进的预后。

发明内容

[0013] 本发明涉及具有一个或多个非天然编码的氨基酸的白介素-2(IL-2)多肽。本发明还涉及具有一个或多个非天然编码的氨基酸的IL-2多肽偶联物。本发明还涉及一种IL-2多

肽偶联物，其中水溶性聚合物例如PEG通过所述IL-2变体内的一个或多个非天然编码的氨基酸偶联到所述IL-2变体。本发明还涉及具有一个或多个非天然编码的氨基酸和一个或多个天然氨基酸替换的IL-2多肽偶联物。本发明还涉及具有一个或多个非天然编码的氨基酸和一个或多个天然氨基酸替换和一个或多个PEG分子的IL-2多肽偶联物。

[0014] 本发明提供了调节本发明的IL-2多肽的受体相互作用的方法。本发明提供了使用本发明的PEG化的IL-2多肽抑制或降低PEG化的IL-2与三聚体IL-2受体的IL2Rα亚基的相互作用的方法。

[0015] 在一个实施方式中，所述PEG-IL-2被单聚乙二醇化。在一个实施方式中，所述PEG-IL-2被二聚乙二醇化。在一个实施方式中，所述PEG-IL-2具有附连到它的超过两个(2)聚乙二醇分。本发明的另一个实施方式提供了使用本发明的PEG-IL-2多肽来调节免疫系统的细胞的活性的方法。

[0016] 在本发明的这个或任何实施方式中，所述PEG-IL-2可以包含连接到PEG聚合物的全长、成熟(缺少信号肽)的人白介素-2。在本发明的这个或任何实施方式中，所述PEG-IL-2可以包含通过共价键连接到PEG聚合物或其他生物活性分子的全长、成熟(缺少信号肽)的人白介素-2。在某些实施方式中，所述生物活性分子被修饰，作为非限制性实例所述生物活性分子可以包括一个或多个非天然编码的氨基酸。

[0017] 在PEG-IL2偶联物中，所述PEG或其他水溶性聚合物可以被直接地或通过接头偶联到所述IL-2蛋白或所述生物活性分子。适合的接头包括例如可切割和不可切割的接头。

[0018] 本发明提供了一种通过给药有效量的PEG-IL-2多肽在哺乳动物中治疗癌症的方法，所述哺乳动物例如为包括但不限于具有一种或多种下述病症的那些的哺乳动物：实体肿瘤，血液肿瘤，结肠癌，卵巢癌，乳腺癌，黑素瘤，肺癌，成胶质细胞瘤和白血病。在某些实施方式中，所述癌症以高水平的Treg细胞为特征。在某些实施方式中，所述癌症以IL-2受体α的高表达为特征。在某些实施方式中，本发明提供了一种通过向对象给药有效量的包含本发明的IL-2多肽的组合物来治疗癌症或病症或疾病的方法。在某些实施方式中，本发明提供了一种通过向患者给药有效量的本发明的IL-2组合物来治疗遗传病的方法。在某些实施方式中，所述病症或疾病以IL-2受体α的高表达为特征。在某些实施方式中，所述病症或疾病以高水平的Treg细胞为特征。在某些实施方式中，所述癌症、病症或疾病通过降低、阻断或沉默IL-2受体α的表达来治疗。在某些实施方式中，所述癌症、病症或疾病通过减少IL-2受体α在Treg细胞表面上的结合，导致在所述待治疗的癌症、病症或疾病中Treg细胞增殖的减少来治疗。

[0019] 当在本文中使用时，白介素2或IL-2被定义为具有下述性质的蛋白质：(a)具有与IL-2(包括IL-2突变蛋白质、成熟IL-2序列(即缺少分泌性前导序列)和在本申请的SEQ ID NO:1、2、3、5或7中所公开的IL-2)的已知序列基本上一致的氨基酸序列，和(b)具有本源或野生型IL-2共有的至少一种生物活性。出于本发明的目的，糖基化(例如在真核细胞如酵母或CHO细胞中生产的)和非糖基化(例如化学合成或在大肠杆菌(E.coli)中生产的)的IL-2两者是等同的，并且可以互换使用。还包括保留IL-2的生物活性的其他突变体和其他类似物，包括病毒IL-2。

[0020] 本发明提供了偶联到一个或多个水溶性聚合物的IL-2多肽，其中所述PEG化的IL-2多肽也连接到另一种药物或生物活性分子，并且其中所述IL-2多肽包含一个或多个非天

然编码的氨基酸。本发明还提供了IL-2多肽的单体和二聚体。本发明还提供了IL-2多肽的三聚体。本发明提供了IL-2多肽的多聚体。本发明还提供了包含一个或多个非天然编码的氨基酸的IL-2二聚体。本发明提供了包含一个或多个非天然编码的氨基酸的IL-2多聚体。本发明提供了包含一个或多个非天然编码的氨基酸的均质的IL-2多聚体，其中每个IL-2多肽具有相同的氨基酸序列。本发明提供了非均质的IL-2多聚体，其中至少一个所述IL-2多肽包含至少一个非天然编码的氨基酸，其中所述多聚体中的任一或每个IL-2多肽可以具有不同的氨基酸序列。

[0021] 在某些实施方式中，所述IL-2多肽包含一个或多个翻译后修饰。在某些实施方式中，所述IL-2多肽被连接到接头、聚合物或生物活性分子。在某些实施方式中，所述IL-2单体是均质的。在某些实施方式中，所述IL-2二聚体是均质的。在某些实施方式中，所述IL-2多聚体被偶联到一个水溶性聚合物。在某些实施方式中，所述IL-2多聚体被偶联到两个水溶性聚合物。在某些实施方式中，所述IL-2多聚体被偶联到三个水溶性聚合物。在某些实施方式中，所述IL-2多聚体被偶联到超过三个水溶性聚合物。在某些实施方式中，所述IL-2多肽被连接到长得足以允许二聚体形成的接头。在某些实施方式中，所述IL-2多肽被连接到长得足以允许三聚体形成的接头。在某些实施方式中，所述IL-2多肽被连接到长得足以允许多聚体形成的接头。在某些实施方式中，所述IL-2多肽被连接到双官能聚合物、双官能接头或至少一个另外的IL-2多肽。在某些实施方式中，所述IL-2多肽包含一个或多个翻译后修饰。在某些实施方式中，所述IL-2多肽被连接到接头、聚合物或生物活性分子。

[0022] 在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸被连接到水溶性聚合物。在某些实施方式中，所述水溶性聚合物包含聚乙二醇(PEG)组成部分。在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸使用接头连接到所述水溶性聚合物或被键合到所述水溶性聚合物。在某些实施方式中，所述聚乙二醇分子是双官能聚合物。在某些实施方式中，所述双官能聚合物被连接到第二多肽。在某些实施方式中，所述第二多肽是IL-2。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体包含连接到包含聚乙二醇组成部分的水溶性聚合物的至少两个氨基酸。在某些实施方式中，至少一个氨基酸是非天然编码的氨基酸。

[0023] 在一个实施方式中，本发明的IL-2或PEG-IL-2被连接到治疗性药剂例如免疫调节剂。所述免疫调节剂可以是对免疫细胞发挥治疗作用的任何药剂，其可用作治疗性药剂用于偶联到IL-2、PEG-IL-2或IL-2变体。

[0024] 在某些实施方式中，一个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体的一个或多个下述位置中：第1位之前(即在N-端处)，第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133位，或被添加到所述蛋白质的羧基端，及其任何组合(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸)。在某些实施方式中，一个或多个生物活性分子被直接偶联到所述IL-2变体。在某些实施方式中，所述一个或多个生物活性分子被偶联到所述IL-2多肽中的所述一个或多个非天然编码的氨基酸。在某些实施方式中，本发明的IL-2变体被连接到接

头。在某些实施方式中，所述连接到接头的IL-2变体还包含生物活性分子。在本发明的某些实施方式中，所述接头被连接到非天然编码的氨基酸。

[0025] 在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中：第3、32、35、37、38、42、43、44、45、48、49、61、62、64、65、68、72、76和107位，及其任何组合(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中：第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72和107位之前，及其任何组合(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸)。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中：第35、37、42、45、49、61或65位，及其任何组合(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中：第45、61和65位，及其任何组合(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中：第45和65位，及其任何组合(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第3位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第32位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第35位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第37位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第38位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第41位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第42位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第43位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第44位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第45位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第48位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第49位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第61位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第62位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第64位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第65位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第68位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第72位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第76位处。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到本发明的IL-2或其变体中的第107位处。

[0026] 在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到对应于IL-2或其变体中如下所述的二级结构或特定氨基酸的一个或多个下述区域中的任何位置处：在疏水相

互作用的位点处;在与IL-2受体亚基(包括IL2Rα)相互作用的位点处或附近;在第3或第35至45氨基酸位置内;在前107个N-端氨基酸内;在第61-72氨基酸位置内;每个所述位置为SEQ ID NO:2的位置或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置。在某些实施方式中,一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体的一个或多个下述位置处:SEQ ID NO:2的第1位之前(即在N-端处),第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43位,及其任何组合;或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸。在某些实施方式中,一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体的一个或多个下述位置处:SEQ ID NO:2的第44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133位,或添加到所述蛋白质的羧基端,及其任何组合;或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸。

[0027] 在某些实施方式中,在IL-2或其变体中的一个或多个这些位置处的所述非天然存在的氨基酸被连接到药物或其他生物活性分子,所述位置包括但不限于下述位置:第1位之前(即在N-端处),第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133位,或添加到所述蛋白质的羧基端,及其任何组合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸)。

[0028] 在某些实施方式中,在IL-2或其变体中的一个或多个这些位置处的所述非天然存在的氨基酸被连接到药物或其他生物活性分子,所述位置包括但不限于在疏水相互作用的位点处,在与IL-2受体亚基(包括IL2Rα)相互作用的位点处或附近,在第3或35至45氨基酸位置内,在前107个N-端氨基酸内,在第61-72氨基酸位置内;每个所述位置是SEQ ID NO:2的位置或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置。在某些实施方式中,在IL-2或其变体中的一个或多个这些位置处的所述非天然存在的氨基酸被连接到药物或其他生物活性分子,所述位置包括但不限于下述位置:SEQ ID NO:2的第1位之前(即在N-端处),第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43位,及其任何组合;或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸。在某些实施方式中,在IL-2或其变体中的一个或多个这些位置处的所述非天然存在的氨基酸被连接到药物或其他生物活性分子,所述位置包括但不限于IL-2或其变体的下述位置:SEQ ID NO:2的第44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133位,或添加到所述蛋白质的羧基端,及其任何组合;或SEQ IDNO:3、5或7中的相应氨基酸。在某些实施方式中,一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或

其变体中的一个或多个下述位置中并连接到药物或其他生物活性分子:第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72和107位,及其任何组合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸)。

[0029] 在某些实施方式中,在IL-2或其变体中的一个或多个这些位置处的所述非天然存在的氨基酸被连接到接头,所述位置包括但不限于下述位置:第1位之前(即在N-端处),第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133位,或添加到所述蛋白质的羧基端,及其任何组合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸)。在某些实施方式中,一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中并连接到接头:第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72和107位,及其任何组合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸)。

[0030] 在某些实施方式中,在IL-2或其变体中的一个或多个这些位置处的所述非天然存在的氨基酸被连接到接头,所述接头被进一步连接到水溶性聚合物或生物活性分子,所述位置包括但不限于下述位置:第1位之前(即在N-端处),第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133位,或添加到所述蛋白质的羧基端,及其任何组合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸)。在某些实施方式中,一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中并连接到接头,所述接头被进一步连接到水溶性聚合物或生物活性分子,所述位置包括但不限于下述位置:第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72和107位之前,及其任何组合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸)。

[0031] 在某些实施方式中,在IL-2或其变体中的一个或多个这些位置处的所述非天然存在的氨基酸被连接到水溶性聚合物,所述位置包括但不限于下述位置:第1位之前(即在N-端处),第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133位,或添加到所述蛋白质的羧基端,及其任何组合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸)。在某些实施方式中,一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中

并连接到接头，所述接头被进一步连接到水溶性聚合物，所述位置包括但不限于下述位置：第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72和107位，及其任何组合(SEQ ID NO：2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸)。

[0032] 在某些实施方式中，所述IL-2或其变体包含调节所述IL-2对IL-2受体亚基或其变体的亲和性的替换、添加或缺失。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体包含调节所述IL-2或其变体对IL-2受体或结合配偶体(包括但不限于蛋白质、多肽、脂类、脂肪酸、小分子或核酸)的亲和性的替换、添加或缺失。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体包含与不含替换、添加或缺失的相应IL-2的稳定性相比调节所述IL-2的稳定性的替换、添加或缺失。稳定性和/或溶解性可以使用本领域普通技术人员已知的大量不同测定法来测量。这些测定法包括但不限于SE-HPLC和RP-HPLC。在某些实施方式中，所述IL-2包含与不含替换、添加或缺失的相应IL-2的免疫原性相比调节所述IL-2的免疫原性的替换、添加或缺失。在某些实施方式中，所述IL-2包含与不含替换、添加或缺失的相应IL-2的血清半衰期或循环时间相比调节所述IL-2的血清半衰期或循环时间的替换、添加或缺失。

[0033] 在某些实施方式中，所述IL-2或其变体包含与不含替换、添加或缺失的相应IL-2或其变体的水溶性相比提高所述IL-2的水溶性的替换、添加或缺失。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体包含与不含替换、添加或缺失的相应IL-2或其变体的溶解性相比提高在宿主细胞中生产的所述IL-2或其变体的溶解性的替换、添加或缺失。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体包含与不含替换、添加或缺失的相应IL-2或其变体的表达或合成相比提高所述IL-2在宿主细胞中的表达或提高体外合成的替换、添加或缺失。所述包含这种替换的IL-2或其变体保留了激动剂活性或保留或提高了在宿主细胞中的表达水平。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体包含与不含替换、添加或缺失的相应IL-2或其变体的蛋白酶抗性相比提高所述IL-2或其变体的蛋白酶抗性的替换、添加或缺失。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体包含与IL-2受体在与不含替换、添加或缺失的相应IL-2或其变体相互作用后的活性相比调节所述IL-2受体的信号转导活性的替换、添加或缺失。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体包含与不含替换、添加或缺失的相应IL-2的结合相比调节它与另一个分子例如受体的结合的替换、添加或缺失。

[0034] 在某些实施方式中，本发明提供了使用PEG-IL-2和至少一种另外的治疗或诊断性药剂治疗增殖性病症、癌症、肿瘤或癌前病症例如异常增生的方法。所述另外的治疗性药剂可以是例如细胞因子或细胞因子拮抗剂例如IL-12、干扰素-α或抗表皮生长因子受体抗体，多柔比星，表柔比星，抗叶酸剂例如甲氨蝶呤或氟尿嘧啶，伊立替康，环磷酰胺，放疗，激素或抗激素疗法例如雄激素、雌激素、抗雌激素抗体、氟他胺或二乙基己烯雌酚，手术，他莫昔芬，异环磷酰胺，二溴卫矛醇，烷基化药剂例如美法仑或顺铂，依托泊苷，长春瑞滨，长春花碱，长春地辛，糖皮质激素，组胺受体拮抗剂，血管生成抑制剂，辐射，辐射增敏剂，蒽环霉素，长春花生物碱，紫杉烷例如紫杉醇和多西他赛，细胞周期抑制剂例如细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂，检查点抑制剂，免疫调节性药物，免疫刺激性药物，针对另一种肿瘤抗原的单克隆抗体，单克隆抗体与生物活性分子的复合物，T细胞佐剂，骨髓移植物，或抗原呈递细胞例如树突状细胞疗法。疫苗可以被提供为例如可溶性蛋白或编码所述蛋白的核酸(参见例如Le等，同上；Greco和Zellefsky主编(2000)《前列腺癌的放疗》(Radiotherapy of Prostate Cancer)，Harwood Academic，Amsterdam；Shapiro和Recht(2001)New

Engl.J.Med.344:1997-2008;Hortobagyi(1998)New Engl.J.Med.339:974-984;Catalona(1994)New Engl.J.Med.331:996-1004;Naylor和Hadden(2003)Int.Immunopharmacol.3:1205-1215;The Int.Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group(2004)New Engl.J.Med.350:351-360;Slamon等,(2001)New Engl.J.Med.344:783-792;Kudelka等,(1998)New Engl.J.Med.338:991-992;van Netten等,(1996)New Engl.J.Med.334:920-921)。

[0035] 还提供了治疗癌症的髓外造血(EMH)的方法。EMH已被描述(参见例如Rao等,(2003)Leuk.Lymphoma 44:715-718;Lane等,(2002)J.Cutan.Pathol.29:608-612)。

[0036] 在某些实施方式中,所述PEG-IL-2或其变体包含与不含替换、添加或缺失的相应IL-2或其变体的受体或受体亚基结合活性相比调节其受体或受体亚基结合的替换、添加或缺失。在某些实施方式中,所述IL-2或其变体包含与不含替换、添加或缺失的相应IL-2或其变体的受体或受体亚基结合活性相比抑制它的与受体或受体亚基结合相关的活性的替换、添加或缺失。

[0037] 在某些实施方式中,所述IL-2或其变体包含与不含替换、添加或缺失的相应野生型IL-2的相容性相比提高所述IL-2或其变体与药物防腐剂(例如间甲酚、苯酚、苯甲醇)的相容性的替换、添加或缺失。这种提高的相容性使得能够制备在储存期间维持所述蛋白质的物理化学性质和生物活性的保存完好的药物制剂。

[0038] 在某些实施方式中,使用一个或多个非天然氨基酸产生一个或多个工程化改造的键。所述分子内键可以以许多方式产生,包括但不限于在适合条件下所述蛋白质中的两个氨基酸之间的反应(一个或两个氨基酸可以是非天然氨基酸),在适合条件下与两个氨基酸(每个氨基酸可以是天然编码或非天然编码的)、与接头、聚合物或其他分子的反应等。

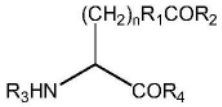
[0039] 在某些实施方式中,所述IL-2或其变体中的一个或多个氨基酸替换可以使用一个或多个天然存在或非天然存在的氨基酸。在某些实施方式中,所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以使用天然存在或非天然存在的氨基酸,只要至少一个替换是使用非天然编码的氨基酸即可。在某些实施方式中,所述IL-2或其变体中的一个或多个氨基酸替换可以使用一个或多个天然存在的氨基酸,并且另外至少一个替换是使用非天然编码的氨基酸。在某些实施方式中,所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以使用任何天然存在的氨基酸,并且至少一个替换是使用非天然编码的氨基酸。在某些实施方式中,一个或多个天然氨基酸可以在IL-2或其变体的一个或多个下述位置处替换:第1位之前(即在N-端处),第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43位,及其任何组合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中,一个或多个天然氨基酸替换可以在IL-2或其变体的一个或多个下述位置处:第44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133位,或添加到所述蛋白质的羧基端,及其任何组合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中,所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以使用至少一个天然存在的氨基酸,并且至少一个替换是使用非天然编

码的氨基酸。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以使用至少两个天然存在的氨基酸，并且至少一个替换是使用非天然编码的氨基酸。在某些实施方式中，所述一个或多个天然存在或编码的氨基酸可以是20种常见氨基酸中的任一者，包括但不限于丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。在某些实施方式中，所述至少一个天然存在的氨基酸替换可以在IL-2或其变体的下述位置处：第38、46或65位。在某些实施方式中，所述天然存在的氨基酸替换可以在IL-2或其变体的第38位处。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体的第38位处的天然存在的氨基酸替换可以选自20种常见天然氨基酸中的任一者，包括但不限于丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体的第38位处的天然存在的氨基酸替换可以是丙氨酸替换。在某些实施方式中，所述天然存在的氨基酸替换可以在IL-2或其变体的第46位处。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体的第46位处的天然存在的氨基酸替换可以选自20种常见天然氨基酸中的任一者，包括但不限于丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体的第46位处的天然存在的氨基酸替换可以是亮氨酸或异亮氨酸替换。在某些实施方式中，所述天然存在的氨基酸替换可以在IL-2或其变体的第65位处。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体的第65位处的天然存在的氨基酸替换可以选自20种常见天然氨基酸中的任一者，包括但不限于丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体的第65位处的天然存在的氨基酸替换可以是精氨酸替换。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是第38、46或65位处的天然存在的氨基酸替换，并且至少一个替换是使用并入到IL-2或其变体的一个或多个下述位置中的非天然编码的氨基酸：第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72和107位，及其任何组合(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是第38位处的天然存在的氨基酸替换，并且至少一个替换是使用并入到IL-2或其变体的一个或多个下述位置中的非天然编码的氨基酸：第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72和107位，及其任何组合(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是第46位处的天然存在的氨基酸替换，并且至少一个替换是使用并入到IL-2或其变体的一个或多个下述位置中的非天然编码的氨基酸：第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72和107位，及其任何组合(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是第65位处的天然存在的氨基酸替换，并且至少一个替换是使用并入到IL-2或其变体的一个或多个下述位置中的非天然编码的氨基酸：第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72和107位，及其任何组合(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是第38和/或46和/或65位处的天然存

在的氨基酸替换，并且至少一个替换是使用并入到IL-2或其变体的一个或多个下述位置中的非天然编码的氨基酸：第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72和107位，及其任何组合(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是第38位处的天然存在的氨基酸替换和在第42位中并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是第38和46位处的天然存在的氨基酸替换和在第42位中并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是第38和65位处的天然存在的氨基酸替换和在第42位中并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是第38、46和65位处的天然存在的氨基酸替换和在第42位中并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是在第38位处的天然存在的氨基酸替换和在第45位中并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是在第38和46位处的天然存在的氨基酸替换和在第45位中并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是在第38和65位处的天然存在的氨基酸替换和在第45位中并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是在第38、46和65位处的天然存在的氨基酸替换和在第45位中并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是在第38位处的天然存在的氨基酸替换和在第65位中并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体中的氨基酸替换可以是在第38和46位处的天然存在的氨基酸替换和在第65位中并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置)。

[0040] 在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸包含羰基、乙酰基、氨氧基、肼基、酰肼基、氨基脲基、叠氮基或炔基。

[0041] 在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸包含羰基。在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸具有下述结构：

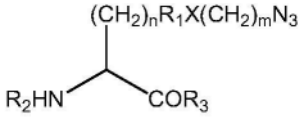
[0042] 

[0043] 其中n是0-10；R_1是烷基、芳基、取代的烷基或取代的芳基；R_2是H、烷基、芳基、取代的烷基和取代的芳基；R_3是H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团，并且R_4是H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。

[0044] 在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸包含氨氧基。在某些实施方式中，所

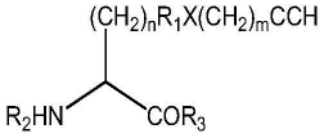
述非天然编码的氨基酸包含酰肼基。在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸包含肼基。在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸残基包含氨基脲基。

[0045] 在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸残基包含叠氮基。在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸具有下述结构：

[0046] 

[0047] 其中n是0-10；R_1是烷基、芳基、取代的烷基、取代的芳基或不存在；X是O、N、S或不存在；m是0-10；R_2是H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团，并且R_3是H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。

[0048] 在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸包含炔基。在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸具有下述结构：

[0049] 

[0050] 其中n是0-10；R_1是烷基、芳基、取代的烷基或取代的芳基；X是O、N、S或不存在；m是0-10，R_2是H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团，并且R_3是H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。

[0051] 在某些实施方式中，所述多肽是IL-2激动剂、部分激动剂、拮抗剂、部分拮抗剂或反向激动剂。在某些实施方式中，所述IL-2激动剂、部分激动剂、拮抗剂、部分拮抗剂或反向激动剂包含连接到水溶性聚合物的非天然编码的氨基酸。在某些实施方式中，所述水溶性聚合物包含聚乙二醇组成部分。在某些实施方式中，所述IL-2激动剂、部分激动剂、拮抗剂、部分拮抗剂或反向激动剂包含非天然编码的氨基酸和一个或多个翻译后修饰、接头、聚合物或生物活性分子。

[0052] 本发明还提供了分离的核酸，其包含编码SEQ ID NO:1、2、3、5或7的多肽的多核苷酸，并且本发明提供了分离的核酸，其包含在严紧条件下与编码SEQ ID NO:1、2、3、5或7的多肽的多核苷酸杂交的多核苷酸。本发明还提供了分离的核酸，其包含编码被显示为SEQ ID NO:1、2、3、5或7的多肽的多核苷酸，其中所述多核苷酸包含至少一个选择器密码子。本发明还提供了分离的核酸，其包含编码被显示为SEQ ID NO:1、2、3、5或7并具有一个或多个非天然编码的氨基酸的多肽的多核苷酸。对于本领域普通技术人员而言显而易见的是，许多不同的多核苷酸可以编码本发明的任何多肽。

[0053] 在某些实施方式中，所述选择器密码子选自琥珀密码子、赭石密码子、卵白石密码子、独特密码子、稀有密码子、五碱基密码子和四碱基密码子。

[0054] 本发明还提供了连接到生物活性分子的IL-2或其变体的制造方法。在某些实施方式中，所述方法包括将分离的包含非天然编码的氨基酸的IL-2或其变体与包含与所述非天然编码的氨基酸反应的组成部分的生物活性分子相接触。在某些实施方式中，所述并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸对原本对20种常用氨基酸中的任一者无反应性的生物活性分子具有反应性。在某些实施方式中，所述并入到IL-2中的非天然编码的氨基酸对原本对连接到生物活性分子的20种常用氨基酸中的任一者无反应性的接头、聚合物或生物活性分子具有反应性。

[0055] 在某些实施方式中，所述连接到水溶性聚合物或生物活性分子的IL-2或其变体通过将包含含羰基氨基酸的IL-2或其变体与包含氨氧基、肼、酰肼或氨基脲基的水溶性聚合物或生物活性分子进行反应来制造。在某些实施方式中，所述氨氧基、肼、酰肼或氨基脲基通过酰胺键连接到所述生物活性分子。在某些实施方式中，所述氨氧基、肼、酰肼或氨基脲基通过氨基甲酸酯键连接到所述水溶性聚合物或生物活性分子。

[0056] 本发明还提供了连接到水溶性聚合物的IL-2偶联物的制造方法。在某些实施方式中，所述方法包括将分离的包含非天然编码的氨基酸的IL-2-生物活性分子偶联物与包含与所述非天然编码的氨基酸反应的组成部分的水溶性聚合物相接触。在某些实施方式中，所述并入到IL-2偶联物中的非天然编码的氨基酸对原本对20种常用氨基酸中的任一者无反应性的水溶性聚合物具有反应性。在某些实施方式中，所述并入到IL-2偶联物中的非天然编码的氨基酸对原本对20种常用氨基酸中的任一者无反应性的接头、聚合物或生物活性分子具有反应性。

[0057] 本发明还提供了连接到水溶性聚合物的IL-2或其变体的制造方法。在某些实施方式中，所述方法包括将分离的包含非天然编码的氨基酸的IL-2或其变体与包含与所述非天然编码的氨基酸反应的组成部分的水溶性聚合物相接触。在某些实施方式中，所述并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸对原本对20种常用氨基酸中的任一者无反应性的水溶性聚合物具有反应性。在某些实施方式中，所述并入到IL-2中的非天然编码的氨基酸对原本对20种常用氨基酸中的任一者无反应性的接头、聚合物或生物活性分子具有反应性。

[0058] 在某些实施方式中，所述连接到水溶性聚合物的IL-2或其变体通过将包含含羰基氨基酸的IL-2或其变体与包含氨氧基、肼、酰肼或氨基脲基的聚乙二醇分子进行反应来制造。在某些实施方式中，所述氨氧基、肼、酰肼或氨基脲基通过酰胺键连接到所述聚乙二醇分子。在某些实施方式中，所述氨氧基、肼、酰肼或氨基脲基通过氨基甲酸酯键连接到所述聚乙二醇分子。

[0059] 在某些实施方式中，所述连接到水溶性聚合物的IL-2或其变体通过将包含羰基的聚乙二醇分子与包含含有氨氧基、肼、酰肼或氨基脲基的非天然编码的氨基酸的多肽进行反应来制造。

[0060] 在某些实施方式中，所述连接到水溶性聚合物的IL-2或其变体通过将包含含炔基氨基酸的IL-2与包含叠氮基组成部分的聚乙二醇分子进行反应来制造。在某些实施方式中，所述叠氮基或炔基通过酰胺键连接到所述聚乙二醇分子。

[0061] 在某些实施方式中，所述连接到水溶性聚合物的IL-2或其变体通过将包含含叠氮基氨基酸的IL-2或其变体与包含炔基组成部分的聚乙二醇分子进行反应来制造。在某些实施方式中，所述叠氮基或炔基通过酰胺键连接到所述聚乙二醇分子。

[0062] 在某些实施方式中，所述聚乙二醇分子具有约0.1kDa至约100kDa之间的分子量。在某些实施方式中，所述聚乙二醇分子具有0.1kDa至50kDa之间的分子量。在某些实施方式中，所述聚乙二醇具有1kDa至25kDa之间或2至22kDa之间或5kDa至20kDa之间的分子量。例如，所述聚乙二醇聚合物的分子量可以是约5kDa或约10kDa或约20kDa。例如，所述聚乙二醇聚合物的分子量可以是5kDa或10kDa或20kDa。在某些实施方式中，所述聚乙二醇分子是20K 2-支链PEG。在某些实施方式中，所述聚乙二醇分子是直链5K PEG。在某些实施方式中，所述

聚乙二醇分子是直链10K PEG。在某些实施方式中,所述聚乙二醇分子是直链20K PEG。在某些实施方式中,所述聚乙二醇聚合物的分子量是平均分子量。在某些实施方式中,所述平均分子量是数均分子量(Mn)。所述平均分子量可以使用GPC或SEC、SDS/PAGE分析、RP-HPLC、质谱术或毛细管电泳来确定或测量。在某些实施方式中,一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中:第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72或107位,及其任何组合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到直链20K聚乙二醇分子。在某些实施方式中,一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中:第35、37、42、45、49、61或65位,及其任何组合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到直链20K聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第65位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到直链20K聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第61位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到直链20K聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第49位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到直链20K聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第45位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到直链20K聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第42位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到直链20K聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第37位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到直链20K聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第35位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到直链20K聚乙二醇分子。

[0063] 在某些实施方式中,所述聚乙二醇分子是支链聚合物。在某些实施方式中,所述聚乙二醇支链聚合物的每个支链具有1kDa至100kDa之间或1kDa至50kDa之间的分子量。在某些实施方式中,所述聚乙二醇支链聚合物的每个支链具有1kDa至25kDa之间或2至22kDa之间或5kDa至20kDa之间的分子量。例如,所述聚乙二醇支链聚合物的每个支链的分子量可以是约5kDa或约10kDa或约20kDa。例如,所述聚乙二醇支链聚合物的每个支链的分子量可以是5kDa或10kDa或20kDa。在某些实施方式中,所述聚乙二醇分子是20K 2-支链PEG。在某些实施方式中,所述聚乙二醇分子是20K 4-支链PEG。在某些实施方式中,所述聚乙二醇聚合物的分子量是平均分子量。在某些实施方式中,所述平均分子量是数均分子量(Mn)。所述平均分子量可以使用GPC或SEC、SDS/PAGE分析、RP-HPLC、质谱术或毛细管电泳来确定或测量。在某些实施方式中,一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中:第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72或107位,及其任何组合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 2-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中:第35、37、42、45、49、61或65位,及其任何组

合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 2-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第65位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 2-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第61位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 2-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第49位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 2-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第45位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 2-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第42位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 2-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第37位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 2-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第35位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 2-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中:第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72或107位,及其任何组合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 4-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中:第35、37、42、45、49、61或65位,及其任何组合(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 4-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第65位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 4-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第61位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 4-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第49位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 4-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第45位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 4-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第42位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 4-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第37位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 4-支链聚乙二醇分子。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的第35位中(SEQ ID NO:2,或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置),并且所述IL-2或其变体被连接到20K 4-支链聚乙二醇分子。

[0064] 在某些实施方式中，所述连接到IL-2或其变体的水溶性聚合物包含聚亚烷基二醇组成部分。在某些实施方式中，所述并入到IL-2中的非天然编码的氨基酸残基包含羰基、氨氧基、酰肼基、肼、氨基脲基、叠氮基或炔基。在某些实施方式中，所述并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸残基包含羰基组成部分，并且所述水溶性聚合物包含氨氧基、酰肼、肼或氨基脲组成部分。在某些实施方式中，所述并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸残基包含炔基组成部分，并且所述水溶性聚合物包含叠氮基组成部分。在某些实施方式中，所述并入到IL-2或其变体中的非天然编码的氨基酸残基包含叠氮基组成部分，并且所述水溶性聚合物包含炔基组成部分。

[0065] 本发明还提供了组合物，其包含含有非天然编码的氨基酸的IL-2或其变体和可药用载体。在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸被连接到水溶性聚合物。

[0066] 本发明还提供了细胞，其包含编码IL-2或IL-2变体的包含选择器密码子的多核苷酸。在某些实施方式中，所述细胞包含正交RNA合成酶和/或正交tRNA，用于将非天然编码的氨基酸替换到所述IL-2中。

[0067] 本发明还提供了细胞，其包含编码IL-2或其变体的包含选择器密码子的多核苷酸。在某些实施方式中，所述细胞包含正交RNA合成酶和/或正交tRNA，用于将非天然编码的氨基酸替换到所述IL-2或其变体中。

[0068] 本发明还提供了包含非天然编码的氨基酸的PEG-IL-2、IL-2或其任何变体的制造方法。在某些实施方式中，所述方法包括将包含编码IL-2的一个或多个多核苷酸、正交RNA合成酶和/或正交tRNA的细胞在允许所述IL-2或其变体表达的条件下培养；和从所述细胞和/或培养基纯化所述IL-2或其变体。

[0069] 本发明还提供了增加IL-2或其变体的治疗半衰期、血清半衰期或循环时间的方法。本发明还提供了调节IL-2或其变体的免疫原性的方法。在某些实施方式中，所述方法包括将天然存在的IL-2或其变体中的任意一个或多个氨基酸用非天然编码的氨基酸替换和/或将所述IL-2或其变体连接到接头、聚合物、水溶性聚合物或生物活性分子。在本发明的一个实施方式中，所述接头长得足以允许柔性并允许二聚体形成。在本发明的一个实施方式中，所述接头的长度为至少3个氨基酸或18个原子，以便允许二聚体形成。

[0070] 本发明还提供了使用有效量的本发明的PEG-IL-2偶联物或其变体治疗需要所述治疗的患者的方法。在某些实施方式中，所述方法包括向所述患者给药治疗有效量的药物组合物，所述药物组合物包含含有非天然编码的氨基酸的PEG-IL-2或其变体和可药用载体。在某些实施方式中，所述方法包括向所述患者给药治疗有效量的药物组合物，所述药物组合物包含含有非天然编码的氨基酸和天然氨基酸替换的PEG-IL-2或其变体和可药用载体。在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸被连接到水溶性聚合物。在某些实施方式中，所述PEG-IL-2或其变体被糖基化。在某些实施方式中，所述PEG-IL-2或其变体不被糖基化。

[0071] 本发明还提供了使用有效量的本发明的IL-2或IL-2变体分子治疗需要所述治疗的患者的方法。在某些实施方式中，所述方法包括向所述患者给药治疗有效量的药物组合物，所述药物组合物包含含有非天然编码的氨基酸的IL-2或IL-2变体分子和可药用载体。在某些实施方式中，所述方法包括向所述患者给药治疗有效量的药物组合物，所述药物组合物包含含有一个或多个非天然编码的氨基酸和一个或多个天然氨基酸替换的IL-2或其

变体和可药用载体。在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸被连接到水溶性聚合物。在某些实施方式中，所述天然氨基酸被连接到水溶性聚合物。在某些实施方式中，所述IL-2被糖基化。在某些实施方式中，所述IL-2不被糖基化。在某些实施方式中，所述需要治疗的患者患有以IL-2受体α的高表达为特征的癌症、病症或疾病，但不限于此。在某些实施方式中，本发明提供了一种通过向对象给药治疗有效量的本发明的IL-2组合物来治疗癌症或病症或疾病的方法。在某些实施方式中，本发明提供了一种通过向患者给药治疗有效量的本发明的IL-2组合物来治疗遗传病的方法。本发明的IL-2多肽被用于在具有IL-2受体α高表达的细胞中治疗疾病或病症。在某些实施方式中，所述癌症、病症或疾病通过降低、阻断或沉默IL-2受体α表达来治疗。本发明的IL-2多肽或变体被用于制造用于治疗与IL-2受体α高表达相关的癌症、疾病或病症的药物。本发明的IL-2多肽或变体被用于制造用于治疗癌症的药物。本发明的IL-2多肽或变体被用于制造用于治疗遗传病的药物。

[0072] 本发明还提供了包含SEQ ID NO:1、2、3、5或7中示出的序列或任何其他IL-2序列，只是其中至少一个氨基酸被非天然编码的氨基酸替换的IL-2。在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸被连接到水溶性聚合物。在某些实施方式中，所述水溶性聚合物包含聚乙二醇组成部分。在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸包含羰基、氨氧基、酰肼基、肼基、氨基脲基、叠氮基或炔基。

[0073] 本发明还提供了药物组合物，其包含可药用载体和包含SEQ ID NO:1、2、3、5或7中示出的序列或任何其他IL-2序列的PEG-IL-2或其天然变体，其中至少一个氨基酸被非天然编码的氨基酸替换。本发明还提供了药物组合物，其包含可药用载体和包含SEQ ID NO:1、2、3、5或7中示出的序列的IL-2或其天然变体。在某些实施方式中，所述非天然编码的氨基酸包含糖类组成部分。在某些实施方式中，所述水溶性聚合物通过糖类组成部分连接到所述IL-2或其天然变体。在某些实施方式中，接头、聚合物或生物活性分子通过糖类组成部分连接到所述IL-2或其天然变体。

[0074] 本发明还提供了一种IL-2或其天然变体，其包含在单一氨基酸处通过共价键连接到所述IL-2的水溶性聚合物。在某些实施方式中，所述水溶性聚合物包含聚乙二醇组成部分。在某些实施方式中，所述共价连接到所述水溶性聚合物的氨基酸是所述多肽中存在的非天然编码的氨基酸。

[0075] 本发明提供了一种包含至少一个接头、聚合物或生物活性分子的IL-2或其变体，其中所述接头、聚合物或生物活性分子通过经核糖体并入到所述多肽中的非天然编码的氨基酸的官能团附连到所述多肽。在某些实施方式中，所述IL-2或其变体被单PEG化。本发明还提供了一种IL-2或其变体，其包含附连到一个或多个非天然编码的氨基酸的接头、聚合物或生物活性分子，其中所述非天然编码的氨基酸在预先选择的位点处经核糖体并入到所述多肽中。

[0076] 本发明的范围内包括联结到IL-2编码区的IL-2或其变体的前导或信号序列以及联结到IL-2编码区的异源信号序列。所选的异源前导或信号序列应该是例如被宿主细胞分泌系统识别和加工以分泌，并且可能被宿主细胞的信号肽酶切割的序列。使用本发明的IL-2治疗病症或障碍的方法意味着暗示用带有或不带有信号或前导肽的IL-2或其变体治疗。

[0077] 在另一个实施方式中，所述包含一个或多个非天然存在的氨基酸的IL-2或其变体与另一个分子(包括但不限于PEG)的偶联，由于用于与所述非天然氨基酸偶联的独特化学

反应而提供了基本上纯化的IL-2。包含一个或多个非天然编码的氨基酸的IL-2或其变体与另一个分子例如PEG的偶联，可以使用在所述偶联步骤之前或之后进行的其他纯化技术来进行，以提供基本上纯的IL-2或其变体。

附图说明

[0078] 图1-示出了IL-2多肽的视图的模型，其中潜在受体相互作用位点用IL-2Rα的结构及其与IL-2的界面标记。

[0079] 图2-示出了用于在大肠杆菌中表达IL-2的表达载体的质粒图谱。

[0080] 图3A-示出了IL-2蛋白在大肠杆菌中的表达的Western印迹分析。

[0081] 图3B-示出了大肠杆菌中的IL-2变体的滴度。

[0082] 图4A-示出了野生型IL-2与CD25的结合动力学传感图和模型拟合线和计算测量值。

[0083] 图4B-示出了用于在哺乳动物细胞中表达IL-2的表达载体的质粒图谱。

[0084] 图5-示出了UPF1基因组DNA序列和CRISPR gRNA位点的设计。

[0085] 图6-示出了UPF1敲除细胞系的序列验证。

[0086] 图7A-示出了各种不同IL-2变体在哺乳动物细胞中的瞬时表达。

[0087] 图7B-示出了在哺乳动物细胞中生产的野生型IL-2和IL-2变体的Western印迹分析。

[0088] 图8-示出了IL-2的F42变体的CTLL-2增殖测定。

[0089] 图9-示出了通过CTLL-2增殖测定法筛选IL-2变体。

[0090] 图10A-示出了野生型IL-2和F42变体的结合动力学传感图。

[0091] 图10B-示出了K35和Y45变体的结合动力学传感图。

[0092] 图10C-示出了T37和P65变体的结合动力学传感图。

[0093] 图11-IL-2受体二聚化测定法的图示说明。

[0094] 图12-离体pSTAT5测定法的图示说明。

[0095] 图13-示出了在糖基化或非糖基化IL-2存在下CTLL-2细胞的克隆生长和长期繁殖。

[0096] 图14-示出了在相应的野生型IL-2或其所选变体的稳定合并物产生之前和之后的滴度的比较。

[0097] 图15A-示出了表达F42-R38A变体的哺乳动物细胞中的滴度。

[0098] 图15B-示出了F42-R38A变体的CTLL-2结合测定。

[0099] 图15C-示出了F42-R38A变体的结合动力学传感图。

[0100] 定义

[0101] 应当理解，本发明不限于本文描述的特定方法、方案、细胞系、构建物和试剂，并且它们本身可以变化。还应理解，本文中使用的术语仅仅出于描述特定实施方式的目的，并不旨在限制本发明的范围，本发明的范围仅受随附的权利要求书限制。

[0102] 当在本文中和随附的权利要求书中使用时，不带具体数量的单数形式包括复数指称物，除非上下文明确指示不是如此。因此，例如，对“IL-2”、“PEG-IL-2”、“PEG-IL-2偶联物”以及各种不同的大写、带连字符和不带连字符的形式的指称是指一个或多个此类蛋白

质,并包括其对于本领域普通技术人员来说已知的等同物,等等。

[0103] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文中描述的相似或等同的任何方法、装置和材料均可用于本发明的实践或试验,但现在将描述优选的方法、装置和材料。

[0104] 本文提到的所有出版物和专利均通过引用并入本文,目的在于描述和公开例如在所述出版物中描述的可以与当前描述的发明相结合使用的构建物和方法。提供本文中讨论的出版物仅仅是因为它们的公开先于本申请的提交日期。本文中的任何内容均不得解释为承认发明人无权凭借在先发明或任何其他原因而早于这些公开。

[0105] 术语“基本上纯化的”是指这样的IL-2或其变体,其可能基本上或本质上不含在天然存在的环境中、即在本源细胞中或在重组生产的IL-2的情况下在宿主细胞中所发现的通常与所述蛋白质相伴或相互作用的组分。可能基本上不含细胞材料的IL-2包括具有少于约30%、少于约25%、少于约20%、少于约15%、少于约10%、少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%或少于约1%(以干重计)的污染蛋白质的蛋白制备物。当所述IL-2或其变体由宿主细胞重组生产时,所述蛋白质可以以所述细胞干重的约30%、约25%、约20%、约15%、约10%、约5%、约4%、约3%、约2%或约1%或更少的量存在。当所述IL-2或其变体由宿主细胞重组生产时,所述蛋白质可以以所述细胞干重的约5g/L、约4g/L、约3g/L、约2g/L、约1g/L、约750mg/L、约500mg/L、约250mg/L、约100mg/L、约50mg/L、约10mg/L或约1mg/L或更少的量存在于培养基中。因此,通过本发明的方法生产的“基本上纯化的”IL-2可能具有至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%的纯度水平,特别是至少约75%、80%、85%的纯度水平,更特别是至少约90%的纯度水平、至少约95%的纯度水平、至少约99%或更高的纯度水平,正如通过适合的方法例如SDS/PAGE分析、RP-HPLC、SEC和毛细管电泳所确定的。

[0106] “重组宿主细胞”或“宿主细胞”是指包括外源多核苷酸的细胞,不论用于插入的方法如何,例如是直接摄取、转导、f-交配还是本领域中已知用于产生重组宿主细胞的其他方法。所述外源多核苷酸可以作为非整合型载体例如质粒维持,或者可以整合到宿主基因组中。

[0107] 当在本文中使用时,术语“培养基”包括任何培养基、溶液、固体、半固体或刚性支持物,其可以支持或含有任何宿主细胞,包括细菌宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞、植物宿主细胞、真核宿主细胞、哺乳动物宿主细胞、CHO细胞、原核宿主细胞、大肠杆菌或假单胞菌属(Pseudomonas)宿主细胞,和细胞内含物。因此,所述术语可以涵盖宿主细胞已在其中生长的培养基例如IL-2已被分泌到其中的培养基,包括在增殖步骤之前或之后的培养基。所述术语还可以涵盖含有宿主细胞裂解物的缓冲液或试剂,例如在IL-2在细胞内生产并且所述宿主细胞被裂解或破碎以释放出IL-2的情况下。

[0108] 当在本文中涉及蛋白质重折叠使用时,“还原剂”被定义为将巯基维持在还原状态下并且还原分子内或分子间二硫键的任何化合物或材料。适合的还原剂包括但不限于二硫苏糖醇(DTT)、2-巯基乙醇、二硫赤藓糖醇、半胱氨酸、半胱胺(2-氨基乙硫醇)和还原型谷胱甘肽。对于本领域普通技术人员来说显而易见的是,广泛类型的还原剂适合用于本发明的方法和组合物。

[0109] 当在本文中涉及蛋白质重折叠使用时,“氧化剂”被定义为能够从被氧化的化合物

移除电子的任何化合物或材料。适合的氧化剂包括但不限于氧化型谷胱甘肽、胱氨酸、胱胺、氧化型二硫苏糖醇、氧化型赤藓糖醇和氧气。对于本领域普通技术人员来说显而易见的是，广泛类型的氧化剂适合用于本发明的方法。

[0110] 当在本文中使用时，“变性剂”被定义为引起蛋白质的可逆解折叠的任何化合物或材料。变性剂的强度由所述特定变性剂的性质和浓度两者决定。适合的变性剂可以是离液剂、去污剂、有机溶剂、与水混溶的溶剂、磷脂或两种或更多种此类试剂的组合。适合的离液剂包括但不限于脲、胍和硫氰酸钠。有用的去污剂可以包括但不限于强去污剂例如十二烷基硫酸钠或聚氧乙烯醚(例如Tween或Triton去污剂)、Sarkosyl、温和的非离子型去污剂(例如毛地黄皂苷)、温和的阳离子型去污剂例如N->2,3-(二油烯氧基)-丙基-N,N,N-三甲基铵、温和的离子型去污剂(例如胆酸钠或脱氧胆酸钠)或两性离子去污剂，包括但不限于磺基甜菜碱(Zwittergent)、3-(3-氯氨酰基丙基)二甲基铵-1-丙烷硫酸盐(CHAPS)和3-(3-氯氨酰基丙基)二甲基铵-2-羟基-1-丙烷磺酸盐(CHAPSO)。与水混溶的有机溶剂例如乙腈、低级烷醇(特别是C_2-C_4烷醇例如乙醇或异丙醇)或低级烷二醇(特别是C_2-C_4烷二醇例如乙二醇)可以用作变性剂。可用于本发明的磷脂可以是天然存在的磷脂例如磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷酯酰丝氨酸和磷脂酰肌醇或合成的磷脂衍生物或变体例如二己酰基磷脂酰胆碱或二庚酰基磷脂酰胆碱。

[0111] 当在本文中使用时，“重折叠”描述了将含有二硫键的多肽从不正确折叠或解折叠状态转变到对于二硫键来说本源或正确折叠的构象的任何过程、反应或方法。

[0112] 当在本文中使用时，“共折叠”具体是指使用至少两种彼此相互作用的多肽并导致解折叠或不正确折叠的多肽转变成本源、正确折叠的多肽的重折叠过程、反应或方法。

[0113] 当在本文中使用时，“白介素-2”、“IL-2”及其带连字符和不带连字符的形式包括具有IL-2的至少一种生物活性的多肽和蛋白质，及其IL-2类似物、IL-2突变蛋白质、IL-2变体、IL-2亚型、IL-2模拟物、IL-2片段、杂合IL-2蛋白、融合蛋白、寡聚体和多聚体、同源物、糖基化模式变体、变体、拼接变体和突变蛋白质，不论其生物活性如何，并且也不论其合成和制造方法如何，所述方法包括但不限于重组(不论是从cDNA、基因组DNA、合成DNA还是其他形式的核酸生产)、体外、体内、通过核酸分子的微注射、合成、转基因和基因活化方法。术语“IL-2”、“IL-2变体”和“IL-2多肽”涵盖了包含一个或多个氨基酸替换、添加或缺失的IL-2。

[0114] 缺少前导序列并且在N-端处没有甲硫氨酸的IL-2的序列参见本文中的SEQ ID NO:2。没有前导序列并且在N-端处具有甲硫氨酸的IL-2的序列参见SEQ ID NO:3、5或7。在某些实施方式中，本发明的IL-2或其变体与SEQ ID NO:2、3、5或7或IL-2的任何其他序列基本上一致。编码IL-2(包括突变体IL-2和其他变体)的核酸分子以及表达和纯化这些多肽的方法在本领域中是公知的。

[0115] 术语“IL-2”还包括天然存在的IL-2的可药用盐和前体药物和所述盐的前体药物、多形体、水合物、溶剂化物、生物活性片段、生物活性变体和立体异构体，以及天然存在的IL-2的激动剂、模拟物和拮抗剂变体及其多肽融合体。

[0116] 各种不同的参考文献公开了多肽通过聚合物偶联或糖基化进行的修饰。术语“IL-2”包括偶联到聚合物例如PEG的多肽，并且可以包含半胱氨酸、赖氨酸或其他残基的一个或多个另外的衍生化。此外，所述IL-2可以包含接头或聚合物，其中所述接头或聚合物被偶联

到的氨基酸可以是根据本发明的非天然氨基酸，或者可以利用本领域中已知的技术偶联到天然编码的氨基酸，例如偶联到赖氨酸或半胱氨酸。

[0117] 术语“IL-2多肽”还包括糖基化的IL-2，例如但不限于在任何氨基酸位置处糖基化的多肽、所述多肽的N-连接或O-连接的糖基化形式。含有单核苷酸变化的变体也被当作IL-2多肽的生物活性变体。此外，也包括拼接变体。

[0118] 术语“IL-2”还包括通过化学手段相连或表达为融合蛋白的任一种或多种IL-2或任何其他多肽、蛋白质、糖类、聚合物、小分子、接头、配体或任何类型的其他生物活性分子的IL-2异二聚体、同二聚体、异多聚体或同多聚体，以及含有例如特定缺失或其他修饰但仍维持生物活性的多肽类似物。

[0119] 当在本文中使用时，不论是偶联到生物活性分子、偶联到聚乙二醇还是采取非偶联形式，“白介素-2”或“IL-2”是包含非共价联结以形成同二聚体的两个亚基的蛋白质。当在本文中使用时，“白介素-2”和“IL-2”可以是指人类或小鼠IL-2，其也被称为“hIL-2”或“mIL-2”。

[0120] 术语“PEG化的IL-2”、“PEG化的IL-2”或“PEG-IL-2”是具有一个或多个聚乙二醇分子的IL-2分子，所述聚乙二醇分子通过接头共价附连到所述IL-2蛋白的一个或超过一个氨基酸残基，使得所述附连是稳定的。术语“单PEG化的IL-2”和“单PEG-IL-2”意味着一个聚乙二醇分子通过接头被共价附连到所述IL-2二聚体的一个亚基上的单一氨基酸残基。所述PEG组成部分的平均分子量优选在约5,000至约50,000道尔顿之间。PEG附连到IL-2的方法或位点并不重要，但优选地所述聚乙二醇化不改变或仅仅极小地改变所述生物活性分子的活性。优选地，半衰期的增加超过生物活性的任何降低。

[0121] 对本文中描述的IL-2中氨基酸位置的所有指称是基于在SEQ ID NO:2中的位置，除非另有指明(即当陈述所述比较是基于SEQ ID NO:3、5、或7或其他IL-2时)。本领域技术人员将会认识到，在任何其他IL-2例如SEQ ID NO:3、5或7中与SEQ ID NO:2中的位置相对应的氨基酸位置可以被容易地鉴定。本领域技术人员将会认识到，在任何其他IL-2分子例如IL-2融合体、变体、片段等中与SEQ ID NO:2、3、5或7或任何其他IL-2序列中的位置相对应的氨基酸位置可以被容易地鉴定。例如，可以使用序列比对程序例如BLAST来比对并鉴定蛋白质中与SEQ ID NO:2、3、5或7或其他IL-2序列中的位置相对应的具体位置。本文中参考SEQ ID NO:2、3、5或7或其他IL-2序列描述的氨基酸的替换、缺失或添加，打算也指称在本文中描述的或本领域中已知的IL-2融合体、变体、片段等中的相应位置中的替换、缺失或添加，并且明确地被本发明涵盖。

[0122] IL-2(IL3)：本领域中已知的任何形式的IL-2均可用于本文描述的组合物中。对于实验工作来说，IL-2的小鼠形式是特别有用的。本领域技术人员将会认识到，IL2中的某些氨基酸残基可以被改变而不影响它的活性，并且这些IL2的修饰形式也可以被联结到载体并用于本文描述的方法中。

[0123] 术语“IL-2”涵盖包含一个或多个氨基酸替换、添加或缺失的IL-2。本发明的IL-2可以包含与一个或多个非天然氨基酸修饰联合的一个或多个天然氨基酸的修饰。在天然存在的IL-2多肽中广泛类型的氨基酸位置中的示例性替换已被描述，包括但不限于调节药物稳定性、调节IL-2多肽的一种或多种生物活性例如但不限于提高激动剂活性、提高多肽的溶解性、降低蛋白酶敏感性、将所述多肽转变成拮抗剂等的替换，并且被术语“IL-2多肽”所

涵盖。在某些实施方式中，所述IL-2拮抗剂包含连接到水溶性聚合物的非天然编码的氨基酸，其存在于所述IL-2分子的受体结合区中。

[0124] 在某些实施方式中，所述IL-2或其变体还包含调节所述IL-2或变体多肽的生物活性的添加、替换或缺失。在某些实施方式中，所述IL-2或变体还包含调节IL-2的已知且通过研究证实的性状例如癌症的一种或多种症状的治疗或缓解的添加、替换或缺失。所述添加、替换或缺失可以调节IL-2或变体的一种或多种性质或活性。例如，所述添加、替换或缺失可以调节对IL-2受体或所述受体的一个或多个亚基的亲和性，调节循环半衰期，调节治疗半衰期，调节所述多肽的稳定性，调节被蛋白酶的切割，调节剂量，调节释放或生物利用度，促进纯化，或改善或改变特定给药途径。同样地，IL-2或变体可以包含蛋白酶切割序列、反应性基团、抗体结合结构域(包括但不限于FLAG或聚His)或其他基于亲和性的序列(包括但不限于FLAG、聚His、GST等)或被连接的分子(包括但不限于生物素)，其改进所述多肽的检测(包括但不限于GFP)、纯化或其他性状。

[0125] 术语“IL-2多肽”还涵盖被连接的同二聚体、异二聚体、同多聚体或异多聚体，包括但不限于通过非天然编码的氨基酸侧链直接连接到相同或不同的非天然编码的氨基酸侧链、连接到天然编码的氨基酸侧链或通过接头间接连接的那些。示例性的接头包括但不限于小有机化合物、各种不同长度的水溶性聚合物例如聚乙二醇或葡聚糖或各种不同长度的多肽。

[0126] 当在本文中使用时，术语“本发明的偶联物”、“IL-2-生物活性分子偶联物”或“PEG-IL-2”是指偶联到生物活性分子、其部分或其类似物的与白介素-2受体或其亚基结合的白介素-2或其部分、类似物或衍生物。除非另有指明，否则术语“本发明的化合物”和“本发明的组合物”被用作术语“本发明的偶联物”的可选替词。

[0127] 当在本文中使用时，术语“细胞毒性药剂”可以是对癌细胞或活化的免疫细胞具有治疗效应，可用作治疗性药剂与IL-2、PEG-IL-2或IL-2变体联合使用的任何药剂(参见例如WO 2004/010957，“药物偶联物及其用于治疗癌症、自体免疫疾病或传染病的用途”(Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer,An Autoimmune Disease or an Infectious Disease))。用于本发明的细胞毒性或免疫抑制性药剂的类别包括例如抗微管蛋白剂、奥瑞他汀类、DNA小沟结合剂、DNA复制抑制剂、烷基化药剂(例如铂络合物例如顺铂、单铂、双铂和三核铂络合物和卡铂)、蒽环类、抗生素、抗叶酸剂、抗代谢药、化疗增敏剂、倍癌霉素类、依托泊苷类、氟代嘧啶类、离子载体类、lexitropsins、亚硝基脲类、铂醇类、预制化合物、嘌呤抗代谢药、嘌呤霉素类、辐射增敏剂、甾类、紫杉烷类、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。

[0128] 个体细胞毒性或免疫抑制性药剂包括例如雄激素、安曲霉素(AMC)、天冬酰胺酶、5-氮杂胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、白消安、丁硫氨酸亚砜、喜树碱、卡铂、卡莫司汀(BSNU)、CC-1065、苯丁酸氮芥、顺铂、秋水仙碱、环磷酰胺、阿糖胞苷、胞苷阿糖苷、细胞松弛素B、达卡巴嗪、更生霉素(以前称为放线菌素)、柔红霉素、达卡巴嗪、多西他赛、多柔比星、雌激素、5-氟脱氧尿苷、5-氟尿嘧啶、短杆菌肽D、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、洛莫司汀(CCNU)、甲氯乙胺、美法仑、6-巯基嘌呤、甲氨蝶呤、光神霉素、丝裂霉素C、米托蒽醌、硝基咪唑、紫杉醇、普卡霉素、丙卡巴肼、链脲佐菌素、替尼泊苷、6-硫鸟嘌呤、硫代TEPA、拓扑替康、长春花碱、长春新碱、长春瑞滨、VP-16和VM-26。

[0129] 在某些典型实施方式中，所述治疗性药剂是细胞毒性药剂。适合的细胞毒性药剂包括例如尾海兔素类(例如奥瑞他汀E、AFP、MMAF、MMAE)、DNA小沟结合剂(例如烯二炔类和lexitropsins)、倍癌霉素类、紫杉烷类(例如紫杉醇和多西他赛)、嘌呤霉素类、长春花生物碱、CC-1065、SN-38、拓扑替康、吗啉并-多柔比星、利索新、氰基吗啉并-多柔比星、棘霉素、康普瑞汀、纺锤菌素、埃博霉素A和B、雌莫司汀、隐藻素类、西马多丁、maytansinoids、圆皮海绵内酯、五加素和米托蒽醌。

[0130] “非天然编码的氨基酸”是指不是20种常见氨基酸或吡咯赖氨酸或硒代半胱氨酸之一的氨基酸。可以与术语“非天然编码的氨基酸”同义使用的其他术语是“非天然氨基酸”、“非天然存在的氨基酸”及其各种不同的带连字符和不带连字符的形式。术语“非天然编码的氨基酸”还包括但不限于通过天然编码的氨基酸(包括但不限于20种常见氨基酸或吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸)的修饰而产生，但本身不被翻译复合物天然并入到生长的多肽链中的氨基酸。这样的非天然存在的氨基酸的实例包括但不限于N-乙酰基葡萄糖胺基-L-丝氨酸、N-乙酰基葡萄糖胺基-L-苏氨酸和O-磷酸酪氨酸。

[0131] “氨基端修饰基团”是指可以附连到多肽的氨基端的任何分子。同样地，“羧基端修饰基团”是指可以附连到多肽的羧基端的任何分子。末端修饰基团包括但不限于各种不同的水溶性聚合物、肽或蛋白质例如血清白蛋白或增加肽的血清半衰期的其他组成部分。

[0132] 术语“官能团”、“活性组成部分”、“活化基团”、“离去基团”、“反应性位点”、“化学反应性基团”和“化学反应性组成部分”在本领域和本文中用于指称分子的独特的、可定义的部分或单元。所述术语在化学领域中多少是同义的，并在本文中用于指示分子的执行某些功能或活性并且与其他分子具有反应性的部分。

[0133] 术语“键(linkage)”、“连接(linkage)”或“接头”在本文中用于指称通常作为化学反应的结果而形成的基团或键，并且通常是共价键。水解稳定的键意味着所述键在水中是基本上稳定的，并且在有用的pH值下(包括但不限于在生理条件下)长期、甚至可能是无限期不与水反应。水解不稳定的或可降解的键意味着所述键在水或水性溶液(包括例如血液)中是可降解的。酶不稳定的或可降解的键意味着所述键可以被一种或多种酶降解。正如在本领域中理解的，PEG和相关聚合物可以在聚合物骨架中或在聚合物骨架与所述聚合物分子的一个或多个末端官能团之间的接头基团中包括可降解的键。例如，通过PEG羧酸或活化的PEG羧酸与生物活性药剂上的醇基团的反应形成的酯键，在生理条件下通常水解以释放出所述药剂。其他水解可降解的键包括但不限于碳酸酯键、从胺与醛的反应得到的亚胺键、通过醇与磷酸基团的反应形成的磷酸酯键、作为酰肼与醛的副产物的腙键、作为醛与醇的反应产物的缩醛键、作为甲酸与醇的反应产物的原酸酯键、由在包括但不限于聚合物例如PEG的末端处的胺基和肽的羧基形成的肽键、以及由在包括但不限于聚合物的末端处的亚磷酰胺基团和寡核苷酸的5’羟基形成的寡核苷酸键。

[0134] 当在本文中使用时，术语“生物活性分子”、“生物活性组成部分”或“生物活性药剂”意味着可以影响与生物体相关的生物体系、途径、分子或相互作用的任何物理或生物化学性质的任何物质，所述生物体包括但不限于病毒、细菌、噬菌体、转座子、朊病毒、昆虫、真菌、植物、动物和人类。具体来说，当在本文中使用时，生物活性分子包括但不限于打算用于在人类或其他动物中诊断、治愈、减轻、治疗或预防疾病或以其他方式增强人类或动物的身体或心理健康的任何物质。生物活性分子的实例包括但不限于肽、蛋白质、酶、小分子药物、

疫苗、免疫原、成瘾药物、不成瘾药物、糖类、无机原子或分子、染料、脂类、核苷、放射性核素、寡核苷酸、类毒素、生物活性分子、原核和真核细胞、病毒、多糖、得自于或源自于病毒、细菌、昆虫、动物或任何其他细胞或细胞类型的核酸及其部分、脂质体、微粒和胶束。适合用于本发明的生物活性药剂的类别包括但不限于药物、前体药物、放射性核素、成像剂、聚合物、抗生素、杀真菌剂、胆汁酸树脂、烟酸和/或他汀类药物、消炎药、抗肿瘤药、心血管药剂、抗焦虑药、激素、生长因子、甾类药剂、微生物来源的生物活性分子等。生物活性药剂也包括酰胺化合物例如在Yamamori等人的专利申请公布号20080221112中所描述的那些，其在本发明的IL-2多肽之前、之后给药和/或与其共同给药。

[0135] “双官能聚合物”是指包含两个分立的、能够与其他组成部分(包括但不限于氨基酸侧基)特异性反应以形成共价或非共价键的官能团的聚合物。具有一个与特定生物活性组分上的基团具有反应性的官能团和另一个与第二生物组分上的基团具有反应性的基团的双官能接头，可用于形成包括所述第一生物活性组分、双官能接头和第二生物活性组分的偶联物。用于将各种不同化合物附连到肽的许多程序和接头分子是已知的。参见例如欧洲专利申请号188,256、美国专利号4,671,958、4,659,839、4,414,148、4,699,784、4,680,338和4,569,789，其通过引用并入本文。“多官能聚合物”是指包含两个或更多个分立的、能够与其他组成部分(包括但不限于氨基酸侧基)特异性反应以形成共价或非共价键的官能团的聚合物。双官能聚合物或多官能聚合物可以具有任何所需的长度或分子量，并且可以被选择成在连接到IL-2的一个或多个分子与其受体或IL-2之间提供特定的所需间隔或构象。

[0136] 当取代基由它们的从左至右书写的常规化学式说明时，它们同样地涵盖了从右至左书写所述结构而得到的化学上一致的取代基，例如，结构-CH_2O-等同于结构-OCH_2-。

[0137] 术语“取代基”包括但不限于“非干扰性取代基”。“非干扰性取代基”是产生稳定化合物的基团。适合的非干扰性取代基或残基包括但不限于卤素、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_2-C_{10}炔基、C_1-C_{10}烷氧基、C_1-C_{12}芳烷基、C_1-C_{12}烷芳基、C_3-C_{12}环烷基、C_3-C_{12}环烯基、苯基、取代的苯基、甲苯酰基、二甲苯基、联苯基、C_2-C_{12}烷氧基烷基、C_2-C_{12}烷氧基芳基、C_7-C_{12}芳氧基烷基、C_7-C_{12}氧基芳基、C_1-C_6烷基亚磺酰基、C_1-C_{10}烷基磺酰基、--$(CH_2)_m$--O--(C_1-C_{10}烷基)(其中m是1至8)、芳基、取代的芳基、取代的烷氧基、氟代烷基、杂环基、取代的杂环基、硝基烷基、--NO_2、--CN、--NRC(O)--(C_1-C_{10}烷基)、--C(O)--(C_1-C_{10}烷基)、C_2-C_{10}烷硫基烷基、--C(O)O--(C_1-C_{10}烷基)、--OH、--SO_2、=S、--COOH、--NR_2、羰基、--C(O)--(C_1-C_{10}烷基)-CF3、--C(O)—CF3、--C(O)NR2、--(C_1-C_{10}芳基)-S--(C_6-C_{10}芳基)、--C(O)--(C_1-C_{10}芳基)、--$(CH_2)_m$--O--(--$(CH_2)_m$--O--(C_1-C_{10}烷基)(其中每个m是1至8)、--C(O)NR_2、--C(S)NR_2、--SO_2NR_2、--NRC(O)NR_2、--NRC(S)NR_2、其盐等。当在本文中使用时，每个R是H、烷基或取代的烷基、芳基或取代的芳基、芳烷基或烷芳基。

[0138] 术语“卤素”包括氟、氯、碘和溴。

[0139] 除非另有陈述，否则术语“烷基”本身或作为另一个取代基的一部分意味着直链或支链或环状烃基或其组合，其可以是完全饱和、单或多不饱和的，并且可以包括二价和多价残基，具有指定的碳原子数(即C_1-C_{10}意味着1至10个碳原子)。饱和烃基的实例包括但不限于基团例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、环己基、(环己基)甲基、环丙基甲基、诸如正戊基、正己基、正庚基、正辛基的同系物和异构体等。不饱和烷基

是具有一个或多个双键或叁键的基团。不饱和烷基的实例包括但不限于乙烯基、2-丙烯基、巴豆基、2-异戊烯基、2-(丁二烯基)、2,4-戊二烯基、3-(1,4-戊二烯基)、乙炔基、1-和3-丙炔基、3-丁炔基和更高级的同系物和异构体。除非另有指明，否则术语“烷基”也意味着包括在下文中更详细定义的烷基的衍生物例如“杂烷基”。限于烃基的烷基被称为“同烷基”。

[0140] 术语“亚烷基”本身或作为另一个取代基的一部分意味着源自于烷烃的二价残基，例如但不限于结构-CH_2CH_2-和-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-，并且还包括下文中被描述为“亚杂烷基”的基团。通常，烷基(或亚烷基)具有1至24个碳原子，其中具有10个或更少碳原子的基团是本文描述的方法和组合物的特定实施方式。“低级烷基”或“低级亚烷基”是较短链的烷基或亚烷基，通常具有8个或更少的碳原子。

[0141] 术语“烷氧基”、“烷基氨基”和“烷硫基”(或硫代烷氧基)以它们的常规含义使用，并且是指分别通过氧原子、氨基或硫原子附连到分子的剩余部分的烷基。

[0142] 除非另有陈述，否则术语“杂烷基”本身或与另一个术语相结合，意味着由所陈述数目的碳原子和至少一个选自O、N、Si和S的杂原子构成的稳定的直链或支链或环状烃基或其组合，并且其中所述氮和硫原子可以任选被氧化，并且所述氮杂原子可以任选被季铵化。杂原子O、N、S和Si可以被放置在所述杂烷基的任何内部位置处或所述烷基被附连到分子的剩余部分的位置处。实例包括但不限于-CH_2-CH_2-O-CH_3、-CH_2-CH_2-NH-CH_3、-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3、-CH_2-S-CH_2-CH_3、-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3、-CH_2-CH_2-S(O)$_2$-CH_3、-CH＝CH-O-CH_3、-Si(CH_3)$_3$、-CH_2-CH＝N-OCH_3和-CH＝CH-N(CH_3)-CH_3。至多两个杂原子可以是连续的，例如-CH_2-NH-OCH_3和-CH_2-O-Si(CH_3)$_3$。同样地，术语“亚杂烷基”本身或作为另一个取代基的一部分意味着源自于杂烷基的二价残基，例如但不限于-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-和-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-。对于亚杂烷基来说，相同或不同的杂原子也可以占据任一或两个链末端(包括但不限于亚烷基氧基、亚烷基二氧基、亚烷基氨基、亚烷基二氨基、氨氧基亚烷基等)。此外，对于亚烷基和亚杂烷基连接基团来说，所述连接基团的结构式书写的方向并不暗示所述连接基团的取向。例如，式-C(O)$_2$R’-代表-C(O)$_2$R’-和-R’C(O)$_2$-两者。

[0143] 除非另有陈述，否则术语“环烷基”和“杂环烷基”本身或与其他术语相组合，分别表示“烷基”和“杂烷基”的环状形式。因此，环烷基或杂环烷基包括饱和、部分不饱和和完全不饱和的环状连接。此外，对于杂环烷基来说，杂原子可以占据所述杂环附连到分子的剩余部分之处的位置。环烷基的实例包括但不限于环戊基、环己基、1-环己烯基、3-环己烯基、环庚基等。杂环烷基的实例包括但不限于1-(1,2,5,6-四氢吡啶基)、1-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-吗啉基、3-吗啉基、四氢呋喃-2-基、四氢呋喃-3-基、四氢噻吩-2-基、四氢噻吩-3-基、1-哌嗪基、2-哌嗪基等。此外，所述术语涵盖了双环和三环环结构。同样地，术语“亚杂环烷基”本身或作为另一个取代基的一部分意味着源自于杂环烷基的二价残基，并且术语“亚环烷基”本身或作为另一个取代基的一部分意味着源自于环烷基的二价残基。

[0144] 当在本文中使用时，术语“水溶性聚合物”是指在水性溶剂中可溶的任何聚合物。水溶性聚合物与IL-2的连接可以引起变化，包括但不限于相对于未修饰形式提高或受调节的血清半衰期或提高或受调节的治疗半衰期，受调节的免疫原性，受调节的物理缔合特征例如聚集和多聚体形成，改变的受体结合，改变的与一种或多种结合配偶体的结合，以及改变的受体二聚化或多聚化。所述水溶性聚合物可以具有或可以不具有其自身的生物活性，并且可作为接头用于将IL-2附连到其他物质，包括但不限于一个或多个IL-2或一个或多个

生物活性分子。适合的聚合物包括但不限于聚乙二醇、聚乙二醇丙醛、其单C1-C10烷氧基或芳氧基衍生物(描述在美国专利号5,252,714中,其通过引用并入本文)、单甲氧基-聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚氨基酸、二乙烯醚马来酸酐、N-(2-羟基丙基)-甲基丙烯酰胺、葡聚糖、葡聚糖衍生物(包括葡聚糖硫酸酯)、聚丙二醇、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯化多元醇、肝素、肝素片段、多糖、寡糖、聚糖、纤维素和纤维素衍生物(包括但不限于甲基纤维素和羧甲基纤维素)、淀粉和淀粉衍生物、多肽、聚亚烷基二醇及其衍生物、聚亚烷基二醇及其衍生物的共聚物、聚乙烯基乙基醚和α-β-聚(2-羟基乙基)-DL-天冬酰胺等,或其混合物。这些水溶性聚合物的实例包括但不限于聚乙二醇和血清白蛋白。

[0145] 当在本文中使用时,术语"聚亚烷基二醇"是指聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二醇及其衍生物。术语"聚亚烷基二醇"涵盖了直链和支链聚合物两者,并且平均分子量在0.1kDa至100kDa之间。其他示例性实施方式列于例如商业化供应商的目录中,例如Shearwater Corporation的目录"用于生物医学应用的聚乙二醇和衍生物"(Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications)(2001)。

[0146] 除非另有陈述,否则术语"芳基"意味着多不饱和的芳香族烃类取代基,其可以是单个环或稠合在一起或共价连接的多个环(包括但不限于1至3个环)。术语"杂芳基"是指含有1至4个选自N、O和S的杂原子的芳基(或环),其中所述氮和硫原子任选被氧化,并且所述氮原子任选被季铵化。杂芳基可以通过杂原子附连到分子的剩余部分。芳基和杂芳基的非限制性实例包括苯基、1-萘基、2-萘基、4-联苯基、1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、3-吡唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、吡嗪基、2-噁唑基、4-噁唑基、2-苯基-4-噁唑基、5-噁唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-苯并噻唑基、嘌呤基、2-苯并咪唑基、5-吲哚基、1-异喹啉基、5-异喹啉基、2-喹喔啉基、5-喹喔啉基、3-喹啉基和6-喹啉基。对于每个上面提到的芳基和杂芳基环系统来说,取代基选自下文描述的可接受的取代基。

[0147] 简短来说,术语"芳基"当与其他术语相组合使用时(包括但不限于芳氧基、芳基硫氧基、芳烷基)包括如上所定义的芳基和杂芳基环两者。因此,术语"芳烷基"意味着包括其中芳基附连到烷基(包括但不限于苯甲基、苯乙基、吡啶甲基等)的那些残基,所述烷基包括其中碳原子(包括但不限于亚甲基)已被例如氧原子代替的烷基(包括但不限于苯氧基甲基、2-吡啶氧基甲基、3-(1-萘氧基)丙基等)。

[0148] 每个上述术语(包括但不限于"烷基"、"杂烷基"、"芳基"和"杂芳基")意味着包括所指明的残基的取代和未取代的形式两者。下文提供了每种类型的残基的示例性取代基。

[0149] 用于烷基和杂烷基残基(包括常常被称为亚烷基、烯基、亚杂烷基、杂烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、环烯基和杂环烯基的基团)的取代基可以是选自但不限于以下的各种不同基团中的一者或多者:-OR',=O,=NR',=N-OR',-NR'R",-SR',-卤素,-SiR'R"R"',-OC(O)R',-C(O)R',-CO_2R',-CONR'R",-OC(O)NR'R",-NR"C(O)R',-NR'-C(O)NR"R"',-NR"C(O)$_2$R',-NR-C(NR'R"R"')=NR"",-NR-C(NR'R")=NR"',-S(O)R',-S(O)$_2$R',-S(O)$_2$NR'R",-$NRSO_2$R',-CN和-NO_2,其数目在0至(2m'+1)的范围内,其中m'是这种残基中的碳原子总数。R'、R"、R"'和R""各自独立地是指氢、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的芳基(包括但不限于被1-3个卤素取代的芳基)、取代或未取代的烷基、烷氧基或硫代烷氧基或芳烷基。当

本发明的化合物包括超过一个R基团时，例如，每个所述R基团被独立地选择，当存在超过一个R'、R"、R'"和R""基团时，每个这些基团也是如此。当R'和R"被附连到同一个氮原子时，它们可以与所述氮原子组合形成5、6或7元环。例如，-NR'R"意味着包括但不限于1-吡咯烷基和4-吗啉基。从上述取代基的讨论，本领域技术人员将会理解，术语"烷基"意味着包括包含结合到氢基团之外的基团的碳原子的基团，例如卤代烷基(包括但不限于-CF_3和-CH_2CF_3)和酰基(包括但不限于-C(O)CH_3、-C(O)CF_3、-C(O)CH_2OCH_3等)。

[0150] 与为烷基残基所描述的取代基相似，用于芳基和杂芳基的取代基是可变化的，并且选自但不限于：卤素，-OR'，=O，=NR'，=N-OR'，-NR'R"，-SR'，-卤素，-SiR'R"R"'，-OC(O)R'，-C(O)R'，-CO_2R'，-CONR'R"，-OC(O)NR'R"，-NR"C(O)R'，-NR'-C(O)NR"R"'，-NR"C(O)$_2$R'，-NR-C(NR'R"R'")=NR""，-NR-C(NR'R")=NR'"，-S(O)R'，-S(O)$_2$R'，-S(O)$_2$NR'R"，-$NRSO_2$R'，-CN和-NO_2，-R'，-N_3，-$CH(Ph)_2$，氟代(C_1-C_4)烷氧基和氟代(C_1-C_4)烷基，其数目在0至所述芳香环系统上开放价的总数的范围内；并且其中R'、R"、R"'和R""独立地选自氢、烷基、杂烷基、芳基和杂芳基。当本发明的化合物包括超过一个R基团时，例如，每个所述R基团被独立地选择，当存在超过一个R'、R"、R'"和R""基团时，每个这些基团也是如此。

[0151] 当在本文中使用时，术语"调节的血清半衰期"意味着修饰的IL-2相对于它的未修饰的形式的循环半衰期的正或负变化。血清半衰期通过在IL-2给药后各个不同时间点获取血液样品并确定每个样品中该分子的浓度来测量。血清浓度与时间的相关性允许计算血清半衰期。提高的血清半衰期理想地具有至少约两倍，但更小的提高也可能是有用的，例如在它能够实现令人满意的给药方案或避免毒性作用的情况下。在某些实施方式中，所述提高是至少约三倍、至少约五倍或至少约十倍。

[0152] 当在本文中使用时，术语"调节的治疗半衰期"意味着治疗有效量的IL-2相对于它的未修饰的形式的半衰期的正或负变化。治疗半衰期通过在给药后的各个不同时间点测量所述分子的药代动力学和/或药效学性质来测量。提高的治疗半衰期理想地能够实现特别有益的给药方案、特别有益的总剂量或避免不良作用。在某些实施方式中，所述提高的治疗半衰期由效力的提高、修饰的分子与其靶的结合的提高或降低、所述分子被酶例如蛋白酶分解的提高或降低或所述未修饰的分子的另一种作用参数或作用机制的提高或降低或所述分子的受体介导的清除的提高或降低引起。

[0153] 术语"分离的"当用于核酸或蛋白质时，表示所述核酸或蛋白质至少不含在自然状态下与其相伴的某些细胞组分，或所述核酸或蛋白质已被浓缩到高于它的体内或体外生产的浓度的水平。它可以处于均质状态下。分离的物质可以处于干燥或半干状态下，或者在溶液(包括但不限于水性溶液)中。它可以是另外包含可药用载体和/或赋形剂的药物组合物的组分。纯度和均质性通常使用分析化学技术例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱来确定。作为制剂中存在的主要物质的蛋白质是基本上纯化的。具体来说，分离的基因与在所述基因侧翼并编码感兴趣的基因之外的蛋白质的开放阅读框分离开。术语"纯化的"表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中基本上产生一个条带。具体来说，这可能意味着所述核酸或蛋白质是至少85％纯、至少90％纯、至少95％纯、至少99％或更高纯的。

[0154] 术语"核酸"是指脱氧核糖核苷酸、脱氧核糖核苷、核糖核苷或核糖核苷酸及其采取单链或双链形式的聚合物。除非特别限制，否则所述术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸，其具有与参比核酸相似的结合性质并且以与天然存在的核苷酸相似的方式代

谢。除非另有特别限制，否则所述术语还指寡核苷酸类似物，包括PNA(肽核酸)、在反义技术中使用的DNA的类似物(硫代磷酸酯、氨基磷酸酯等)。除非另有指明，否则特定核酸序列也暗示地涵盖其保守修饰的变体(包括但不限于简并密码子替换)和互补序列以及所述明确指示的序列。具体来说，简并密码子替换可以通过产生其中一个或多个所选(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基替换的序列来实现(Batzer等，Nucleic Acid Res.19:5081(1991)；Ohtsuka等，J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985)；Rossolini等，Mol.Cell.Probes8:91-98(1994))。

[0155] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换地用于指称氨基酸残基的聚合物。也就是说，针对多肽的描述同等地适用于肽的描述和蛋白质的描述，反之亦然。所述术语适用于天然存在的氨基酸聚合物以及其中一个或多个氨基酸残基是非天然编码的氨基酸的氨基酸聚合物。当在本文中使用时，所述术语涵盖任何长度的氨基酸链，包括全长蛋白质，其中所述氨基酸残基通过共价肽键相连。

[0156] 术语“氨基酸”是指天然存在和非天然存在的氨基酸，以及以与所述天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然编码的氨基酸是20种常见氨基酸(丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸)以及吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构、即结合到氢、羧基、氨基和R基团的α碳的化合物，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸甲基锍。这些类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽骨架，但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。对氨基酸的指称包括例如天然存在的蛋白质L-氨基酸，D-氨基酸，化学修饰的氨基酸例如氨基酸变体和衍生物，天然存在的非蛋白质氨基酸例如β-丙氨酸、鸟氨酸等，以及具有本领域中已知是氨基酸特有的性质的化学合成的化合物。非天然存在的氨基酸的实例包括但不限于α-甲基氨基酸(例如α-甲基丙氨酸)、D-氨基酸、组氨酸样氨基酸(例如2-氨基-组氨酸、β-羟基-组氨酸、高组氨酸、α-氟代甲基-组氨酸和α-甲基-组氨酸)、在侧链中具有额外亚甲基的氨基酸(“高”氨基酸)和其中侧链中的羧酸官能团被磺酸基团代替的氨基酸(例如磺基丙氨酸)。非天然氨基酸(包括合成的非天然氨基酸、取代的氨基酸或一种或多种D-氨基酸)在本发明的蛋白质中的并入，可能以大量不同方式有利。含有D-氨基酸的肽等与含有L-氨基酸的对应物相比表现出提高的体外或体内稳定性。因此，当希望或需要更高的细胞内稳定性时，掺有D-氨基酸的肽等的构造可能是特别有用的。更具体来说，D-肽等对内源肽酶和蛋白酶有抗性，因此当这些性质合乎需要时提供了所述分子的提高的生物利用度和延长的体内寿命。此外，D-肽等不能被高效加工以用于II类主要组织相容性复合物限制的向T辅助细胞的呈递，因此不太可能在完整生物体中诱导体液免疫应答。

[0157] 氨基酸在本文中可以用它们的公知的三字母符号或用IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号来指称。同样地，核苷酸可以用它们的普遍接受的单字母编码来指称。

[0158] “保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列两者。对于特定核酸序列而言，“保守修饰的变体”是指编码一致或基本上一致的氨基酸序列的核酸，或者在所述核酸不编码氨基酸序列的情况下是指基本上一致的序列。由于遗传密码的简并性，大量功能上一致的核

酸编码任何给定的蛋白质。例如，密码子GCA、GCC、GCG和GCU均编码氨基酸丙氨酸。因此，在丙氨酸由密码子指定的每个位置处，所述密码子可以被改变成所描述的任一相应密码子，而不改变被编码的多肽。这些核酸变异是“沉默变异”，其是保守修饰的变异中的一种。本文中每个编码多肽的核酸序列也描述了所述核酸的每个可能的沉默变异。本领域普通技术人员将会认识到，核酸中的每个密码子(除了通常是甲硫氨酸的唯一密码子的AUG和通常是色氨酸的唯一密码子的TGG之外)都可以被修饰以产生功能上一致的分子。因此，在每个所描述的序列中暗示了编码多肽的核酸的每个沉默变异。

[0159] 对于氨基酸序列而言，本领域普通技术人员将会认识到，对核酸、肽、多肽或蛋白质序列进行的改变、添加或缺失了所述被编码序列中的单个氨基酸或少量百分数的氨基酸的各个替换、缺失或添加是“保守修饰的变体”，其中所述改变引起氨基酸的缺失、氨基酸的添加或氨基酸被化学上相似的氨基酸的替换。提供了功能上相似的氨基酸的保守替换表对于本领域普通技术人员来说是已知的。这些保守修饰的变体此外还是并且不排除本发明的多态性变体、种间同系物和等位基因。

[0160] 提供了功能上相似的氨基酸的保守替换表对于本领域普通技术人员来说是已知的。下述8组各自含有彼此来说是保守替换的氨基酸：1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G)；2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；4)精氨酸(R)、赖氨酸(K)；5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)；7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；和8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)；(参见例如Creighton，《蛋白质：结构和分子性质》(Proteins:Structures and Molecular Properties)(W H Freeman&Co.，第二版(December 1993))。

[0161] 在两个或更多个核酸或多肽序列的情况下，术语“一致”或百分“同一性”是指两个或更多个序列或子序列是相同的。通过使用下述序列比较算法之一(或本领域普通技术人员可获得的其他算法)或通过手动对齐和目测检查来测量，当将序列在比较窗口或指定区域内比较并对齐以获得最大对应性时，如果它们具有一定百分率的相同的氨基酸残基或核苷酸(即在规定区域内约60％的同一性、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％或约95％的同一性)，则所述序列是“基本上一致的”。这个定义也针对测试序列的互补序列。所述同一性可以存在于长度为至少约50个氨基酸或核苷酸的区域内或长度为75-100个氨基酸或核苷酸的区域内，或者在没有指明的情况下横跨多核苷酸或多肽的整个序列。编码本发明的多肽(包括来自于人类之外的物种的同源物)的多核苷酸，可以通过包括下述步骤的方法来获得：在严紧杂交条件下使用具有本发明的多核苷酸序列或其片段的标记的探针来筛选文库，并分离含有所述多核苷酸序列的全长cDNA和基因组克隆。这种杂交技术对于专业技术人员来说是公知的。

[0162] 短语“选择性(或特异性)杂交到”是指当特定核苷酸序列存在于复杂混合物(包括但不限于总细胞或文库DNA或RNA)中时，在严紧杂交条件下分子仅仅与该特定序列结合、形成双联体或杂交。

[0163] 正如本领域中已知的，短语“严紧杂交条件”是指DNA、RNA、PNA或其他核酸模拟物或其组合的序列在低离子强度和高温条件下的杂交。通常，在严紧条件下，探针将与核酸的复杂混合物(包括但不限于总细胞或文库DNA或RNA)中它的靶子序列杂交，但是不与所述复杂混合物中的其他序列杂交。严紧条件是序列依赖性的，并且在不同情况下不同。较长的序

列在较高温度下特异性杂交。

[0164] 当在本文中使用时，术语“真核生物”是指属于真核生物系统域的生物体，例如动物(包括但不限于哺乳动物、昆虫、爬行类、鸟类等)、纤毛虫、植物(包括但不限于单子叶植物、双子叶植物、藻类等)、真菌、酵母、鞭毛虫、微孢子虫、原生生物等。

[0165] 当在本文中使用时，术语“非真核生物”是指非真核的生物体。例如，非真核生物体可以属于真细菌(包括但不限于大肠杆菌(Escherichia coli)、嗜热栖热菌(Thermus thermophilus)、嗜热脂肪芽孢杆菌(Bacillus stearothermophilus)、荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、恶臭假单胞菌(Pseudomonas putida)等)系统域或古菌(包括但不限于詹氏甲烷球菌(Methanococcus jannaschii)、Methanobacterium thermoautotrophicum、盐杆菌(Halobacterium)例如火山嗜盐杆菌(Haloferax volcanii)和盐杆菌属(Halobacterium)物种NRC-1、Archaeoglobus fulgidus、激烈热球菌(Pyrococcus furiosus)、Pyrococcus horikoshii、Aeuropyrum pernix等)系统域。

[0166] 当在本文中使用时，术语“对象”是指作为治疗、观察或实验的目标的动物，在某些实施方式中是哺乳动物，并且在其他实施方式中是人类。动物可以是伴侣动物(例如狗、猫等)、农场动物(例如奶牛、绵羊、猪、马等)或实验动物(例如大鼠、小鼠、豚鼠等)。

[0167] 当在本文中使用时，术语“有效量”是指给药的所述修饰的非天然氨基酸多肽的在一定程度上缓解所述待治疗的疾病、病症或障碍的一种或多种症状的量。含有本文中描述的修饰的非天然氨基酸多肽的组合物可以被给药以用于预防、增强和/或治疗性治疗。

[0168] 术语“增强”意味着在效力或持续时间任一方面提高或延长所需效果。因此，对于增强治疗性药剂的效果而言，术语“增强”是指在效力或持续时间任一方面提高或延长其他治疗性药剂对系统的效果的能力。当在本文中使用时，“增强有效量”是指在所需系统中足以增强另一种治疗性药剂的效果的量。当在患者中使用时，对这种用途有效的量取决于所述疾病、障碍或病症的严重性和过程、以前的治疗、患者的健康状况和对所述药物的响应以及治疗医生的判断。

[0169] 当在本文中使用时，术语“修饰的”是指对给定多肽做出的任何改变，例如对所述多肽的长度、氨基酸序列、化学结构、多肽的共翻译修饰或翻译后修饰的改变。术语“(修饰的)”形式意味着所讨论的多肽任选被修饰，也就是说，所讨论的多肽可以被修饰或未被修饰。

[0170] 术语“翻译后修饰”是指天然或非天然氨基酸在已被并入到多肽链中之后发生在这个氨基酸上的任何修饰。仅仅作为示例，所述术语涵盖了共翻译体内修饰、共翻译体外修饰(例如在无细胞翻译系统中)、翻译后体内修饰和翻译后体外修饰。

[0171] 在预防性应用中，将含有所述IL-2的组合物给药到易感或以其他方式具有特定疾病、障碍或病症的风险的患者。这种量被定义为“预防有效量”。在这种用途中，精确量也取决于所述患者的健康状况、体重等。通过常规实验(例如剂量递增临床试验)确定这种预防有效量，被认为完全在本领域技术范围之内。

[0172] 在治疗性应用中，将含有所述修饰的非天然氨基酸多肽的组合物以足以治愈或至少部分阻止疾病、病症或障碍的症状的量给药到已经患有所述疾病、病症或障碍的患者。这种量被定义为“治疗有效量”，并且将取决于所述疾病、障碍或病症的严重性和过程、以前的

治疗、患者的健康状况和对所述药物的响应以及治疗医生的判断。通过常规实验(例如剂量递增临床试验)确定这种治疗有效量,被认为完全在本领域技术范围之内。

[0173] 术语“治疗”被用于指称预防性和/或治疗性治疗中的任一者。

[0174] 本文中提出的非天然编码的氨基酸多肽可以包括同位素标记的化合物,其具有被原子量或质量数不同于自然界中通常发现的原子量或质量数的原子代替的一个或多个原子。可以并入到本发明的化合物中的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、氟和氯的同位素,分别例如^{2}H、^{3}H、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{18}O、^{17}O、^{35}S、^{18}F、^{36}Cl。本文中描述的某些同位素标记的化合物,例如其中并入了放射性同位素例如^{3}H和^{14}C的化合物,可能在药物和/或物质的组织分布测定中有用。此外,用同位素例如氘即^{2}H替换,可以得到由更高的代谢稳定性产生的某些治疗优点,例如提高的体内半衰期或降低的剂量要求。

[0175] 所有异构体,包括但不限于非对映异构体、对映异构体及其混合物被认为是本文描述的组合物的一部分。在另外的或其他实施方式中,所述非天然编码的氨基酸多肽在给药到需要的生物体后被代谢以产生代谢物,其随后被用于产生所需效果,包括所需治疗效果。在其他或另外的实施方式中是非天然编码的氨基酸多肽的活性代谢物。

[0176] 在某些情况下,非天然编码的氨基酸多肽可以作为互变异构体存在。此外,本文中描述的非天然编码的氨基酸多肽可以以非溶剂化形式以及与可药用溶剂例如水、乙醇等的溶剂化形式存在。所述溶剂化形式也被认为是在本文中公开。本领域普通技术人员将会认识到,本文中的某些化合物可以以几种互变异构体形式存在。所有这些互变异构体形式被认为是本文描述的组合物的一部分。

[0177] 除非另有指明,否则使用在本领域技术范围之内的质谱术、NMR、HPLC、蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学的常规方法。

[0178] 详细描述

[0179] I.简介

[0180] 在本发明中提供了包含至少一个非天然氨基酸的IL-2分子。在本发明的某些实施方式中,所述具有至少一个非天然氨基酸的IL-2包括至少一个翻译后修饰。在一个实施方式中,所述至少一个翻译后修饰包括利用本领域普通技术人员已知适合于特定反应性基团的化学方法,将包含第二反应性基团的分子附连到包含第一反应性基团的至少一个非天然氨基酸,所述分子包括但不限于标记物、染料、聚合物、水溶性聚合物、聚乙二醇的衍生物、光交联剂、放射性核素、细胞毒性化合物、药物、亲和标记物、光亲和标记物、反应性化合物、树脂、第二蛋白质或多肽或多肽类似物、抗体或抗体片段、金属螯合剂、辅因子、脂肪酸、糖类、多核苷酸、DNA、RNA、反义多核苷酸、糖、水溶性树枝状聚合物、环糊精、抑制性核糖核酸、生物材料、纳米粒子、自旋标记物、荧光团、含金属组成部分、放射活性组成部分、新官能团、与其他分子共价或非共价相互作用的基团、光笼化组成部分、光化辐射可激发的组成部分、可光异构化的组成部分、生物素、生物素的衍生物、生物素类似物、掺有重原子的组成部分、化学可切割基团、光可切割基团、延长的侧链、碳连接的糖、氧化还原活性剂、氨基硫代酸、毒性组成部分、同位素标记的组成部分、生物物理探针、磷光基团、化学发光基团、电子致密基团、磁性基团、嵌入基团、发色团、能量转移试剂、生物活性药剂、可检测标记物、小分子、量子点、纳米发射体、放射性核苷酸、放射性发射体、中子捕获剂或上述分子的任何组合或任何其他所需化合物或物质。例如,所述第一反应性基团是炔基组成部分(包括但不限于所

述非天然氨基酸中的对炔丙氧基苯丙氨酸，其中所述炔丙基有时也被称为乙炔组成部分)并且所述第二反应性基团是叠氮基组成部分，并且利用[3+2]环加成化学方法。在另一个实例中，所述第一反应性基团是叠氮基组成部分(包括但不限于所述非天然氨基酸中的对叠氮基-L-苯丙氨酸或pAZ，正如在本说明书中它有时被称为的)并且所述第二反应性基团是炔基组成部分。在本发明的修饰的IL-2的某些实施方式中，使用包含至少一个翻译后修饰的至少一个非天然氨基酸(包括但不限于含有酮官能团的非天然氨基酸)，其中所述至少一个翻译后修饰包含糖组成部分。在某些实施方式中，所述翻译后修饰在真核细胞中或在非真核细胞中体内制造。接头、聚合物、水溶性聚合物或其他分子可以将所述分子附连到所述多肽。在另一个实施方式中，所述附连到IL-2的接头长得足以允许二聚体的形成。所述分子也可以被直接连接到所述多肽。

[0181] 在某些实施方式中，所述IL-2蛋白包含至少一个由一种宿主细胞在体内制造的翻译后修饰，其中所述翻译后修饰通常不由另一种宿主细胞类型制造。在某些实施方式中，所述蛋白质包括至少一个由真核细胞在体内制造的翻译后修饰，其中所述翻译后修饰通常不由非真核细胞制造。翻译后修饰的实例包括但不限于糖基化、乙酰化、酰化、脂质修饰、棕榈酰化、棕榈酸添加、磷酸化、糖脂连接修饰等。

[0182] 在某些实施方式中，所述IL-2包含一个或多个非天然编码的氨基酸，用于所述多肽的糖基化、乙酰化、酰化、脂质修饰、棕榈酰化、棕榈酸添加、磷酸化或糖脂连接修饰。在某些实施方式中，所述IL-2包含一个或多个非天然编码的氨基酸，用于所述多肽的糖基化。在某些实施方式中，所述IL-2包含一个或多个天然编码的氨基酸，用于所述多肽的糖基化、乙酰化、酰化、脂质修饰、棕榈酰化、棕榈酸添加、磷酸化或糖脂连接修饰。在某些实施方式中，所述IL-2包含一个或多个天然编码的氨基酸，用于所述多肽的糖基化。

[0183] 在某些实施方式中，所述IL-2包含一个或多个非天然编码的氨基酸添加和/或替换，其增强所述多肽的糖基化。在某些实施方式中，所述IL-2包含一个或多个缺失，其增强所述多肽的糖基化。在某些实施方式中，所述IL-2包含一个或多个非天然编码的氨基酸添加和/或替换，其增强所述多肽中不同氨基酸处的糖基化。在某些实施方式中，所述IL-2包含一个或多个缺失，其增强所述多肽中不同氨基酸处的糖基化。在某些实施方式中，所述IL-2包含一个或多个非天然编码的氨基酸添加和/或替换，其增强所述多肽中非天然编码的氨基酸处的糖基化。在某些实施方式中，所述IL-2包含一个或多个非天然编码的氨基酸添加和/或替换，其增强所述多肽中天然编码的氨基酸处的糖基化。在某些实施方式中，所述IL-2包含一个或多个天然编码的氨基酸添加和/或替换，其增强所述多肽中不同氨基酸处的糖基化。在某些实施方式中，所述IL-2包含一个或多个非天然编码的氨基酸添加和/或替换，其增强所述多肽中天然编码的氨基酸处的糖基化。在某些实施方式中，所述IL-2包含一个或多个非天然编码的氨基酸添加和/或替换，其增强所述多肽中非天然编码的氨基酸处的糖基化。

[0184] 在一个实施方式中，所述翻译后修饰包括将寡糖(包括但不限于其中寡糖包含$(GlcNAc-Man)_2$-Man-GlcNAc-GlcNAc等的情况)通过GlcNAc-天冬酰胺连接附连到天冬酰胺。在另一个实施方式中，所述翻译后修饰包括将寡糖(包括但不限于Gal-GalNAc、Gal-GlcNAc等)通过GalNAc-丝氨酸、GalNAc-苏氨酸、GlcNAc-丝氨酸或GlcNAc-苏氨酸连接附连到丝氨酸或苏氨酸。在某些实施方式中，本发明的蛋白质或多肽可以包含分泌或定位序列、

表位标签、FLAG标签、聚组氨酸标签、GST融合体等。分泌信号序列的实例包括但不限于原核分泌信号序列、真核分泌信号序列、5'-优化以用于细菌表达的真核分泌信号序列、新的分泌信号序列、果胶酸裂解酶分泌信号序列、Omp A分泌信号序列和噬菌体分泌信号序列。分泌信号序列的实例包括但不限于STII(原核生物)、Fd GIII和M13(噬菌体)、Bgl2(酵母)和源自于转座子的信号序列bla。任何此类序列可以被修饰以为所述多肽提供所需结果,包括但不限于将一个信号序列用不同信号序列替换,将前导序列用不同前导序列替换等。

[0185] 所述感兴趣的蛋白质或多肽可以含有至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或十个或更多个非天然氨基酸。所述非天然氨基酸可以是相同或不同的,例如,在所述蛋白质中可以存在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个不同位点,其包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个不同的非天然氨基酸。在某些实施方式中,在所述蛋白质的天然存在的形式中存在的至少一个但少于所有的特定氨基酸被非天然氨基酸替换。

[0186] 本发明提供了基于包含至少一个非天然编码的氨基酸的IL-2的方法和组合物。至少一个非天然编码的氨基酸在IL-2中的引入,可以允许使用涉及包括但不限于与一个或多个非天然编码的氨基酸反应同时不与常见的20种氨基酸反应的特定化学反应的偶联化学。在某些实施方式中,包含所述非天然编码的氨基酸的IL-2通过所述非天然编码的氨基酸的侧链连接到水溶性聚合物例如聚乙二醇(PEG)。本发明提供了一种用PEG衍生物选择性修饰蛋白质的高效方法,所述方法包括对选择器密码子做出响应将非遗传编码的氨基酸(包括但不限于含有在20种天然并入的氨基酸中不存在的官能团或取代基(包括但不限于酮、叠氮基或乙炔组成部分)的氨基酸)选择性并入到蛋白质中,随后用适合的反应性PEG衍生物修饰那些氨基酸。一旦并入后,然后可以利用本领域普通技术人员已知的适合于所述非天然编码的氨基酸中存在的特定官能团或取代基的化学方法来修饰氨基酸侧链。广泛类型的已知化学方法适合在本发明中用于将水溶性聚合物并入到所述蛋白质中。这些方法包括但不限于分别使用包括但不限于乙炔或叠氮化物衍生物的Huisgen[3+2]环加成反应(参见例如Padwa,A.,《综合有机合成》(Comprehensive Organic Synthesis),Vol.4,(1991)Ed.Trost,B.M.,Pergamon,Oxford,p.1069-1109;和Huisgen,R.,《1,3-偶极环加成化学》(1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry),(1984)Ed.Padwa,A.,Wiley,New York,p.1-176)。

[0187] 由于所述Huisgen[3+2]环加成方法涉及环加成而不是亲核取代反应,因此蛋白质可以以极高的选择性修饰。通过向反应混合物添加催化量的Cu(I)盐,所述反应可以在室温下在水性条件中以极好的区位选择性(1,4>1,5)进行。参见例如Tornoe等,(2002)J.Org.Chem.67:3057-3064;和Rostovtsev等,(2002)Angew.Chem.Int.Ed.41:2596-2599;以及WO 03/101972。可以通过[3+2]环加成添加到本发明的蛋白质的分子事实上包括具有适合的官能团或取代基的任何分子,包括但不限于叠氮基或乙炔衍生物。这些分子可以被添加到具有乙炔基团的非天然氨基酸,包括但不限于对炔丙氧基苯丙氨酸,或具有叠氮基的非天然氨基酸,包括但不限于对叠氮基-苯丙氨酸。

[0188] 所述从Huisgen[3+2]环加成得到的5元环在还原环境中通常不可逆,并且在水性环境中针对水解长期稳定。因此,广泛类型的物质的物理和化学特性可以在高要求的水性条件下用本发明的活性PEG衍生物修改。甚至更重要的是,由于叠氮基和乙炔组成部分是彼

此特异的(并且不与例如20种常用的遗传编码的氨基酸中的任一者反应),因此蛋白质可以在一个或多个特定位点中以极高的选择性修饰。

[0189] 本发明还提供了水溶性和水解稳定的PEG衍生物和相关的具有一个或多个乙炔或叠氮基组成部分的亲水性聚合物。所述含有乙炔组成部分的PEG聚合物衍生物,对于与对选择器密码子做出响应已被选择性引入到蛋白质中的叠氮基组成部分的偶联来说是高选择性的。同样地,含有叠氮基组成部分的PEG聚合物衍生物,对于与对选择器密码子做出响应已被选择性引入到蛋白质中的乙炔组成部分的偶联来说是高选择性的。

[0190] 更具体来,所述叠氮基组成部分包括但不限于烷基叠氮化物、芳基叠氮化物和这些叠氮化物的衍生物。所述烷基和芳基叠氮化物的衍生物可以包括其他取代基,只要乙炔特异性反应性得以维持即可。所述乙炔组成部分包含烷基和芳基乙炔化合物和每一者的衍生物。所述烷基和芳基乙炔化合物的衍生物可以包括其他取代基,只要所述叠氮基特异性反应性得以维持即可。

[0191] 本发明提供了具有广泛类型的官能团、取代基或组成部分的物质与其他物质的偶联物,所述其他物质包括但不限于标记物、染料、聚合物、水溶性聚合物、聚乙二醇的衍生物、光交联剂、放射性核素、细胞毒性化合物、药物、亲和标记物、光亲和标记物、反应性化合物、树脂、第二蛋白质或多肽或多肽类似物、抗体或抗体片段、金属螯合剂、辅因子、脂肪酸、糖类、多核苷酸、DNA、RNA、反义多核苷酸、糖、水溶性树枝状聚合物、环糊精、抑制性核糖核酸、生物材料、纳米粒子、自旋标记物、荧光团、含金属组成部分、放射活性组成部分、新官能团、与其他分子共价或非共价相互作用的基团、光笼化组成部分、光化辐射可激发的组成部分、可光异构化的组成部分、生物素、生物素的衍生物、生物素类似物、掺有重原子的组成部分、化学可切割基团、光可切割基团、延长的侧链、碳连接的糖、氧化还原活性剂、氨基硫代酸、毒性组成部分、同位素标记的组成部分、生物物理探针、磷光基团、化学发光基团、电子致密基团、磁性基团、嵌入基团、发色团、能量转移试剂、生物活性药剂、可检测标记物、小分子、量子点、纳米发射体、放射性核苷酸、放射性发射体、中子捕获剂或上述物质的任何组合或任何其他所需化合物或物质。本发明还包括具有叠氮基或乙炔组成部分的物质与具有相应的乙炔或叠氮基组成部分的PEG聚合物衍生物的偶联物。例如,含有叠氮基组成部分的PEG聚合物可以在所述蛋白质中含有带有乙炔官能团的非遗传编码的氨基酸的位置处偶联到生物活性分子。将所述PEG与所述生物活性分子偶联的连接包括但不限于Huisgen[3+2]环加成产物。

[0192] 在本领域中已明确PEG可用于修饰生物材料的表面(参见例如美国专利6,610,281;Mehvar,R.,J.Pharm Sci.,3(1):125-136(2000),它们通过引用并入本文)。本发明还包括表面具有一个或多个反应性叠氮基或乙炔位点并且一种或多种本发明的含叠氮基或乙炔的聚合物通过Huisgen[3+2]环加成连接偶联到所述表面的生物材料。生物材料和其他物质也可以通过叠氮基或乙炔连接之外的连接,例如通过包含羧酸、胺、醇或硫醇组成部分的连接偶联到所述叠氮基或乙炔活化的聚合物衍生物,以留下可用于后续反应的所述叠氮基或乙炔组成部分。

[0193] 本发明包括合成本发明的含叠氮基和乙炔的聚合物的方法。在所述含叠氮基PEG衍生物的情况下,所述叠氮基可以被直接键合到所述聚合物的碳原子。或者,所述含叠氮基PEG衍生物可以通过将具有叠氮基组成部分的连接试剂附连到常规活化的聚合物的一个末

端来制备，使得所述得到的聚合物在其末端具有所述叠氮基组成部分。在所述含乙炔PEG衍生物的情况下，所述乙炔可以被直接键合到所述聚合物的碳原子。或者，所述含乙炔PEG衍生物可以通过将具有乙炔组成部分的连接试剂附连到常规活化的聚合物的一个末端来制备，使得所述得到的聚合物在其末端具有所述乙炔组成部分。

[0194] 更具体来说，在所述含叠氮基PEG衍生物的情况下，具有至少一个活性羟基组成部分的水溶性聚合物经历反应，以产生在其上具有更高反应性组成部分例如甲磺酸酯、三苯甲酸酯、甲苯磺酸酯或卤素离去基团的取代的聚合物。含有磺酰卤、卤素原子和其他离去基团的PEG衍生物的制备和使用对于本领域普通技术人员来说是已知的。所述得到的取代的聚合物然后经历反应，以用所述更高反应性组成部分取代所述聚合物末端处的叠氮基组成部分。或者，具有至少一个活性亲核或亲电组成部分的水溶性聚合物与在一个末端处具有叠氮基的连接试剂经历反应，以便在所述PEG聚合物与所述连接试剂之间形成共价键，并且所述叠氮基组成部分位于所述聚合物的末端处。亲核和亲电组成部分，包括胺、硫醇、酰肼、肼、醇、羧酸酯、醛、酮、硫酯等，对于本领域普通技术人员来说是已知的。

[0195] 更具体来说，在所述含乙炔PEG衍生物的情况下，具有至少一个活性羟基组成部分的水溶性聚合物经历反应，以从含有乙炔组成部分的前体置换卤素或其他活化的离去基团。或者，具有至少一个活性亲核或亲电组成部分的水溶性聚合物与在一个末端处具有乙炔的连接试剂经历反应，以便在所述PEG聚合物与所述连接试剂之间形成共价键，并且所述乙炔组成部分位于所述聚合物的末端处。卤素组成部分、活化的离去基团、亲核和亲电组成部分在有机合成的背景中和PEG衍生物的制备和使用中的用途，对于本领域中的从业人员来说是明确的。

[0196] 本发明还提供了一种选择性修饰蛋白质以向所述修饰的蛋白质添加其他物质的方法，所述其他物质包括但不限于水溶性聚合物例如PEG和含有叠氮基或乙炔组成部分的PEG衍生物。所述含叠氮基和乙炔的PEG衍生物可用于修改其中生物相容性、稳定性、溶解性和缺少免疫原性是重要的表面和分子的性质，并在同时提供将所述PEG衍生物附连到蛋白质的比本领域中以前已知的更具选择性的手段。

[0197] II.用于本发明的通用重组核酸方法

[0198] 在本发明的大量实施方式中，编码感兴趣的IL-2的核酸将使用重组方法来分离、克隆并通常进行改变。这些实施方式用于包括但不限于蛋白质表达或源自于IL-2的变体、衍生物、表达盒或其他序列的产生期间。在某些实施方式中，编码本发明的多肽的序列被可操作连接到异源启动子。

[0199] 成熟人类IL-2蛋白的氨基酸序列示出在下面的表1中。

[0200] 表1-IL-2蛋白和DNA序列

[0201]

SEQ. ID. NO.	描述	序列
1	氨基酸序列 - 带有前导序列的野生型 IL-2（真核表达）	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTS SSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGI NNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQ SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FCQSIISTLT
2	氨基酸序列 - 成熟人类 IL-2 蛋白（真核表达）	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP KKATELKHLQCLEEELKPLEEVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL ELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT
3	氨基酸序列 - 在大肠杆菌中表达的成熟人类 IL-2 蛋白	MPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMP KKATELKHLQCLEEELKPLEEVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL ELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFSQSIISTLT

[0202]

4	DNA 序列 - 克隆到 pKG0269 表达质粒中的合成的人类 IL-2 基因（大肠杆菌密码子优化的）	ATGCCGACCAGCAGTAGCACCA AGAAAACTCAGCTGCAGCTGGA GCATCTGCTGCTGGATTTACAGA TGATTCTGAATGGCATTAATAAT TACAAAAATCCGAAACTGACCC GCATGCTGACCTTCAAGTTCTAC ATGCCGAAGAAGGCCACCGAAC TGAAGCATCTGCAGTGTTTAGA AGAGGAACTGAAGCCGCTGGAA GAGGTGCTGAATTTAGCCCAGA GCAAAAACTTCCATCTGCGCCC GCGCGATTTAATTAGCAATATTA ACGTGATTGTGCTGGAACTGAA AGGCAGCGAGACCACCTTTATG TGCGAGTACGCAGATGAGACCG CCACCATCGTGGAATTTTTAAAC

[0203]

		CGCTGGATCACCTTCAGCCAGA GTATCATTAGCACTTTAACC
5	氨基酸序列 - 在大肠杆菌中表达的在起始密码子 ATG 后具有 N-端丙氨酸的成熟人类 IL-2 蛋白	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFSQSIISTLT
6	DNA 序列 - 在起始密码子 ATG 后具有 N-端丙氨酸的人类 IL-2 蛋白	ATG GCA CCG ACC AGC AGT AGC ACC AAG AAA ACT CAG CTG CAG CTG GAG CAT CTG CTG CTG GAT TTA CAG ATG ATT CTG AAT GGC ATT AAT AAT TAC AAA AAT CCG AAA CTG ACC CGC ATG CTG ACC TTC AAG TTC TAC ATG CCG AAG AAG GCC ACC GAA CTG AAG CAT CTG CAG TGT TTA GAA GAG GAA CTG AAG CCG CTG GAA GAG GTG CTG AAT TTA GCC CAG AGC AAA AAC TTC CAT CTG CGC CCG CGC GAT TTA ATT AGC AAT ATT AAC GTG ATT GTG CTG GAA CTG AAA GGC AGC GAG ACC ACC TTT ATG TGC GAG TAC GCA GAT GAG ACC GCC ACC ATC GTG GAA TTT TTA AAC CGC TGG ATC ACC TTC AGC CAG AGT ATC ATT AGC ACT

		TTA ACC
7	氨基酸序列 - 在大肠杆菌中表达的在起始密码子 ATG 后具有 N-端脯氨酸缺失的成熟人类 IL-2 蛋白	MTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNL AQSKNFHLRPRDLISNINVIVLEL KGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFSQSIISTLT
8	DNA 编码序列 - 在起始密码子 ATG 后具有 N-端脯氨酸缺失的人类 IL-2 蛋白	ATG ACC AGC AGT AGC ACC AAG AAA ACT CAG CTG CAG CTG GAG CAT CTG CTG CTG GAT TTA CAG ATG ATT CTG AAT GGC ATT AAT AAT TAC AAA AAT CCG AAA CTG ACC CGC ATG CTG ACC TTC AAG TTC TAC ATG CCG AAG AAG GCC ACC GAA CTG AAG CAT CTG CAG TGT TTA GAA GAG GAA CTG AAG CCG CTG GAA GAG GTG CTG AAT TTA GCC CAG AGC AAA AAC TTC CAT CTG CGC CCG CGC GAT TTA ATT AGC AAT ATT AAC GTG ATT GTG CTG GAA CTG AAA GGC AGC GAG ACC ACC TTT ATG TGC GAG TAC GCA GAT GAG ACC GCC ACC ATC GTG GAA TTT TTA AAC CGC TGG ATC ACC TTC AGC CAG AGT ATC ATT AGC ACT TTA ACC

[0204]

[0205] 编码包含非天然编码的氨基酸的IL-2的核苷酸序列可以在包括但不限于具有SEQ ID NO:1、2、3、5或7中示出的氨基酸序列的母体多肽的氨基酸序列的基础上合成，然后改变所述核苷酸序列以便执行相关氨基酸残基的引入(即并入或替换)或移除(即缺失或替换)。

所述核苷酸序列可以按照常规方法通过定点诱变方便地修改。或者,所述核苷酸序列可以通过化学合成来制备,包括但不限于通过使用寡核苷酸合成仪,其中寡核苷酸在所需多肽的氨基酸序列的基础上设计,并优选地选择那些在将要在其中生产所述重组多肽的宿主细胞中有利的密码子。例如,编码所需多肽的部分的几个小的寡核苷酸可以通过PCR、连接或连接链反应来合成和组装。参见例如Barany等,Proc.Natl.Acad.Sci.88:189-193(1991);美国专利6,521,427,其通过引用并入本文。

[0206] 克隆到pKG0269表达质粒中的合成的人类IL-2基因的DNA序列在上文表1中被显示为SEQ ID NO:4。该DNA序列已进行大肠杆菌密码子优化。

[0207] 本发明利用重组遗传学领域中的常规技术。公开了本发明中使用的通用方法的基础性文本包括Sambrook等,《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning,A Laboratory Manual)(第3版,2001);Kriegler,《基因转移和表达实验指南》(Gene Transfer and Expression:ALaboratory Manual)(1990);和《分子生物学现代方法》(Current Protocols in Molecular Biology)(Ausubel等主编,1994)。

[0208] 本发明还涉及用于通过正交tRNA/RS对体内并入非天然氨基酸的真核宿主细胞、非真核宿主细胞和生物体。宿主细胞用本发明的多核苷酸或包括本发明的多核苷酸的构建物(包括但不限于本发明的载体)进行遗传工程改造(包括但不限于转化、转导或转染),所述载体可以是例如克隆载体或表达载体。

[0209] 将靶核酸引入到细胞中的几种公知的方法是可用的,其中的任一者可用于本发明。这些方法包括:受体细胞与含有所述DNA的细菌原生质体的融合,电穿孔,弹丸轰击,和用病毒载体感染(在下文进一步讨论)等。细菌细胞可用于扩增含有本发明的DNA构建物的质粒的数目。将所述细菌生长至对数期,并可以通过本领域中已知的各种不同方法(参见例如Sambrook)分离所述细菌内的质粒。此外,用于从细菌纯化质粒的试剂盒是可商购的(参见例如均来自于Pharmacia Biotech的EasyPrep™、FlexiPrep™;来自于Stratagene的StrataClean™;和来自于Qiagen的QIAprep™)。然后将所述分离和纯化的质粒进一步操作,以产生用于转染细胞或并入到相关载体中以感染生物体的其他质粒。典型的载体含有转录和翻译终止子、转录和翻译起始序列和可用于调控所述特定靶核酸的表达的启动子。所述载体任选地包含通用表达盒,其含有至少一个独立的终止子序列、允许所述表达盒在真核生物或原核生物或两者中复制的序列(包括但不限于穿梭载体)和用于原核和真核系统两者的选择标记。载体适合于在原核生物、真核生物或两者中复制和整合。参见Gillam&Smith,Gene 8:81(1979);Roberts等,Nature,328:731(1987);Schneider,E.等,Protein Expr.Purif.6(1):10-14(1995);Ausubel,Sambrook,Berger(全部同上)。可用于克隆的细菌和噬菌体的目录被例如ATCC提供,例如《ATCC细菌和噬菌体目录》(ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage)(1992),Gherna等主编,由ATCC出版。其他用于测序、克隆的基本程序和分子生物学的其他方面以及隐含的理论考虑,也在Watson等,(1992),《重组DNA》(Recombinant DNA)第二版,Scientific American Books,NY中找到。此外,实质上任何核酸(和实际上任何标记的核酸,不论是标准还是非标准的)可以从各种不同的商业来源中的任一种定制或标准订购,所述来源例如Midland Certified Reagent Company(Midland,TX,可以在万维网网址mcrc.com处获得)、The Great American Gene Company(Ramona,CA,可以在万维网网址genco.com处获得)、ExpressGen Inc.(Chicago,IL,可以在

万维网网址expressgen.com处获得)、Operon Technologies Inc.(Alameda,CA)和许多其他来源。

[0210] 选择器密码子

[0211] 本发明的选择器密码子扩展了蛋白质生物合成机器的遗传密码子构架。例如,选择器密码子包括但不限于独特的三碱基密码子、无义密码子例如终止密码子(包括但不限于琥珀密码子(UAG)、赭石密码子或卵白石密码子(UGA))、非天然密码子、四或更多碱基密码子、稀有密码子等。对于本领域普通技术人员来说显而易见的是,可以引入到所需基因或多核苷酸中的选择器密码子的数目具有广阔范围,包括但不限于在编码所述IL-2的至少一部分的单一多核苷酸中一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、4、5、6、7、8、9、10个或更多个。

[0212] 在一个实施方式中,所述方法包括将作为终止密码子的选择器密码子用于在体内并入一个或多个非天然氨基酸。例如,生产了一种O-tRNA,其识别终止密码子(包括但不限于UAG),并被带有所需非天然氨基酸的O-RS氨酰化,这个O-tRNA不被天然存在的宿主的氨酰基-tRNA合成酶识别。常规的定点诱变可用于将所述终止密码子(包括但不限于TAG)引入到感兴趣的多肽中的感兴趣的位点处。参见例如Sayers,J.R.等,(1988),基于硫代磷酸酯的寡核苷酸引导的诱变中的5'-3'外切核酸酶(5'-3'Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis),Nucleic Acids Res,16:791-802。当所述O-RS、O-tRNA和编码所述感兴趣的多肽的核酸在体内组合时,对所述UAG密码子做出响应所述非天然氨基酸被并入,以给出在指定位置处含有所述非天然氨基酸的多肽。

[0213] 非天然氨基酸的体内并入可以在不显著扰乱真核宿主细胞的情况下进行。例如,由于UAG密码子的抑制效率取决于所述O-tRNA(包括但不限于琥珀抑制子tRNA)与真核释放因子(包括但不限于eRF)(其结合到终止密码子并启动生长的肽从核糖体的释放)之间的竞争,因此所述抑制效率可以通过包括但不限于提高O-tRNA和/或抑制子tRNA的表达水平来调节。

[0214] 非天然氨基酸也可以用稀有密码子编码。例如,已证明当在体外蛋白质合成反应中精氨酸的浓度降低时,稀有精氨酸密码子AGG通过用丙氨酸酰化的合成的tRNA高效地插入Ala。参见例如Ma等,Biochemistry,32:7939(1993)。在这种情况下,所述合成的tRNA与作为次要品种存在于大肠杆菌中的天然存在的tRNAArg竞争。某些生物体不使用所有三联体密码子。藤黄微球菌(Micrococcus luteus)中未指派的密码子AGA已被用于在体外转录/翻译提取物中用于插入氨基酸。参见例如Kowal和Oliver,Nucl.Acid.Res.,25:4685(1997)。可以产生本发明的组分以在体内使用这些稀有密码子。

[0215] 选择器密码子还包括延长的密码子,包括但不限于四或更多碱基密码子例如四、五、六或更多碱基密码子,四碱基密码子的实例包括但不限于AGGA、CUAG、UAGA、CCCU等。五碱基密码子的实例包括但不限于AGGAC、CCCCU、CCCUC、CUAGA、CUACU、UAGGC等。本发明的特点包括使用基于移码抑制的延长的密码子。四或更多碱基密码子可以将包括但不限于一个或多个非天然氨基酸插入到同一蛋白质中。例如,在具有反密码子环例如具有至少8-10nt的反密码子环的突变的O-tRNA(包括但不限于特殊移码抑制子tRNA)存在下,所述四或更多碱基密码子被读为单一氨基酸。在其他实施方式中,所述反密码子环可以解码包括但不限

于至少四碱基密码子、至少五碱基密码子或至少六碱基密码子或更多碱基密码子。由于存在256种可能的四碱基密码子,因此可以使用四或更多碱基密码子在同一细胞中编码多种非天然氨基酸。参见Anderson等,探索密码子和反密码子尺寸的限制(Exploring the Limits of Coden and Anticodon Size),Chemistry and Biology,9:237-244,(2002);Magliery,扩展遗传密码:四碱基密码子的高效抑制子的选择和在大肠杆菌中使用文库方法鉴定"移动的"四碱基密码子(Expanding the Genetic Code:Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codens and Identification of"Shifty"Four-base Codens with a Library Approach in Escherichia coli),J.Mol.Biol.307:755-769(2001)。

[0216] 例如,四碱基密码子已被用于在体外生物合成方法中将非天然氨基酸并入到蛋白质中。参见例如Ma等,Biochemistry,32:7939,(1993);和Hohsaka等,J.Am.Chem.Soc.,121:34(1999)。CGGG和AGGU被用于在体外使用两种化学酰化的移码抑制子tRNA,同时将2-萘基丙氨酸和赖氨酸的NBD衍生物并入到链亲合素中。参见例如Hohsaka等,J.Am.Chem.Soc.,121:12194(1999)。在体内研究中,Moore等检查了具有NCUA反密码子的tRNALeu衍生物抑制UAGN密码子(N可以是U、A、G或C)的能力,并发现所述四联体UAGA可以被具有UCUA反密码子的tRNALeu以13至26%的效率解码,并且在0或-1框中很少解码。参见Moore等,J.Mol.Biol.,298:195(2000)。在一个实施方式中,基于稀有密码子或无义密码子的延长的密码子可用于本发明,其可以减少在其他不想要的位点处的错义通读和移码抑制。

[0217] 对于给定系统来说,选择器密码子也可以包括天然的三碱基密码子之一,其中所述内源系统不使用(或罕见使用)所述天然的碱基密码子。例如,这包括缺少识别所述天然的三碱基密码子的tRNA的系统和/或其中所述三碱基密码子是稀有密码子的系统。

[0218] 选择器密码子任选地包括非天然碱基对。这些非天然碱基对进一步扩展了现有的遗传字母表。一个额外的碱基对将三联体密码子的数目从64增加到125。第三碱基对的性质包括稳定和选择性碱基配对,被聚合物以高保真度高效地酶促并入到DNA中,以及在新生的非天然碱基对合成后高效的继续引物延伸。可以被改造以适用于方法和组合物的非天然碱基对的描述包括例如Hirao等,用于将氨基酸类似物并入到蛋白质中的非天然碱基对(An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein),Nature Biotechnology,20:177-182,(2002)。也参见Wu,Y.等,J.Am.Chem.Soc.124:14626-14630(2002)。其他相关的出版物在下文列出。

[0219] 对于体内使用来说,所述非天然核苷是可透过膜的,并被磷酸化以形成相应的三磷酸酯。此外,所述增加的遗传信息是稳定的,并且不被细胞的酶破坏。以前由Benner和其他人做出的尝试利用了与经典的Watson-Crick对中不同的氢键结合模式,其最值得注意的实例是iso-C:iso-G对。参见例如Switzer等,J.Am.Chem.Soc.,111:8322(1989);和Piccirilli等,Nature,343:33(1990);Kool,Curr.Opin.Chem.Biol.,4:602(2000)。这些碱基通常在一定程度上与天然碱基错误配对,并且不能被酶促复制。Kool和合作者证实了碱基之间的疏水堆积相互作用可以代替氢键结合来驱动碱基对的形成。参见Kool,Curr.Opin.Chem.Biol.,4:602(2000);和Guckian和Kool,Angew.Chem.Int.Ed.Engl.,36,2825(1998)。在开发满足所有上述要求的非天然碱基对的尝试中,Schultz、Romesberg和合作者系统性地合成并研究了一系列非天然疏水碱基。发现PICS:PICS自身配对比天然碱基对更加稳定,并且可以通过大肠杆菌DNA聚合酶I的Klenow片段(KF)高效并入到DNA中。参见

例如McMinn等,J.Am.Chem.Soc.,121:11585-6(1999);和Ogawa等,J.Am.Chem.Soc.,122:3274(2000)。3MN:3MN自身配对可以通过KF以对生物功能来说足够的效率和选择性而合成。参见例如Ogawa等,J.Am.Chem.Soc.,122:8803(2000)。然而,两种碱基对于进一步复制来说起到链终止剂的作用。最近已进化出突变的DNA聚合酶,其可用于复制PICS自身配对。此外,7AI自身配对可以被复制。参见例如Tae等,J.Am.Chem.Soc.,123:7439(2001)。新的金属碱基对Dipic:Py也已被开发,其在结合Cu(II)后形成稳定的对。参见Meggers等,J.Am.Chem.Soc.,122:10714(2000)。由于延长的密码子和非天然密码子固有地与天然密码子正交,因此本发明的方法可以利用这种性质来产生用于它们的正交tRNA。

[0220] 翻译旁路系统也可用于将非天然氨基酸并入到所需多肽中。在翻译旁路系统中,大的序列被并入到基因中但不被翻译成蛋白质。所述序列含有充当线索以诱导核糖体跳过所述序列并在所述插入的下游恢复翻译的结构。

[0221] 在某些实施方式中,在本发明的方法和/或组合物中,感兴趣的蛋白质或多肽(或其部分)由核酸编码。通常,所述核酸包含至少一个选择器密码子、至少两个选择器密码子、至少三个选择器密码子、至少四个选择器密码子、至少五个选择器密码子、至少六个选择器密码子、至少七个选择器密码子、至少八个选择器密码子、至少九个选择器密码子、十个或更多个选择器密码子。

[0222] 为感兴趣的蛋白质或多肽编码的基因可以使用本领域普通技术人员已知并且在本文中描述的方法来诱变,以包含例如一个或多个用于并入非天然氨基酸的选择器密码子。例如,用于感兴趣的蛋白质的核酸被诱变以包含一个或多个选择器密码子,以供一个或多个非天然氨基酸的并入。本发明包括任何蛋白质的任何此类变体,包括但不限于突变体形式,例如包括至少一个非天然氨基酸。同样地,本发明还包括相应的核酸,即具有编码一个或多个非天然氨基酸的一个或多个选择器密码子的任何核酸。

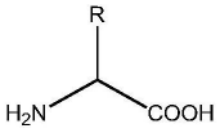
[0223] 编码感兴趣的蛋白质例如IL-2的核酸分子可以被容易地突变,以在所述多肽的任何所需位置处引入半胱氨酸。半胱氨酸被广泛用于在感兴趣的蛋白质上引入反应性分子、水溶性聚合物、蛋白质或广泛类型的其他分子。适合于将半胱氨酸并入到多肽的所需位置中的方法对于本领域普通技术人员来说是已知的,例如在通过引用并入本文的美国专利号6,608,183中所描述的和标准的诱变技术。

[0224] III.非天然编码的氨基酸

[0225] 广泛类型的非天然编码的氨基酸适用于本发明。可以将任何数目的非天然编码的氨基酸引入到IL-2中。一般来说,所述引入的非天然编码的氨基酸对20种常见的遗传编码的氨基酸(即丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸)是基本上化学惰性的。在某些实施方式中,所述非天然编码的氨基酸包括与20种常见氨基酸中不存在的官能团(包括但不限于叠氮基、酮、醛和氨氧基)高效并选择性地反应以形成偶联物的侧链官能团。例如,包括含有叠氮基官能团的非天然编码的氨基酸的IL-2可以与聚合物(包括但不限于聚乙二醇或含有炔基组成部分的第二多肽)反应以形成稳定的偶联物,这是因为所述叠氮基和炔官能团的选择性反应以形成Huisgen[3+2]环加成产物。

[0226] α-氨基酸的通用结构示出如下(式I):

[0227] I

[0228] 

[0229] 非天然编码的氨基酸通常是具有上面列出的结构式的任何结构，其中R基团是在20种天然氨基酸中使用的取代基之外的任何取代基，并且可以被适合地用于本发明。由于本发明的非天然编码的氨基酸通常仅仅在侧链的结构上不同于天然氨基酸，因此所述非天然编码的氨基酸与其他氨基酸(包括但不限于天然或非天然编码的氨基酸)形成酰胺键，其方式与它们在天然存在的多肽中形成的方式相同。然而，所述非天然编码的氨基酸具有不同于所述天然氨基酸的侧链基团。例如，R任选地包括烷基-、芳基-、酰基-、酮-、叠氮基-、羟基-、肼、氰基-、卤代-、酰肼、烯基、炔基、醚、硫醇、硒代-、磺酰基-、硼酸酯、硼酸基、磷酰基、膦酰基、膦、杂环、烯酮、亚胺、醛、酯、硫代酸、羟胺、氨基等或其任何组合。可能适用于本发明的其他感兴趣的非天然存在的氨基酸包括但不限于包含可光活化的交联剂的氨基酸、自旋标记的氨基酸、荧光氨基酸、结合金属的氨基酸、含金属氨基酸、放射性氨基酸、具有新官能团的氨基酸、与其他分子共价或非共价相互作用的氨基酸、光笼化和/或可光异构化的氨基酸、包含生物素或生物素类似物的氨基酸、糖基化氨基酸例如糖取代的丝氨酸、其他糖类修饰的氨基酸、含酮基氨基酸、包含聚乙二醇或聚醚的氨基酸、重原子取代的氨基酸、化学可切割和/或光可切割氨基酸、具有与天然氨基酸相比延长的侧链(包括但不限于聚醚或长链烃类，包括但不限于大于约5或大于约10个碳的长链烃类)的氨基酸、碳连接的含糖氨基酸、氧化还原活性氨基酸、含有氨基硫代酸的氨基酸和包含一个或多个毒性组成部分的氨基酸。

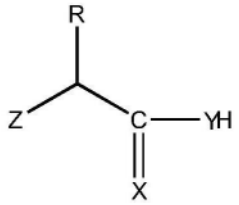
[0230] 可能适合用于本发明并且可用于与水溶性聚合物反应的示例性的非天然编码的氨基酸包括但不限于具有羰基、氨氧基、肼、酰肼、氨基脲、叠氮基和炔反应性基团的非天然编码的氨基酸。在某些实施方式中，非天然编码的氨基酸包含糖组成部分。此类氨基酸的实例包括N-乙酰基-L-葡萄糖胺基-L-丝氨酸、N-乙酰基-L-半乳糖胺基-L-丝氨酸、N-乙酰基-L-葡萄糖胺基-L-苏氨酸、N-乙酰基-L-葡萄糖胺基-L-天冬酰胺和O-甘露糖胺基-L-丝氨酸。此类氨基酸的实例还包括其中所述氨基酸与糖之间的天然存在的N-或O-连接被自然界中不常见的共价连接(包括但不限于烯烃、肟、硫醚、酰胺等)代替的实例。此类氨基酸的实例还包括在天然存在的蛋白质中不常见的糖类例如2-脱氧葡萄糖、2-脱氧半乳糖等。

[0231] 本文中提供的许多非天然编码的氨基酸是可商购的，例如从Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA)、Novabiochem(EMD Biosciences的分部，Darmstadt,Germany)或Peptech(Burlington,MA,USA)商购。那些不可商购的非天然编码的氨基酸任选地如本文中所提供或使用本领域普通技术人员已知的标准方法来合成。对于有机合成技术，参见例如Fessendon和Fessendon的《有机化学》(Organic Chemistry)第二版，Willard Grant Press,Boston Mass(1982)；March的《高等有机化学》(Advanced Organic Chemistry)第三版，Wiley and Sons,New York(1985)；以及Carey和Sundberg的《高等有机化学》(Advanced Organic Chemistry)第三版，部分A和B，Plenum Press,New York(1990)。也参见美国专利号7,045,337和7,083,970，其通过引用并入本文。除了含有新的侧链的非天然氨基酸之外，可能适合用于本发明的非天然氨基酸也任选地包含修饰的骨架结构，包括但不限于由式II

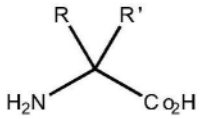
和III的结构所示出的：

[0232]

II



III



[0233] 其中Z通常包含OH、NH_2、SH、NH-R′或S-R′；X和Y可以相同或不同，通常包含S或O，并且任选地相同或不同的R和R'通常选自与上文为具有式I的非天然氨基酸所描述的R基团相同的组成成分名单以及氢。例如，本发明的非天然氨基酸任选地在氨基或羧基中包含取代，正如为式II和III所示。这种类型的非天然氨基酸包括但不限于α-羟基酸、α-硫代酸、α-氨基硫代羧酸酯，包括但不限于具有对应于常见20种天然氨基酸的侧链或非天然侧链的这些化合物。此外，在所述α-碳处的取代任选地包括但不限于L、D或α-α-双取代的氨基酸例如D-谷氨酸、D-丙氨酸、D-甲基-O-酪氨酸、氨基丁酸等。其他结构可替选物包括环状氨基酸例如脯氨酸类似物以及3、4、6、7、8和9元环脯氨酸类似物，β和γ氨基酸例如取代的β-丙氨酸和γ-氨基丁酸。

[0234] 许多非天然氨基酸是基于天然氨基酸例如酪氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸等，并且适用于本发明。酪氨酸类似物包括但不限于对位取代的酪氨酸、邻位取代的酪氨酸和间位取代的酪氨酸，其中所述取代的酪氨酸包含包括但不限于酮基(包括但不限于乙酰基)、苯甲酰基、氨基、肼、羟胺、硫醇基、羧基、异丙基、甲基、C_6-C_{20}直链或支链烃类、饱和或不饱和烃类、O-甲基、聚醚基、硝基、炔基等。此外，还考虑到了多取代的芳基环。可以适用于本发明的谷氨酰胺类似物包括但不限于α-羟基衍生物、γ-取代的衍生物、环状衍生物和酰胺取代的谷氨酰胺衍生物。可以适用于本发明的苯丙氨酸类似物的实例包括但不限于对位取代的苯丙氨酸、邻位取代的苯丙氨酸和间位取代的苯丙氨酸，其中所述取代基包含包括但不限于羟基、甲氧基、甲基、烯丙基、醛、叠氮基、碘代、溴代、酮基(包括但不限于乙酰基)、苯甲酰基、炔基等。可以适用于本发明的非天然氨基酸的具体实例包括但不限于对乙酰基-L-苯丙氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、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-GlcNAcβ-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-磷酰丝氨酸、膦酰丝氨酸、膦酰酪氨酸、对-碘-苯丙氨酸、对-溴苯丙氨酸、对-氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸和对-炔丙氧基-苯丙氨酸等。可以适用于本发明的各种不同的非天然氨基酸的结构的实例被提供在例如题为“非天然氨基酸的体内并入”(In vivo incorporation of unnatural amino acids)的WO 2002/085923中。对于其他的甲硫氨酸类似物，也参见Kiick等，通过Staudinger连接将叠氮化物并入到重组蛋白中用于化学选择性修饰(Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective

modification by the Staudinger ligation),PNAS 99:19-24(2002),其通过引用并入本文。通过引用并入本文的题为“含有非天然氨基酸和多肽的组合物、涉及它们的方法及其用途”(Compositions Containing,Methods Involving,and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides)的国际申请号PCT/US06/47822描述了芳香族胺组成部分(包括但不限于对氨基-苯丙氨酸)的还原烷基化和还原胺化。

[0235] 在本发明的另一个实施方式中,所述具有一个或多个非天然编码的氨基酸的IL-2多肽被共价修饰。与生物系统的多样化官能团正交的选择性化学反应被认为是化学生物学中的重要工具。作为合成化学大家庭中的相对后来者,这些生物正交反应激发了用于化合物文库合成、蛋白质工程、功能蛋白质组学和细胞表面化学重塑的新策略。叠氮化物作为用于生物偶联的独特化学处理发挥了重要作用。Staudinger连接已与膦化物一起使用,以标记代谢引入到细胞糖偶联物中的叠氮基糖。所述Staudinger连接可在活体动物中进行,对生理无害;然而,所述Staudinger反应并非没有不利因素。必需的膦化物易受空气氧化的影响,并且为增加水溶性和提高反应速率而进行的优化已被证明在合成上具有挑战性。

[0236] 叠氮基具有可选的生物正交反应性模式:由Huisgen描述的与炔烃的[3+2]环加成。在其经典形式中,这种反应由于合理的反应速率需要升高的温度(或压力)而在生物系统中具有受限的适用性。Sharpless和合作者通过开发被称为“点击化学”的铜(I)催化的形式克服了这个障碍,这种形式在生理温度下和丰富官能化的生物环境中容易进行。这一发现使得能够对来自于复杂组织裂解物的病毒粒子、核酸和蛋白质进行选择性修饰。不幸的是,强制性的铜催化剂对细菌和哺乳动物细胞两者有毒,因此阻碍了其中细胞必须保持存活的应用。已报道了由吸电子取代基活化的炔烃的无催化剂的Huisgen环加成在环境温度下发生。然而,这些化合物与生物亲核物质经历迈克尔反应。

[0237] 在一个实施方式中,提供了包含非天然氨基酸(例如对-(炔丙氧基)-苯丙氨酸)的IL-2的组合物。还提供了包含对-(炔丙氧基)-苯丙氨酸的各种不同组合物,包括但不限于蛋白质和/或细胞。一方面,包含所述对-(炔丙氧基)-苯丙氨酸非天然氨基酸的组合物还包含正交tRNA。所述非天然氨基酸可以被键合(包括但不限于共价地)到所述正交tRNA,包括但不限于通过氨基-酰基键共价键合到所述正交tRNA,共价键合到所述正交tRNA的末端核糖的3’OH或2’OH等。

[0238] 可以通过非天然氨基酸并入到蛋白质中的化学组成部分为所述蛋白质提供了各种不同的优点和操作。例如,酮官能团的独特反应性允许在体外或体内用大量含有肼或羟胺的试剂中的任一者进行蛋白质的选择性修饰。例如,重原子非天然氨基酸可能对X-射线结构数据的定相有用。使用非天然氨基酸的重原子的位点特异性引入也在为重原子选择位置中提供了选择性和灵活性。光反应性非天然氨基酸(包括但不限于具有二苯甲酮和芳基叠氮化物(包括但不限于苯基叠氮化物)侧链的氨基酸)允许例如蛋白质的高效体内和体外光交联。光反应性非天然氨基酸的实例包括但不限于对叠氮基-苯丙氨酸和对苯甲酰基-苯丙氨酸。具有光反应性非天然氨基酸的蛋白质因此可以通过所述光反应性基团的激发被随意交联,提供了时间控制。在一个实例中,非天然氨基酸的甲基可以被包括但不限于同位素标记的甲基取代,在包括但不限于使用核磁共振和振动光谱时作为局部结构和动力学的探针。炔基或叠氮基官能团允许例如通过[3+2]环加成反应用分子进行蛋白质的选择性修饰。

[0239] 在氨基端处并入到多肽中的非天然氨基酸可以由作为在20种天然氨基酸中使用

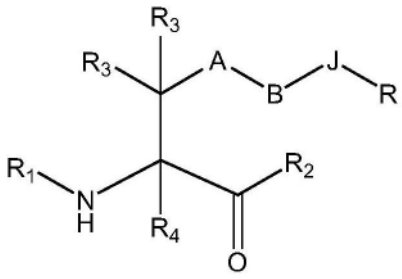
的取代基之外的任何取代基的R基团和不同于通常存在于α-氨基酸中的NH_2基团的第二反应性基团构成(参见式I)。类似的非天然氨基酸可以在羧基端处并入,其具有不同于通常存在于α-氨基酸中的COOH基团的第二反应性基团(参见式I)。

[0240] 可以选择或设计本发明的非天然氨基酸,以提供在20种天然氨基酸中不可获得的其他特性。例如,非天然氨基酸可以被任选地设计或选择,以修改例如它们被并入到其中的蛋白质的生物学性质。例如,通过将非天然氨基酸包含在蛋白质中,可以任选地修改下述性质:毒性,生物分布,溶解性,稳定性例如热、水解、氧化稳定性、对酶降解的抗性等,纯化和加工的容易性,结构性质,光谱性质,化学和/或光化学性质,催化活性,氧化还原电势,半衰期,与其他分子例如共价或非共价反应的能力等。

[0241] 在某些实施方式中,本发明提供了通过肟键连接到水溶性聚合物例如PEG的IL-2。许多类型的非天然编码的氨基酸适用于形成肟键。它们包括但不限于含有羰基、二羰基或羟胺基团的非天然编码的氨基酸。这些氨基酸被描述在美国专利公布号2006/0194256、2006/0217532和2006/0217289以及题为"含有非天然氨基酸和多肽的组合物、涉及它们的方法及其用途"(Compositions Containing,Methods Involving,and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides)的WO 2006/069246中,它们整体通过引用并入本文。非天然编码的氨基酸也被描述在美国专利号7,083,970和美国专利号7,045,337中,它们整体通过引用并入本文。

[0242] 本发明的某些实施方式利用在一个或多个位置处被对乙酰基苯丙氨酸氨基酸替换的IL-2多肽。对乙酰基-(+/-)-苯丙氨酸和间乙酰基-(+/-)-苯丙氨酸的合成被描述在通过引用并入的Zhang,Z.等,Biochemistry 42:6735-6746(2003)中。其他含羰基或二羰基的氨基酸可以由本领域普通技术人员类似地制备。此外,本文中包括的非天然氨基酸的非限制性的示例性合成呈现在美国专利号7,083,970的图4、24-34和36-39中,其整体通过引用并入本文。

[0243] 具有亲电反应性基团的氨基酸允许使用各种不同的反应,尤其是通过亲核加成反应来连接分子。这样的亲电反应性基团包括羰基(包括酮基和二羰基)、羰基样基团(其具有与羰基(包括酮基和二羰基)相似的反应性并在结构上与羰基类似)、掩蔽的羰基(其可以被容易地转变成羰基(包括酮基和二羰基))或保护的羰基(其在去保护后具有与羰基(包括酮基和二羰基)相似的反应性)。这些氨基酸包括具有式(IV)的结构的氨基酸:

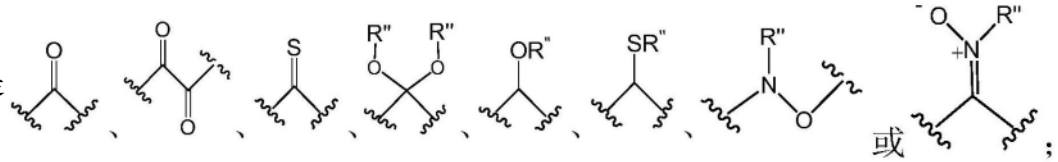
[0244] 

(IV),

[0245] 其中:

[0246] A是任选的,并且在存在时是低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚环烷基、取代的低级亚环烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、取代的亚杂烷基、低级亚杂环烷基、取代的低级亚杂环烷基、亚芳基、取代的亚芳基、亚杂芳基、取代的亚杂芳基、亚烷芳基、取代的亚烷芳基、亚芳烷基或取代的亚芳烷基;

[0247] B是任选的，并且在存在时是选自低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、低级亚杂烷基、取代的低级亚杂烷基、-O-、-O-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S-、-S-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S(O)$_k$-(其中k是1、2或3)、-S(O)$_k$(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')-、-NR'-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')C(O)O-、-S(O)$_k$N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)$_k$N(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')$_2$-N=N-和-C(R')$_2$-N(R')-N(R')-的接头，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基；

[0248] J是或；

[0249] R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；

[0250] 每个R"独立地是H、烷基、取代的烷基或保护基团，或者当存在超过一个R"基团时，两个R"任选地形成杂环烷基；

[0251] R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0252] R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

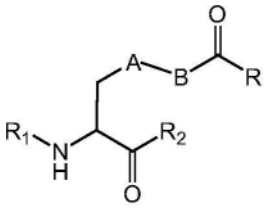
[0253] 每个R_3和R_4独立地是H、卤素、低级烷基或取代的低级烷基，或者R_3和R_4或两个R_3基团任选地形成环烷基或杂环烷基；

[0254] 或者-A-B-J-R基团一起形成包含至少一个羰基的双环或三环环烷基或杂环烷基，所述羰基包括二羰基、保护的羰基(包括保护的二羰基)或掩蔽的羰基(包括掩蔽的二羰基)；

[0255] 或者-J-R基团一起形成包含至少一个羰基的单环或双环环烷基或杂环烷基，所述羰基包括二羰基、保护的羰基(包括保护的二羰基)或掩蔽的羰基(包括掩蔽的二羰基)；

[0256] 前提是当A是亚苯基并且每个R_3是H时，B存在；并且当A是-$(CH_2)_4$-并且每个R_3是H时，B不是-NHC(O)(CH_2CH_2)-；并且当A和B不存在并且每个R_3是H时，R不是甲基。

[0257] 此外，包括具有式(V)的结构的氨基酸：

[0258] (V)，

[0259] 其中：

[0260] A是任选的，并且在存在时是低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚环烷基、取代的低级亚环烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、取代的亚杂烷基、低级亚杂环烷基、取代的低级亚杂环烷基、亚芳基、取代的亚芳基、亚杂芳基、取代的亚杂芳基、亚烷芳基、取代的亚烷芳基、亚芳烷基或取代的亚芳烷基；

[0261] B是任选的，并且在存在时是选自低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、低级亚杂烷基、取代的低级亚杂烷基、-O-、-O-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S-、-S-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S(O)$_k$-(其中k是1、2或3)、-S(O)$_k$(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')-、-NR'-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')C(O)O-、-S(O)$_k$N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)$_k$N(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')$_2$-N=N-和-C(R')$_2$-N(R')-N(R')-的接头，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基；

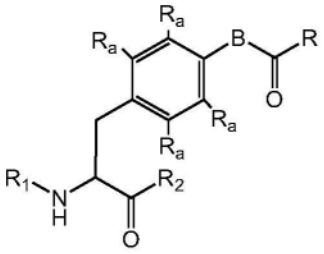
[0262] R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；

[0263] R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0264] R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

[0265] 前提是当A是亚苯基时，B存在；并且当A是-$(CH_2)_4$-时，B不是-NHC(O)(CH_2CH_2)-；并且当A和B不存在时，R不是甲基。

[0266] 此外，包括具有式(VI)的结构的氨基酸：

[0267] 

(VI)，

[0268] 其中：

[0269] B是选自低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、低级亚杂烷基、取代的低级亚杂烷基、-O-、-O-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S-、-S-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S(O)$_k$-(其中k是1、2或3)、-S(O)$_k$(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')-、-NR'-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')C(O)O-、-S(O)$_k$N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)$_k$N(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')$_2$-N=N-和-C(R')$_2$-N(R')-N(R')-的接头，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基；

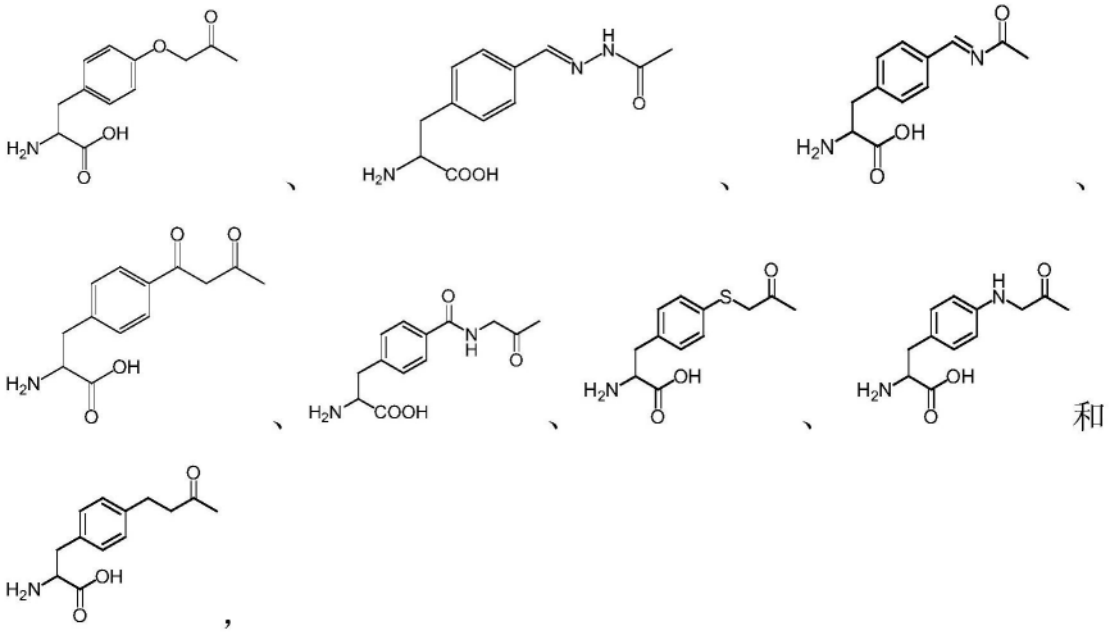
[0270] R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；

[0271] R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0272] R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

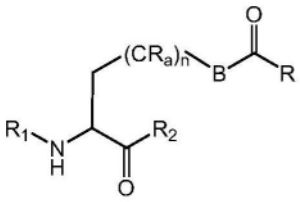
[0273] 每个R_a独立地选自H、卤素、烷基、取代的烷基、-N(R')$_2$、-C(O)$_k$R'(其中k是1、2或3)、-C(O)N(R')$_2$、-OR'和-S(O)$_k$R'，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基。

[0274] 此外，包括了下述氨基酸：

[0275] 

[0276] 其中这些化合物任选地氨基被保护、羧基被保护或者是其盐。此外，任何下述非天然氨基酸可以被并入到非天然氨基酸多肽中。

[0277] 此外，包括下述具有式(VII)的结构的氨基酸：

[0278] 

（VII）

[0279] 其中

[0280] B是任选的，并且在存在时是选自低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、低级亚杂烷基、取代的低级亚杂烷基、-O-、-O-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S-、-S-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S(O)$_k$-(其中k是1、2或3)、-S(O)$_k$(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')-、-NR'-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')C(O)O-、-S(O)$_k$N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)$_k$N(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')$_2$-N=N-和-C(R')$_2$-N(R')-N(R')-的接头，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基；

[0281] R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；

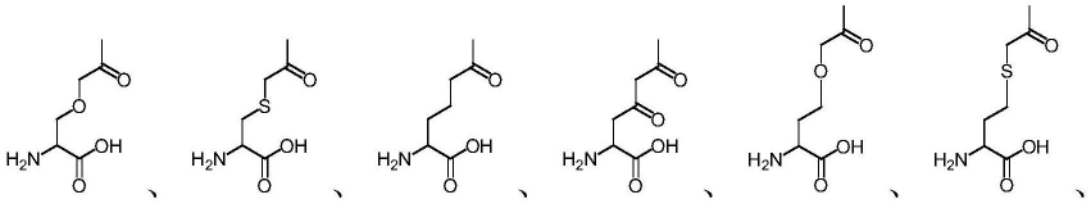
[0282] R$_1$是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0283] R$_2$是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

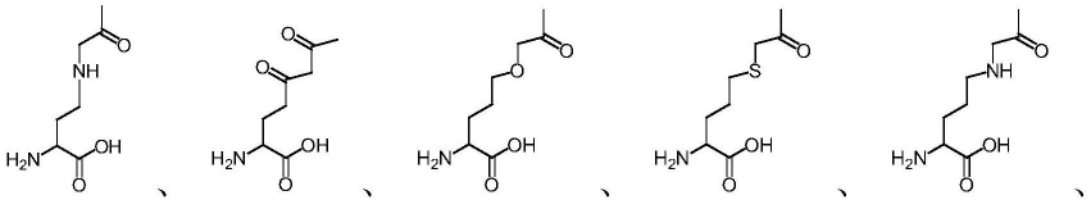
[0284] 每个R$_a$独立地选自H、卤素、烷基、取代的烷基、-N(R')$_2$、-C(O)$_k$R'(其中k是1、2或3)、-C(O)N(R')$_2$、-OR'和-S(O)$_k$R'，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基；并且n是0至8；

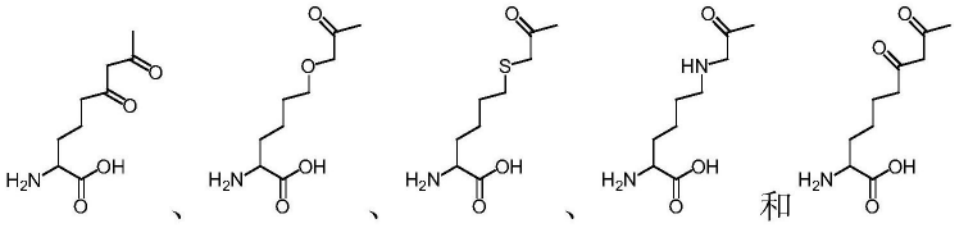
[0285] 前提是当A是-(CH$_2$)$_4$-时，B不是-NHC(O)(CH$_2$CH$_2$)-。

[0286] 此外，包括下述氨基酸：



[0287]



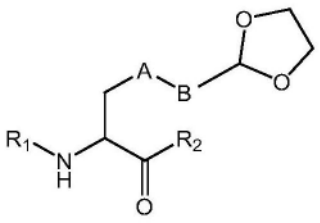


和，

[0288] 其中这些化合物任选地氨基被保护、任选地羧基被保护、任选地氨基被保护且羧基被保护，或者是其盐。此外，这些非天然氨基酸和任何下述的非天然氨基酸可以被并入到非天然氨基酸多肽中。

[0289] 此外，包括下述具有式(VIII)的结构的氨基酸：

[0290]



（VIII），

[0291] 其中A是任选的，并且在存在时是低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚环烷基、取代的低级亚环烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、取代的亚杂烷基、低级亚杂环烷基、取代的低级亚杂环烷基、亚芳基、取代的亚芳基、亚杂芳基、取代的亚杂芳基、亚烷芳基、取代的亚烷芳基、亚芳烷基或取代的亚芳烷基；

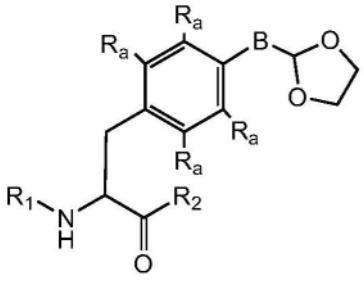
[0292] B是任选的，并且在存在时是选自低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、低级亚杂烷基、取代的低级亚杂烷基、-O-、-O-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S-、-S-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S(O)$_k$-(其中k是1、2或3)、-S(O)$_k$(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')-、-NR'-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')C(O)O-、-S(O)$_k$N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)$_k$N(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')$_2$-N=N-和-C(R')$_2$-N(R')-N(R')-的接头，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基；

[0293] R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并

且

[0294] R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸。

[0295] 此外，包括下述具有式(IX)的结构的氨基酸：

[0296] 
（IX），

[0297] B是任选的，并且在存在时是选自低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、低级亚杂烷基、取代的低级亚杂烷基、-O-、-O-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S-、-S-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S(O)$_k$-(其中k是1、2或3)、-S(O)$_k$(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')-、-NR'-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')C(O)O-、-S(O)$_k$N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)$_k$N(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')$_2$-N=N-和-C(R')$_2$-N(R')-N(R')-的接头，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基；

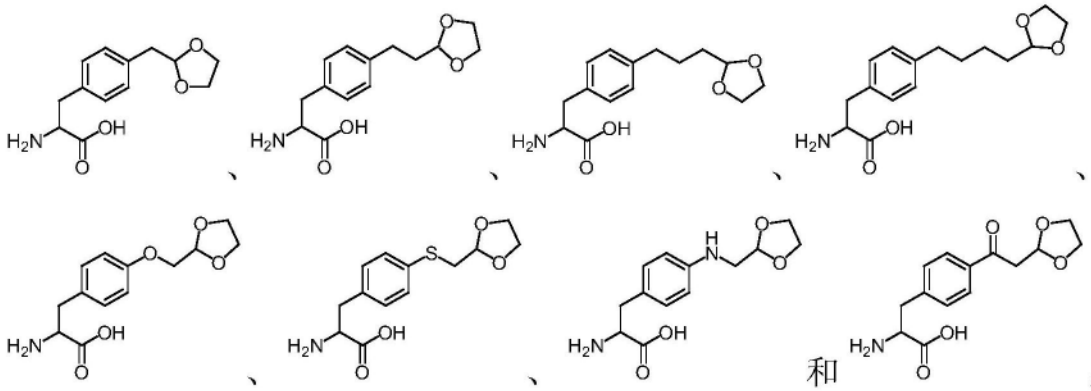
[0298] R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；

[0299] R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0300] R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

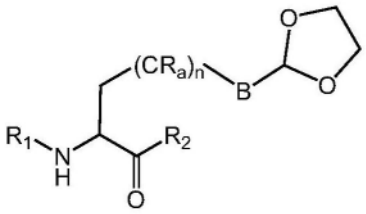
[0301] 其中每个R_a独立地选自H、卤素、烷基、取代的烷基、-N(R')$_2$、-C(O)$_k$R'(其中k是1、2或3)、-C(O)N(R')$_2$、-OR'和-S(O)$_k$R'，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基。

[0302] 此外，包括下述氨基酸：

[0303] 
和 ，

[0304] 其中这些化合物任选地氨基被保护、任选地羧基被保护、任选地氨基被保护且羧基被保护，或者是其盐。此外，这些非天然氨基酸和任何下述的非天然氨基酸可以被并入到非天然氨基酸多肽中。

[0305] 此外，包括下述具有式(X)的结构的氨基酸：

[0306] 
（X），

[0307] 其中B是任选的，并且在存在时是选自低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、低级亚杂烷基、取代的低级亚杂烷基、-O-、-O-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S-、-S-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S(O)$_k$-(其中k是1、2或3)、-S(O)$_k$(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')-、-NR'-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')C(O)O-、-S(O)$_k$N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)$_k$N(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')$_2$-N=N-和-C(R')$_2$-N(R')-N(R')-的接头，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基；

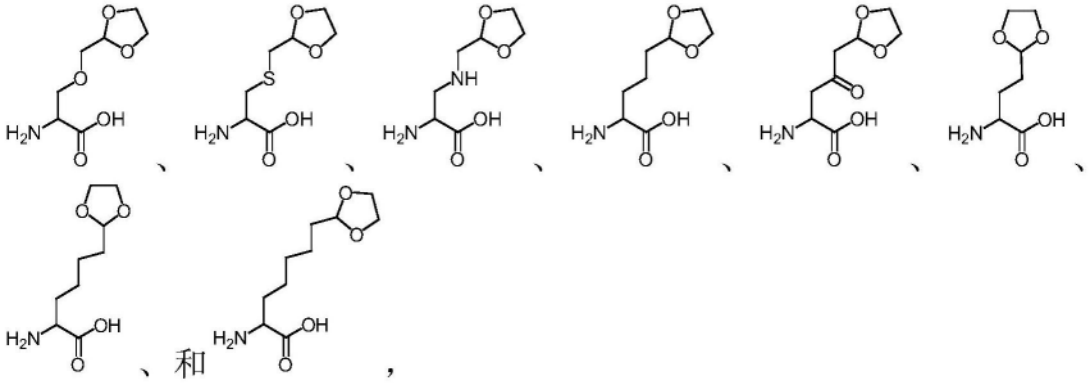
[0308] R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；

[0309] R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0310] R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

[0311] 每个R_a独立地选自H、卤素、烷基、取代的烷基、-N(R')$_2$、-C(O)$_k$R'(其中k是1、2或3)、-C(O)N(R')$_2$、-OR'和-S(O)$_k$R'，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基；并且n是0至8。

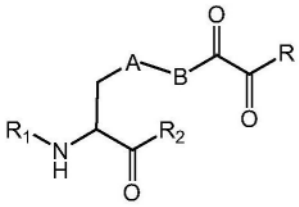
[0312] 此外，包括下述氨基酸：

[0313] 
、和，

[0314] 其中这些化合物任选地氨基被保护、任选地羧基被保护、任选地氨基被保护且羧基被保护，或者是其盐。此外，这些非天然氨基酸和任何下述的非天然氨基酸可以被并入到非天然氨基酸多肽中。

[0315] 除了单羰基结构之外，本文中描述的非天然氨基酸可以包括诸如二羰基、二羰基样、掩蔽的二羰基和保护的二羰基的基团。

[0316] 例如，包括下述具有式(XI)的结构的氨基酸：

[0317]  （XI），

[0318] 其中A是任选的，并且在存在时是低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚环烷基、取代的低级亚环烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、取代的亚杂烷基、低级亚杂环烷基、取代的低级亚杂环烷基、亚芳基、取代的亚芳基、亚杂芳基、取代的亚杂芳基、亚烷芳基、取代的亚烷芳基、亚芳烷基或取代的亚芳烷基；

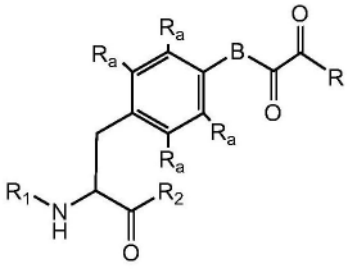
[0319] B是任选的，并且在存在时是选自低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、低级亚杂烷基、取代的低级亚杂烷基、-O-、-O-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S-、-S-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S(O)$_k$-(其中k是1、2或3)、-S(O)$_k$(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')-、-NR'-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')C(O)O-、-S(O)$_k$N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)$_k$N(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')$_2$-N=N-和-C(R')$_2$-N(R')-N(R')-的接头，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基；

[0320] R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；

[0321] R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0322] R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸。

[0323] 此外，包括下述具有式(XII)的结构的氨基酸：

[0324]  （XII），

[0325] B是任选的，并且在存在时是选自低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、低级亚杂烷基、取代的低级亚杂烷基、-O-、-O-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S-、-S-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S(O)$_k$-(其中k是1、2或3)、-S(O)$_k$(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')-、-NR'-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')C(O)O-、-S(O)$_k$N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)$_k$N(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')$_2$-N=N-和-C(R')$_2$-N(R')-N(R')-的接头，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基；

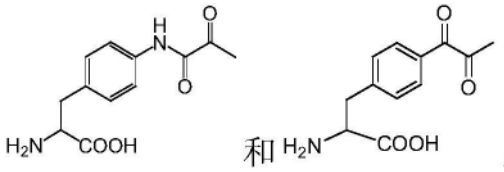
[0326] R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；

[0327] R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0328] R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

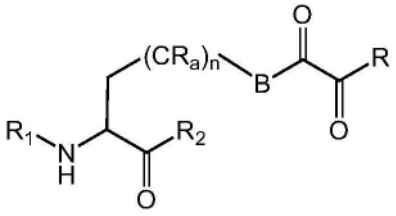
[0329] 其中每个R_a独立地选自H、卤素、烷基、取代的烷基、-N(R')$_2$、-C(O)$_k$R'（其中k是1、2或3）、-C(O)N(R')$_2$、-OR'和-S(O)$_k$R'，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基。

[0330] 此外，包括下述氨基酸：

[0331] 

[0332] 其中这些化合物任选地氨基被保护、任选地羧基被保护、任选地氨基被保护且羧基被保护，或者是其盐。此外，这些非天然氨基酸和任何下述的非天然氨基酸可以被并入到非天然氨基酸多肽中。

[0333] 此外，包括下述具有式(XIII)的结构的氨基酸：

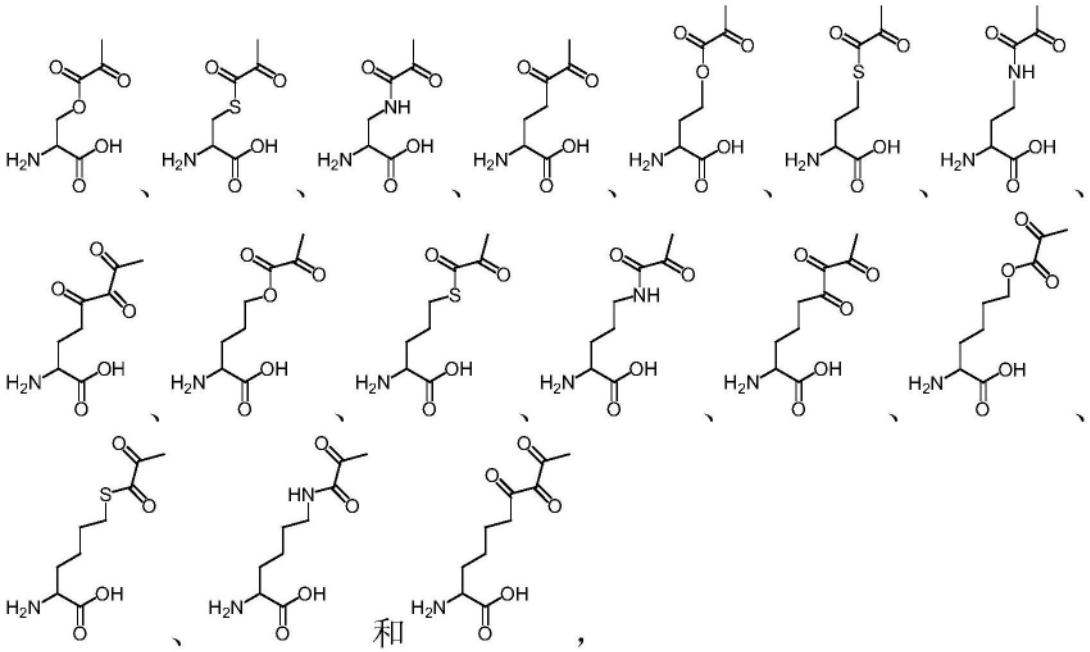
[0334] 

（XIII），

[0335] 其中B是任选的，并且在存在时是选自低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、低级亚杂烷基、取代的低级亚杂烷基、-O-、-O-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S-、-S-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-S(O)$_k$-(其中k是1、2或3)、-S(O)$_k$(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)-、-C(O)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(S)-、-C(S)-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')-、-NR'-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')CO-(亚烷基或取代的亚烷基)-、-N(R')C(O)O-、-S(O)$_k$N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)$_k$N(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、-C(R')$_2$-N=N-和-C(R')$_2$-N(R')-N(R')-的接头，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基；

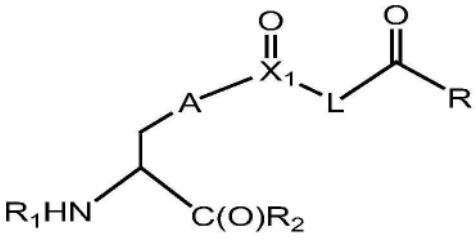
[0336] R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；每个R_a独立地选自H、卤素、烷基、取代的烷基、-N(R')$_2$、-C(O)$_k$R'（其中k是1、2或3）、-C(O)N(R')$_2$、-OR'和-S(O)$_k$R'，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基；并且n是0至8。

[0337] 此外，包括下述氨基酸：

[0338] 

[0339] 其中这些化合物任选地氨基被保护、任选地羧基被保护、任选地氨基被保护且羧基被保护，或者是其盐。此外，这些非天然氨基酸和任何下述的非天然氨基酸可以被并入到非天然氨基酸多肽中。

[0340] 此外，包括下述具有式(XIV)的结构的氨基酸：

[0341] 

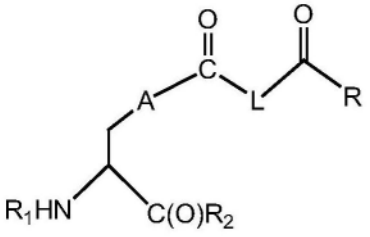
（XIV）；

[0342] 其中：

[0343] A是任选的，并且在存在时是低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚环烷基、取代的低级亚环烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、取代的亚杂烷基、低级亚杂环烷基、取代的低级亚杂环烷基、亚芳基、取代的亚芳基、亚杂芳基、取代的亚杂芳基、亚烷芳基、取代的亚烷芳基、亚芳烷基或取代的亚芳烷基；

[0344] R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；X_1是C、S或S(O)；并且L是亚烷基、取代的亚烷基、N(R')(亚烷基)或N(R')(取代的亚烷基)，其中R'是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基。

[0345] 此外，包括下述具有式(XIV-A)的结构的氨基酸：

[0346] 

（XIV-A）

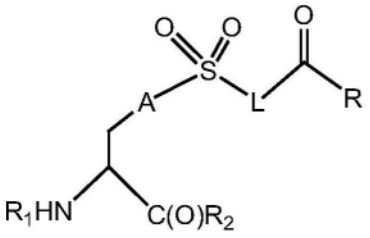
[0347] 其中：

[0348] A是任选的，并且在存在时是低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚环烷基、取代的低级亚环烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、取代的亚杂烷基、低级亚杂环烷基、取代的低级亚杂环烷基、亚芳基、取代的亚芳基、亚杂芳基、取代的亚杂芳基、亚烷芳基、取代的亚烷芳基、亚芳烷基或取代的亚芳烷基；

[0349] R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

[0350] L是亚烷基、取代的亚烷基、N(R')(亚烷基)或N(R')(取代的亚烷基)，其中R'是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基。

[0351] 此外，包括下述具有式(XIV-B)的结构的氨基酸：

[0352] 

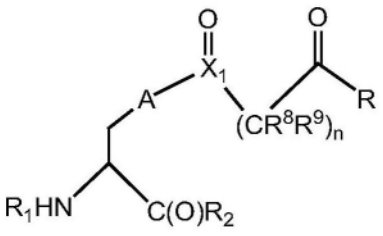
（XIV-B）

[0353] 其中：

[0354] A是任选的，并且在存在时是低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚环烷基、取代的低级亚环烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、取代的亚杂烷基、低级亚杂环烷基、取代的低级亚杂环烷基、亚芳基、取代的亚芳基、亚杂芳基、取代的亚杂芳基、亚烷芳基、取代的亚烷芳基、亚芳烷基或取代的亚芳烷基；R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；

[0355] R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；L是亚烷基、取代的亚烷基、N(R')(亚烷基)或N(R')(取代的亚烷基)，其中R'是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基。

[0356] 此外，包括下述具有式(XV)的结构的氨基酸：

[0357] 

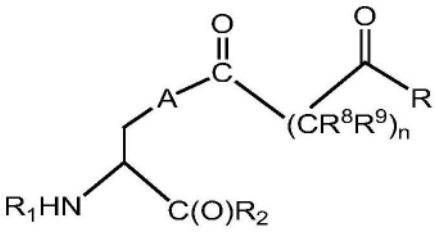
（XV）；

[0358] 其中：

[0359] A是任选的，并且在存在时是低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚环烷基、取代的低级亚环烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、取代的亚杂烷基、低级亚杂环烷基、取代的低级亚杂环烷基、亚芳基、取代的亚芳基、亚杂芳基、取代的亚杂芳基、亚烷芳基、取代的亚烷芳基、亚芳烷基或取代的亚芳烷基；R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；

[0360] R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；X_1是C、S或S(O)；并且n是0、1、2、3、4或5；并且每个CR^8R^9基团上的每个R^8和R^9独立地选自H、烷氧基、烷基胺、卤素、烷基、芳基，或者任何R^8和R^9可以一起形成=O或环烷基，或者任何相邻的R^8基团可以一起形成环烷基。

[0361] 此外，包括下述具有式(XV-A)的结构的氨基酸：

[0362] 

（XV-A）

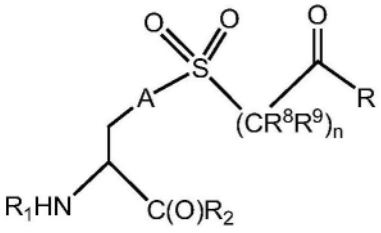
[0363] 其中：

[0364] A是任选的，并且在存在时是低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚环烷基、取代的低级亚环烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、取代的亚杂烷基、低级亚杂环烷基、取代的低级亚杂环烷基、亚芳基、取代的亚芳基、亚杂芳基、取代的亚杂芳基、亚烷芳基、取代的亚烷芳基、亚芳烷基或取代的亚芳烷基；

[0365] R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；

[0366] n是0、1、2、3、4或5；并且每个CR^8R^9基团上的每个R^8和R^9独立地选自H、烷氧基、烷基胺、卤素、烷基、芳基，或者任何R^8和R^9可以一起形成=O或环烷基，或者任何相邻的R^8基团可以一起形成环烷基。

[0367] 此外，包括下述具有式(XV-B)的结构的氨基酸：

[0368] 

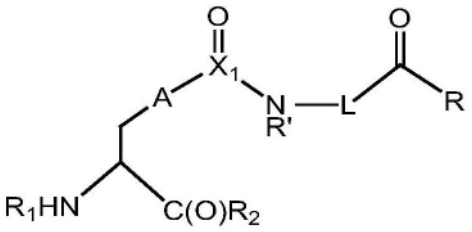
（XV-B）

[0369] 其中：

[0370] A是任选的，并且在存在时是低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚环烷基、取代的低级亚环烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、取代的亚杂烷基、低级亚杂环烷基、取代的低级亚杂环烷基、亚芳基、取代的亚芳基、亚杂芳基、取代的亚杂芳基、亚烷芳基、取代的亚烷芳基、亚芳烷基或取代的亚芳烷基；

[0371] R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；n是0、1、2、3、4或5；并且每个CR^8R^9基团上的每个R^8和R^9独立地选自H、烷氧基、烷基胺、卤素、烷基、芳基，或者任何R^8和R^9可以一起形成=O或环烷基，或者任何相邻的R^8基团可以一起形成环烷基。

[0372] 此外，包括下述具有式(XVI)的结构的氨基酸：

[0373] 

（XVI）；

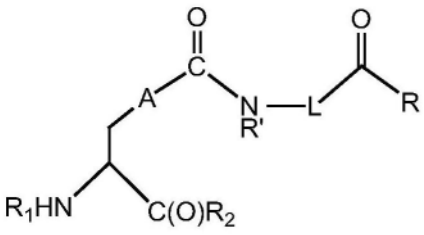
[0374] 其中：

[0375] A是任选的，并且在存在时是低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚环烷基、取代的低级亚环烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、取代的亚杂烷基、低级亚杂环烷基、取代的低级亚杂环烷基、亚芳基、取代的亚芳基、亚杂芳基、取代的亚杂芳基、亚烷芳基、取代的亚烷芳基、亚芳烷基或取代的亚芳烷基；R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；

[0376] R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且

[0377] R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；X_1是C、S或S(O)；并且L是亚烷基、取代的亚烷基、N(R')(亚烷基)或N(R')(取代的亚烷基)，其中R'是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基。

[0378] 此外，包括下述具有式(XVI-A)的结构的氨基酸：

[0379] 

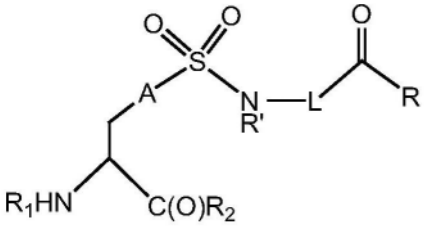
（XVI-A）

[0380] 其中：

[0381] A是任选的，并且在存在时是低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚环烷基、取代的低级亚环烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、取代的亚杂烷基、低级亚杂环烷基、取代的低级亚杂环烷基、亚芳基、取代的亚芳基、亚杂芳基、取代的亚杂芳基、亚烷芳基、取代的亚烷芳基、亚芳烷基或取代的亚芳烷基；R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；

[0382] R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；L是亚烷基、取代的亚烷基、N(R')(亚烷基)或N(R')(取代的亚烷基)，其中R'是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基。

[0383] 此外，包括下述具有式(XVI-B)的结构的氨基酸：

[0384] 

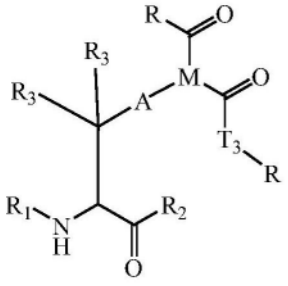
（XVI-B）

[0385] 其中：

[0386] A是任选的，并且在存在时是低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚环烷基、取代的低级亚环烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、取代的亚杂烷基、低级亚杂环烷基、取代的低级亚杂环烷基、亚芳基、取代的亚芳基、亚杂芳基、取代的亚杂芳基、亚烷芳基、取代的亚烷芳基、亚芳烷基或取代的亚芳烷基；R是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；

[0387] R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；L是亚烷基、取代的亚烷基、N(R')(亚烷基)或N(R')(取代的亚烷基)，其中R'是H、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基。

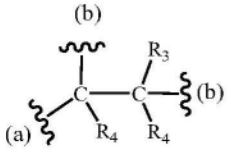
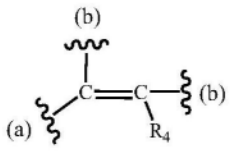
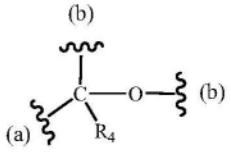
[0388] 此外，包括具有式(XVII)的结构的氨基酸：

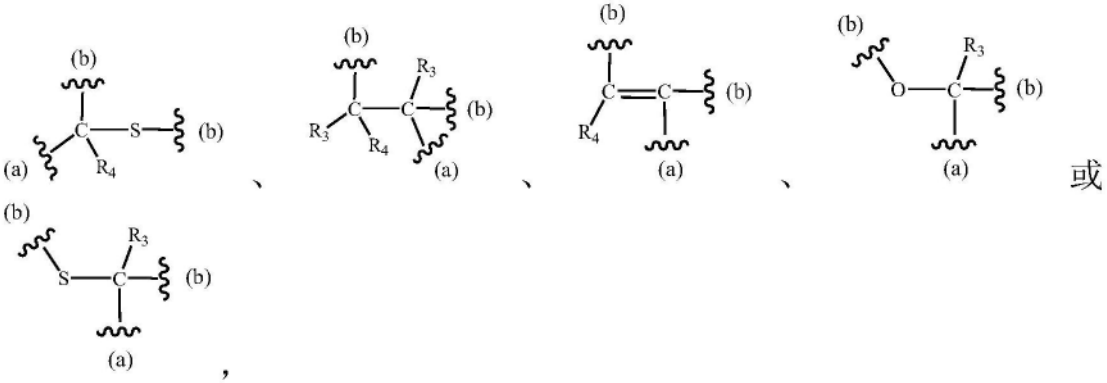
[0389] 

（XVII），

[0390] 其中：

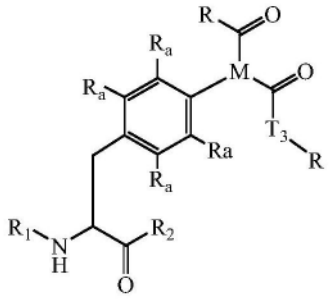
[0391] A是任选的，并且在存在时是低级亚烷基、取代的低级亚烷基、低级亚环烷基、取代的低级亚环烷基、低级亚烯基、取代的低级亚烯基、亚炔基、低级亚杂烷基、取代的亚杂烷基、低级亚杂环烷基、取代的低级亚杂环烷基、亚芳基、取代的亚芳基、亚杂芳基、取代的亚杂芳基、亚烷芳基、取代的亚烷芳基、亚芳烷基或取代的亚芳烷基；

[0392] M是-C(R_3)-、、、、

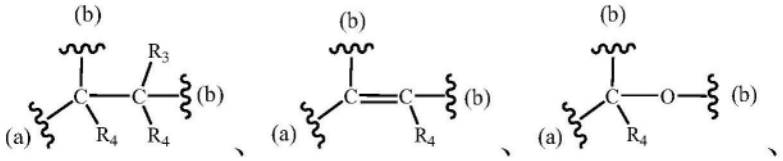


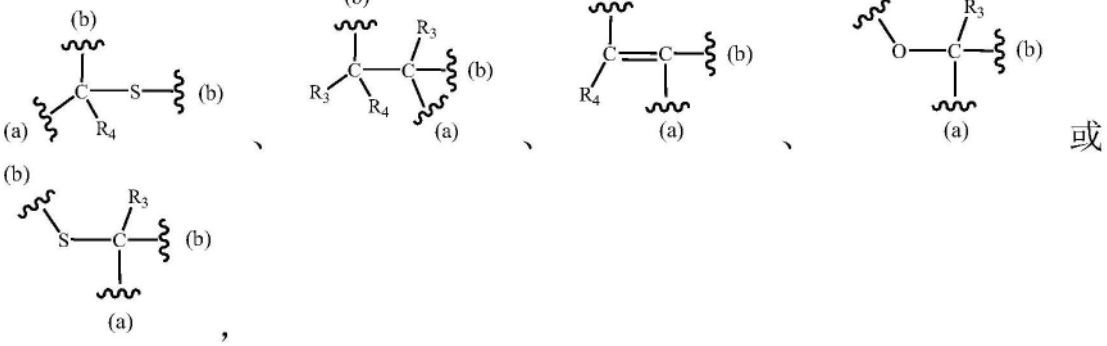
[0393] 其中(a)指示键合到A基团，并且(b)指示键合到相应的羰基，R_3和R_4独立地选自H、卤素、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基，或者R_3和R_4或两个R_3基团或两个R_4基团任选地形成环烷基或杂环烷基；R是H、卤素、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；T_3是键、C(R)(R)、O或S，并且R是H、卤素、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；R_1是任选的，并且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸。

[0394] 此外，包括具有式(XVIII)的结构的氨基酸：

[0395]  （XVIII），

[0396] 其中：

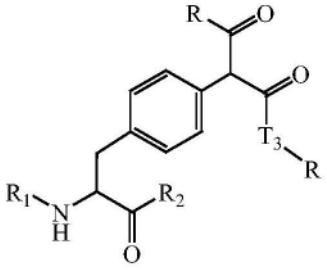
[0397] M是-C(R_3)-、



[0398] (a)(a)指示键合到A基团，并且(b)指示键合到相应的羰基，R_3和R_4独立地选自H、卤素、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基，或者R_3和R_4或两个R_3基团或两个R_4基团任选地形成环烷基或杂环烷基；R是H、卤素、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；T_3是键、C(R)(R)、O或S，并且R是H、卤素、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；R_1是任选的，并

且在存在时是H、氨基保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；并且R_2是任选的，并且在存在时是OH、酯保护基团、树脂、氨基酸、多肽或多核苷酸；每个R_a独立地选自H、卤素、烷基、取代的烷基、$-N(R')_2$、$-C(O)_kR'$（其中k是1、2或3）、$-C(O)N(R')_2$、-OR'和$-S(O)_kR'$，其中每个R'独立地是H、烷基或取代的烷基。

[0399] 此外，包括具有式(XIX)的结构的氨基酸：

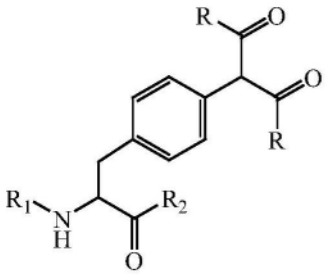
[0400] （XIX），

[0401] 其中：

[0402] R是H、卤素、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基；并且

[0403] T_3是O或S。

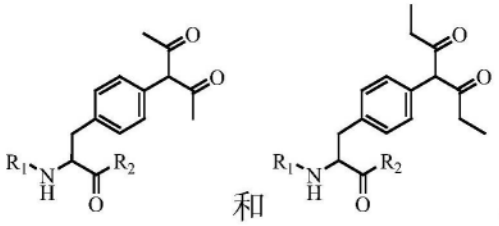
[0404] 此外，包括具有式(XX)的结构的氨基酸：

[0405] （XX），

[0406] 其中：

[0407] R是H、卤素、烷基、取代的烷基、环烷基或取代的环烷基。

[0408] 此外，包括下述具有式(XXI)的结构的氨基酸：

[0409] 和。

[0410] 在某些实施方式中，包含非天然氨基酸的多肽被化学修饰以产生反应性羰基或二羰基官能团。例如，可用于偶联反应的醛官能团可以从具有相邻的氨基和羟基的官能团产生。例如在所述生物活性分子是多肽的情况下，N-端丝氨酸或苏氨酸(其可能正常存在或者可能通过化学或酶消化而被暴露)可用于在温和的氧化切割条件下使用高碘酸盐产生醛官能团。参见例如Gaertner等，Bioconjug.Chem.3:262-268(1992)；Geoghegan,K.&Stroh,J.,Bioconjug.Chem.3:138-146(1992)；Gaertner等，J.Biol.Chem.269:7224-7230(1994)。然而，本领域中已知的方法局限于在肽或蛋白质的N-端处的氨基酸。

[0411] 在本发明中，带有相邻的羟基和氨基的非天然氨基酸可以作为“掩蔽的”醛官能团并入到多肽中。例如，5-羟基赖氨酸带有与ε胺基相邻的羟基。用于产生醛的反应条件通常包括在温和条件下添加摩尔过量的偏高碘酸钠，以避免在多肽内的其他位点处氧化。所述

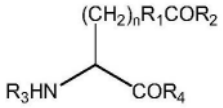
氧化反应的pH通常为约7.0。典型的反应包括向所述多肽的缓冲的溶液添加约1.5倍摩尔过量的偏高碘酸钠，然后在暗处温育约10分钟。参见例如美国专利号6,423,685。

[0412] 羰基或二羰基官能团可以与含有羟胺的试剂在温和条件下，在水性溶液中选择性地反应，以形成在生理条件下稳定的相应的肟键。参见例如Jencks，W.P.，J.Am.Chem.Soc.81,475-481(1959)；Shao,J.和Tam,J.P.,J.Am.Chem.Soc.117:3893-3899(1995)。此外，羰基或二羰基的独特的反应性允许在其他氨基酸侧链存在下进行选择性修饰。参见例如Cornish,V.W.等,J.Am.Chem.Soc.118:8150-8151(1996)；Geoghegan,K.F.&Stroh,J.G.,Bioconjug.Chem.3:138-146(1992)；Mahal,L.K.等,Science 276:1125-1128(1997)。

[0413] A.羰基反应性基团

[0414] 具有羰基反应性基团的氨基酸允许进行各种不同的反应以连接分子(包括但不限于PEG或其他水溶性分子)，尤其是通过亲核加成或醇醛缩合反应。

[0415] 示例性的含羰基氨基酸可以如下表示：

[0416] 

[0417] 其中n是0-10；R_1是烷基、芳基、取代的烷基或取代的芳基；R_2是H、烷基、芳基、取代的烷基和取代的芳基；并且R_3是H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团，并且R_4是H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。在某些实施方式中，n是1，R_1是苯基并且R_2是简单烷基(即甲基、乙基或丙基)，并且所述酮组成部分位于相对于烷基侧链的对位中。在某些实施方式中，n是1，R_1是苯基并且R_2是简单烷基(即甲基、乙基或丙基)，并且所述酮组成部分位于相对于烷基侧链的间位中。

[0418] 对乙酰基-(+/-)-苯丙氨酸和间乙酰基-(+/-)-苯丙氨酸的合成描述在Zhang,Z.等,Biochemistry 42:6735-6746(2003)中，其通过引用并入本文。其他含羰基氨基酸可以由本领域普通技术人员类似地制备。

[0419] 在某些实施方式中，包含非天然编码的氨基酸的多肽被化学修饰以产生反应性羰基官能团。例如，用于偶联反应的醛官能团可以从具有相邻的氨基和羟基的官能团产生。例如，在所述生物活性分子是多肽的情况下，N-端丝氨酸或苏氨酸(其可能正常存在或者可能通过化学或酶消化而暴露出来)可用于在温和的氧化切割条件下使用高碘酸盐来产生醛官能团。参见例如Gaertner等,Bioconjug.Chem.3:262-268(1992)；Geoghegan,K.&Stroh,J.,Bioconjug.Chem.3:138-146(1992)；Gaertner等,J.Biol.Chem.269:7224-7230(1994)。然而，本领域中已知的方法局限于在所述肽或蛋白质的N-端处的氨基酸。

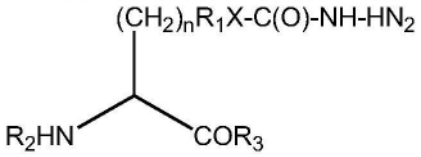
[0420] 在本发明中，带有相邻的羟基和氨基的非天然编码的氨基酸可以作为“掩蔽的”醛官能团并入到多肽中。例如，5-羟基赖氨酸带有与ε胺基相邻的羟基。用于产生醛的反应条件通常包括在温和条件下添加摩尔过量的偏高碘酸钠，以避免在多肽内的其他位点处氧化。所述氧化反应的pH通常为约7.0。典型的反应包括向所述多肽的缓冲的溶液添加约1.5倍摩尔过量的偏高碘酸钠，然后在暗处温育约10分钟。参见例如美国专利号6,423,685，其通过引用并入本文。

[0421] 羰基官能团可以与含有肼、酰肼、羟胺或氨基脲的试剂在温和条件下在水性溶液

中选择性地反应，以分别形成在生理条件下稳定的相应的腙、肟或半卡巴腙键。参见例如Jencks，W.P.，J.Am.Chem.Soc.81，475-481(1959)；Shao，J.和Tam，J.P.，J.Am.Chem.Soc.117:3893-3899(1995)。此外，羰基的独特的反应性允许在其他氨基酸侧链存在下进行选择性修饰。参见例如Cornish，V.W.等，J.Am.Chem.Soc.118:8150-8151(1996)；Geoghegan，K.F.&Stroh，J.G.，Bioconjug.Chem.3:138-146(1992)；Mahal，L.K.等，Science 276:1125-1128(1997)。B.肼、酰肼或氨基脲反应性基团

[0422] 含有亲核基团例如肼、酰肼或氨基脲的非天然编码的氨基酸允许与各种不同的亲电基团反应，以形成偶联物(包括但不限于与PEG或其他水溶性聚合物的偶联物)。

[0423] 示例性的含肼、酰肼或氨基脲的氨基酸可以如下表示：

[0424] 

[0425] 其中n是0-10；R_1是烷基、芳基、取代的烷基或取代的芳基或不存在；X是O、N或S或不存在；R_2是H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团，并且R_3是H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。

[0426] 在某些实施方式中，n是4，R_1不存在，并且X是N。在某些实施方式中，n是2，R_1不存在，并且X不存在。在某些实施方式中，n是1，R_1是苯基，X是O，并且氧原子位于所述芳基环上脂族基团的对位。

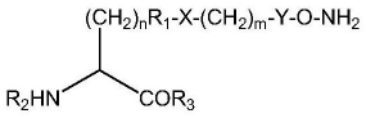
[0427] 含酰肼、肼和氨基脲的氨基酸可以从商业化来源获得。例如，L-谷氨酸-γ-酰肼可以从Sigma Chemical(St.Louis，MO)获得。其他不可商购的氨基酸可以由本领域普通技术人员制备。参见例如美国专利号6,281,211，其通过引用并入本文。

[0428] 含有带酰肼、肼或氨基脲官能团的非天然编码的氨基酸的多肽可以与含有醛或具有相似化学反应性的其他官能团的分子高效且选择性地反应。参见例如Shao，J.和Tam，J.，J.Am.Chem.Soc.117:3893-3899(1995)。酰肼、肼和氨基脲官能团的独特反应性使它们与20种常见氨基酸上存在的亲核基团(包括但不限于丝氨酸或苏氨酸的羟基或赖氨酸和N-端处的氨基)相比对醛、酮和其他亲电基团具有显著更高的反应性。

[0429] C.含氨氧基氨基酸

[0430] 含有氨氧基(也被称为羟胺)基团的非天然编码的氨基酸允许与各种不同的亲电基团反应，以形成偶联物(包括但不限于与PEG或其他水溶性聚合物的偶联物)。与肼、酰肼和氨基脲类似，氨氧基的高亲核性允许它与含有醛或具有相似化学反应性的其他官能团的各种不同分子高效且选择性地反应。参见例如Shao，J.和Tam，J.，J.Am.Chem.Soc.117:3893-3899(1995)；H.Hang和C.Bertozzi，Acc.Chem.Res.34:727-736(2001)。尽管与肼基反应的结果是相应的腙，但从氨氧基与含羰基基团例如酮的反应通常得到肟。

[0431] 示例性的含有氨氧基的氨基酸可以如下表示：

[0432] 

[0433] 其中n是0-10；R_1是烷基、芳基、取代的烷基或取代的芳基或不存在；X是O、N、S或不存在；m是0-10；Y＝C(O)或不存在；R_2是H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团，并且R_3是H、氨基

酸、多肽或羧基端修饰基团。在某些实施方式中，n是1，R_1是苯基，X是O，m是1，并且Y存在。在某些实施方式中，n是2，R_1和X不存在，m是0，并且Y不存在。

[0434] 含氨氧基的氨基酸可以从容易获得的氨基酸前体(高丝氨酸、丝氨酸和苏氨酸)制备。参见例如M.Carrasco和R.Brown，J.Org.Chem.68:8853-8858(2003)。某些含氨氧基的氨基酸例如L-2-氨基-4-(氨氧基)丁酸已从天然来源分离(Rosenthal,G.,Life Sci.60:1635-1641(1997))。其他含氨氧基的氨基酸可以由本领域普通技术人员制备。

[0435] D.叠氮基和炔反应性基团

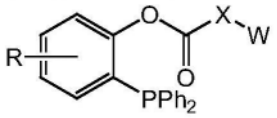
[0436] 叠氮基和炔官能团的独特反应性使得它们对多肽和其他生物分子的选择性修饰极为有用。有机叠氮化物、特别是脂族叠氮化物和炔烃通常对常用的反应性化学条件稳定。具体来说，叠氮基和炔官能团两者对天然存在的多肽中存在的20种常见氨基酸的侧链(即R基团)是惰性的。然而，当靠近时，叠氮基和炔基的“弹簧加载”本质被揭示出来，并且它们通过Huisgen[3+2]环加成反应选择性并高效地反应，以产生相应的三唑。参见例如Chin J.等，Science 301:964-7(2003)；Wang,Q.等，J.Am.Chem.Soc.125,3192-3193(2003)；Chin,J.W.等，J.Am.Chem.Soc.124:9026-9027(2002)。

[0437] 由于Huisgen环加成反应涉及选择性环加成反应(参见例如Padwa,A.,《综合有机合成》(Comprehensive Organic Synthesis)，Vol.4,Trost,B.M.主编(1991)，p.1069-1109；Huisgen,R.,《1,3-偶极环加成化学》(1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY)，Padwa,A.主编，(1984)，p.1-176)而不是亲核取代，因此带有含叠氮基和炔基侧链的非天然编码的氨基酸的并入允许得到的多肽在所述非天然编码的氨基酸的位置处被选择性修饰。涉及含叠氮基或炔基IL-2的环加成反应可以在室温和在水性条件下，通过在用于将Cu(II)还原成Cu(I)的还原剂存在下添加催化量的Cu(II)(包括但不限于以催化量的$CuSO_4$的形式)在原位进行。参见例如Wang,Q.等，J.Am.Chem.Soc.125,3192-3193(2003)；Tornoe,C.W.等，J.Org.Chem.67:3057-3064(2002)；Rostovtsev等，Angew.Chem.Int.Ed.41:2596-2599(2002)。示例性的还原剂包括但不限于抗坏血酸盐、金属铜、奎宁、氢醌、维生素K、谷胱甘肽、半胱氨酸、Fe^{2+}、Co^{2+}以及施加的电势。

[0438] 在某些情况下，在需要叠氮化物与炔烃之间的Huisgen[3+2]环加成反应时，所述IL-2包含含有炔基组成部分的非天然编码的氨基酸和待附连到所述氨基酸的含有叠氮基组成部分的水溶性聚合物。或者，也可以进行相反的反应(即使用所述氨基酸上的叠氮基组成部分和所述水溶性聚合物上存在的炔基组成部分)。

[0439] 叠氮基官能团也可以与含有芳基酯并用芳基膦组成部分适合地官能化的水溶性聚合物选择性反应，以产生酰胺键。所述芳基膦基团原位还原所述叠氮基，并且得到的胺然后与邻近的酯键高效反应，产生相应的酰胺。参见例如E.Saxon和C.Bertozzi，Science 287,2007-2010(2000)。所述含叠氮基氨基酸可以是烷基叠氮化物(包括但不限于2-氨基-6-叠氮基-1-己酸)或芳基叠氮化物(对叠氮基-苯丙氨酸)。

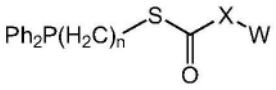
[0440] 含有芳基酯和膦组成部分的示例性水溶性聚合物可以如下表示：

[0441] 

[0442] 其中X可以是O、N、S或不存在，Ph是苯基，W是水溶性聚合物，并且R可以是H、烷基、

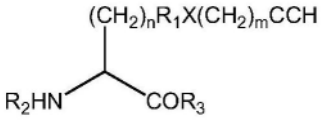
芳基、取代的烷基和取代的芳基。示例性的R基团包括但不限于-CH_2、-$C(CH_3)_3$、-OR'、-NR'R"、-SR'、-卤素、-C(O)R'、-CONR'R"、-$S(O)_2$R'、-$S(O)_2$NR'R"、-CN和-NO_2。R'、R"、R"'和R""各自独立地是指氢、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的芳基(包括但不限于被1-3个卤素取代的芳基)、取代或未取代的烷基、烷氧基或硫代烷氧基或芳烷基。当本发明的化合物包括超过一个R基团时,例如,每个所述R基团独立地选择,当存在超过一个R'、R"、R'"和R""基团时,每个这些基团也是如此。当R'和R"被附连到相同氮原子时,它们可以与所述氮原子组合以形成5、6或7元环。例如,-NR'R"意味着包括但不限于1-吡咯烷基和4-吗啉基。从上述取代基的讨论,本领域技术人员将会理解,术语"烷基"意味着包括包含结合到氢基团之外的基团的碳原子的基团例如卤代烷基(包括但不限于-CF_3和-CH_2CF_3)和酰基(包括但不限于-$C(O)CH_3$、-$C(O)CF_3$、-$C(O)CH_2OCH_3$等)。

[0443] 所述叠氮基官能团也可以与含有硫酯并用芳基膦组成部分适合地官能化的水溶性聚合物选择性反应,以产生酰胺键。所述芳基膦基团原位还原所述叠氮基,并且得到的胺然后与硫酯键高效反应,产生相应的酰胺。含有硫酯和膦组成部分的示例性水溶性聚合物可以如下表示:

[0444] 

[0445] 其中n是1-10;X可以是O、N、S或不存在,Ph是苯基,并且W是水溶性聚合物。

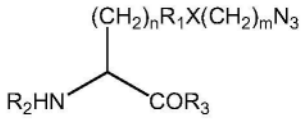
[0446] 示例性的含炔基氨基酸可以如下表示:

[0447] 

[0448] 其中n是0-10;R_1是烷基、芳基、取代的烷基或取代的芳基或不存在;X是O、N、S或不存在;m是0-10,R_2是H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团,并且R_3是H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。在某些实施方式中,n是1,R_1是苯基,X不存在,m是0并且乙炔组成部分位于相对于烷基侧链的对位中。在某些实施方式中,n是1,R_1是苯基,X是O,m是1并且炔丙氧基位于相对于烷基侧链的对位中(即O-炔丙基-酪氨酸)。在某些实施方式中,n是1,R_1和X不存在并且m是0(即炔丙基甘氨酸)。

[0449] 含炔基氨基酸是可商购的。例如,炔丙基甘氨酸可以从Peptech(Burlington,MA)商购。或者,含炔基氨基酸可以按照标准方法制备。例如,对炔丙氧基苯丙氨酸可以例如如Deiters,A.等,J.Am.Chem.Soc.125:11782-11783(2003)中所述来合成,并且4-炔基-L-苯丙氨酸可以如Kayser,B.等,Tetrahedron 53(7):2475-2484(1997)中所述来合成。其他含炔基氨基酸可以由本领域普通技术人员来制备。

[0450] 示例性的含叠氮基氨基酸可以如下表示:

[0451] 

[0452] 其中n是0-10;R_1是烷基、芳基、取代的烷基、取代的芳基或不存在;X是O、N、S或不存在;m是0-10;R_2是H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团,并且R_3是H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。在某些实施方式中,n是1,R_1是苯基,X不存在,m是0并且叠氮基组成部分位于烷基

侧链的对位。在某些实施方式中，n是0-4并且R_1和X不存在，并且m＝0。在某些实施方式中，n是1，R_1是苯基，X是O，m是2并且β-叠氮基乙氧基组成部分位于相对于烷基侧链的对位中。

[0453] 含叠氮基氨基酸可以从商业化来源获得。例如，4-叠氮基苯丙氨酸可以从Chem-Impex International，Inc.(Wood Dale，IL)获得。对于那些不可商购的含叠氮基氨基酸来说，所述叠氮基可以使用本领域普通技术人员已知的标准方法相对容易地制备，包括但不限于通过适合的离去基团(包括但不限于卤化物、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯)的置换或通过适当保护的内酯的打开。参见例如March的《高等有机化学》(Advanced Organic Chemistry)(第三版，1985，Wiley and Sons，New York)。

[0454] E.氨基硫醇反应性基团

[0455] β-取代的氨基硫醇官能团的独特反应性使它们通过噻唑烷的形成而对含有醛基的多肽和其他生物分子的选择性修饰极为有用。参见例如J.Shao和J.Tam，J.Am.Chem.Soc.，117(14)3893-3899(1995)。在某些实施方式中，β-取代的氨基硫醇氨基酸可以被并入到IL-2多肽中，然后与包含醛官能团的水溶性聚合物反应。在某些实施方式中，水溶性聚合物、药物偶联物或其他有效负荷可以通过噻唑烷的形成被偶联到包含β-取代的氨基硫醇氨基酸的IL-2。

[0456] F.另外的反应性基团

[0457] 可以被并入到本发明的IL-2多肽中的另外的反应性基团和非天然编码的氨基酸(包括但不限于对氨基-苯丙氨酸)被描述在全都整体通过引用并入本文的下述专利申请中：美国专利公布号2006/0194256，美国专利公布号2006/0217532，美国专利公布号2006/0217289，美国临时专利号60/755,338；美国临时专利号60/755,711；美国临时专利号60/755,018；国际专利申请号PCT/US06/49397；WO 2006/069246；美国临时专利号60/743,041；美国临时专利号60/743,040；国际专利申请号PCT/US06/47822；美国临时专利号60/882,819；美国临时专利号60/882,500；和美国临时专利号60/870,594。这些申请也讨论了可能存在于PEG或其他聚合物上用于偶联的反应性基团，包括但不限于羟胺(氨氧基)基团。

[0458] 具有非天然氨基酸的多肽

[0459] 非天然氨基酸的并入可以出于各种不同的目的而进行，包括但不限于调节蛋白质与其受体或其受体的一个或多个亚基的相互作用，定制蛋白质结构和/或功能的变化，改变尺寸、酸性、亲核性、氢键形成、疏水性、蛋白酶靶位点的可接近性，靶向组成部分(包括但不限于用于蛋白质阵列)，添加生物活性分子，附连聚合物，附连放射性核素，调节血清半衰期，调节组织穿透性(例如肿瘤)，调节主动运输，调节组织、细胞或器官特异性或分布，调节免疫原性，调节蛋白酶抗性等。包括非天然氨基酸的蛋白质可以具有增强的或甚至全新的催化或生物物理性质。例如，通过将非天然氨基酸包括在蛋白质内，任选地修改下述性质：受体结合，毒性，生物分布，结构性质，光谱性质，化学和/或光化学性质，催化能力，半衰期(包括但不限于血清半衰期)，与其他分子反应(包括但不限于共价或非共价反应)的能力等。包含包括至少一个非天然氨基酸的蛋白质的组合物可用于包括但不限于新的治疗剂、诊断剂、催化酶、工业酶、结合蛋白(包括但不限于抗体)，并且包括但不限于蛋白质结构和功能的研究。参见例如Dougherty，非天然氨基酸作为蛋白质结构和功能的探针(Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function)，Current Opinion in Chemical Biology，4:645-652(2000)。

[0460] 在本发明的一个方面，组合物包括至少一种蛋白质，其具有至少一个包括但不限于至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个或更多个非天然氨基酸。所述非天然氨基酸可以是相同或不同的，包括但不限于在所述蛋白质中可以存在1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个不同位点，其包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种或更多种不同的非天然氨基酸。另一方面，组合物包括蛋白质，在所述蛋白质中存在的至少一个但少于所有的特定氨基酸被非天然氨基酸替换。对于具有超过一个非天然氨基酸的给定蛋白质来说，所述非天然氨基酸可以是一致或不同的(包括但不限于所述蛋白质可以包括两种或更多种不同类型的非天然氨基酸，或者可以包括两个相同的非天然氨基酸)。对于具有超过两个非天然氨基酸的给定蛋白质来说，所述非天然氨基酸可以是相同、不同的或多个相同类型的非天然氨基酸与至少一种不同非天然氨基酸的组合。

[0461] 具有至少一个非天然氨基酸的感兴趣的蛋白质或多肽是本发明的特点。本发明还包括使用本发明的组合物和方法生产的具有至少一个非天然氨基酸的多肽或蛋白质。赋形剂(包括但不限于可药用赋形剂)也可以伴随所述蛋白质存在。

[0462] 通过在真核细胞中生产具有至少一个非天然氨基酸的感兴趣的蛋白质或多肽，蛋白质或多肽通常将包括真核翻译后修饰。在某些实施方式中，蛋白质包括至少一个非天然氨基酸和由真核细胞在体内制造的至少一个翻译后修饰，其中所述翻译后修饰不由原核细胞制造。例如，所述翻译后修饰包括但不限于乙酰化、酰化、脂质修饰、棕榈酰化、棕榈酸添加、磷酸化、糖脂连接修饰、糖基化等。

[0463] 非天然氨基酸的一个优点在于它提供了可用于添加其他分子的另外的化学组成部分。这些修饰可以在真核或非真核细胞体内或者在体外做出。因此，在某些实施方式中，所述翻译后修饰是通过所述非天然氨基酸来实现的。例如，所述翻译后修饰可以通过亲核-亲电反应来实现。当前用于蛋白质的选择性修饰的大多数反应涉及亲核与亲电反应配偶体之间的共价键形成，包括但不限于α-卤代酮与组氨酸或半胱氨酸侧链的反应。在这些情况下，选择性由所述蛋白质中亲核残基的数目和可接近性决定。在本发明的蛋白质中，可以在体外和体内使用其他更具选择性的反应，例如非天然酮基-氨基酸与酰肼或氨氧基化合物的反应。参见例如Cornish等，J.Am.Chem.Soc.，118:8150-8151(1996)；Mahal等，Science，276:1125-1128(1997)；Wang等，Science292:498-500(2001)；Chin等，J.Am.Chem.Soc.124:9026-9027(2002)；Chin等，Proc.Natl.Acad.Sci.，99:11020-11024(2002)；Wang等，Proc.Natl.Acad.Sci.，100:56-61(2003)；Zhang等，Biochemistry，42:6735-6746(2003)；和Chin等，Science，301:964-7(2003)，其全都通过引用并入本文。这允许用大量试剂(包括荧光团、交联剂、糖衍生物和细胞毒性分子)选择性标记事实上任何蛋白质。参见题为“糖蛋白合成”(Glycoprotein synthesis)的美国专利号6,927,042，其通过引用并入本文。翻译后修饰(包括但不限于通过叠氮基氨基酸实现的翻译后修饰)，可以通过Staudinger连接做出(包括但不限于使用三芳基膦试剂)。参见例如Kiick等，通过Staudinger连接将叠氮化物并入到重组蛋白中用于化学选择性修饰(Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation)，PNAS 99:19-24(2002)。

[0464] IV.包含非天然编码的氨基酸的IL-2的体内产生

[0465] 本发明的IL-2多肽可以在体内使用修饰的tRNA和tRNA合成酶产生，以添加或替换

在天然存在的系统中不被编码的氨基酸。

[0466] 使用在天然存在的系统中不被编码的氨基酸的tRNA和tRNA合成酶的产生方法被描述在例如美国专利号7,045,337和7,083,970中，其通过引用并入本文。这些方法涉及产生不依赖于翻译系统内源的合成酶和tRNA起作用的(并且因此有时被称为“正交的”)翻译机器。通常，所述翻译系统包含正交tRNA(O-tRNA)和正交氨酰基tRNA合成酶(O-RS)。通常，所述O-RS优先用所述翻译系统中的至少一个非天然存在的氨基酸将O-tRNA氨酰化，并且所述O-tRNA识别所述系统中不被其他tRNA识别的至少一个选择器密码子。因此，所述翻译系统对编码的选择器密码子做出响应，将所述非天然编码的氨基酸插入到在所述系统中产生的蛋白质中，由此将氨基酸“替换”到所述编码的多肽中的位置中。

[0467] 在本领域中已经描述了用于将特定的合成氨基酸插入到多肽中的广泛种类的正交tRNA和氨酰基tRNA合成酶，并且它们通常适合用于本发明。例如，酮基特异性O-tRNA/氨酰基-tRNA合成酶被描述在Wang,L.等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 100:56-61(2003)和Zhang,Z.等，Biochem.42(22):6735-6746(2003)中。示例性的O-RS或其部分由多核苷酸序列编码，并包括在美国专利号7,045,337和7,083,970中公开的氨基酸序列，每个所述专利通过引用并入本文。与所述O-RS一起使用的相应的O-tRNA分子也描述在美国专利号7,045,337和7,083,970中，其通过引用并入本文。O-tRNA/氨酰基-tRNA合成酶对的另外的实例描述在WO 2005/007870、WO 2005/007624和WO 2005/019415中。

[0468] 叠氮基特异性O-tRNA/氨酰基-tRNA合成酶系统的实例描述在Chin,J.W.等，J.Am.Chem.Soc.124:9026-9027(2002)中。用于对叠氮基-L-Phe的示例性O-RS序列包括但不限于在通过引用并入本文的美国专利号7,083,970中所公开的核苷酸序列SEQ ID NO:14-16和29-32以及氨基酸序列SEQ ID NO:46-48和61-64。适合用于本发明的示例性O-tRNA序列包括但不限于在通过引用并入本文的美国专利号7,083,970中所公开的核苷酸序列SEQ ID NO:1-3。特异性针对特定的非天然编码的氨基酸的O-tRNA/氨酰基-tRNA合成酶对的其他实例描述在通过引用并入本文的美国专利号7,045,337中。在酿酒酵母(S.cerevisiae)中并入含酮基和叠氮基的氨基酸两者的O-RS和O-tRNA被描述在Chin,J.W.等，Science 301:964-967(2003)中。

[0469] 已报道了几种其他的正交对。源自于酿酒酵母tRNA和合成酶的谷氨酰胺酰基(参见例如Liu,D.R.和Schultz,P.G.(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.96:4780-4785)、天冬氨酰基(参见例如Pastrnak,M.等，(2000)Helv.Chim.Acta 83:2277-2286)和酪氨酰基(参见例如Ohno,S.等，(1998)J.Biochem.(Tokyo,Jpn.)124:1065-1068;和Kowal,A.K.等，(2001)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.98:2268-2273)系统已被描述用于在大肠杆菌中潜在地并入非天然氨基酸。源自于大肠杆菌谷氨酰胺酰基(参见例如Kowal,A.K.等，(2001)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.98:2268-2273)和酪氨酰基(参见例如Edwards,H.和Schimmel,P.(1990)Mol.Cell.Biol.10:1633-1641)合成酶的系统已被描述用于酿酒酵母中。所述大肠杆菌酪氨酰基系统已被用于在哺乳动物细胞中在体内并入3-碘-L-酪氨酸。参见Sakamoto,K.等，(2002)Nucleic Acids Res.30:4692-4699。

[0470] O-tRNA/氨酰基-tRNA合成酶的使用涉及编码非天然编码的氨基酸的特异性密码子(选择器密码子)的选择。尽管可以使用任何密码子，但通常希望选择在表达所述O-tRNA/氨酰基-tRNA合成酶的细胞中稀有或从不使用的密码子。例如，示例性密码子包括无义密码

子例如终止密码子(琥珀、赭石和卵白石)、四或更多碱基密码子和其他稀有或不使用的天然三碱基密码子。

[0471] 特定的选择器密码子可以使用本领域中已知的诱变方法(包括但不限于位点特异性诱变、盒式诱变、限制性选择诱变等)引入到IL-2编码序列中的适合位置中。

[0472] V.IL-2中非天然存在的氨基酸的位置

[0473] 本发明设想了将一个或多个非天然存在的氨基酸并入到IL-2中。一个或多个非天然存在的氨基酸可以被并入在不破坏所述多肽的活性的特定位置处。这可以通过制造“保守”替换来实现,包括但不限于用疏水氨基酸替换疏水氨基酸、用大体积氨基酸替换大体积氨基酸、用亲水氨基酸替换亲水氨基酸和/或将所述非天然存在的氨基酸插入到对活性来说不需要的位置中。

[0474] 可以使用各种不同的生物化学和结构方法为所述IL-2内非天然编码的氨基酸的替换选择所需位点。对于本领域普通技术人员来说显而易见的是,所述多肽链的任何位置适合于选择以并入非天然编码的氨基酸,并且选择可以基于合理设计或通过随机选择,用于任何或没有特定所需目的。所需位点的选择可用于产生具有任何所需性质或活性的IL-2分子,包括但不限于调节受体结合或与其受体的一个或多个亚基、激动剂、超级激动剂、反向激动剂、拮抗剂、受体结合调节剂、受体活性调节剂的结合,二聚体或多聚体形成,相对于本源分子不改变活性或性质,或操纵所述多肽的任何物理或化学性质例如溶解性、聚集或稳定性。例如,所述多肽中IL-2的生物活性所需的位置,可以使用本领域中已知的点突变分析、丙氨酸扫描、饱和诱变和生物活性筛选或同源扫描方法来鉴定。其他方法可用于鉴定用于IL-2的修饰的残基,包括但不限于序列剖析(Bowie和Eisenberg,Science 253(5016):164-70,(1991))、旋转异构体文库选择(Dahiyat和Mayo,Protein Sci5(5):895-903(1996);Dahiyat和Mayo,Science 278(5335):82-7(1997);Desjarlais和Handel,Protein Science 4:2006-2018(1995);Harbury等,PNAS USA 92(18):8408-8412(1995);Kono等,Proteins:Structure,Function and Genetics 19:244-255(1994);Hellinga和Richards,PNAS USA 91:5803-5807(1994))和残基配对潜力(Jones,Protein Science 3:567-574(1994))以及使用Protein Design Automation®技术的合理设计(参见美国专利号6,188,965、6,269,312、6,403,312、WO98/47089,其通过引用并入本文)。通过丙氨酸或同源扫描诱变被鉴定为对生物活性来说关键的残基之外的残基可能是使用非天然编码的氨基酸的替换的良好候选者,这取决于为所述多肽寻求的所需活性。或者,被鉴定为对生物活性来说关键的位点也可能是使用非天然编码的氨基酸的替换的良好候选者,这同样取决于为所述多肽寻求的所需活性。另一种可选方案是在所述多肽链上的每个位置中用非天然编码的氨基酸简单地制造系列替换并观察对所述多肽的活性的影响。对于本领域普通技术人员来说显而易见的是,为任何多肽中使用非天然氨基酸的替换选择位置的任何手段、技术或方法均适合用于本发明。

[0475] 也可以检查含有缺失的IL-2多肽突变体的结构和活性,以确定所述蛋白质的可能对使用非天然编码的氨基酸的替换耐受的区域。以类似的方式,蛋白酶消化和单克隆抗体可用于鉴定IL-2的负责结合IL-2受体的区域。一旦可能对使用非天然编码的氨基酸的替换不耐受的残基已被消除后,可以检查在每个剩余位置处所提出的替换的影响。因此,本领域普通技术人员可以容易地鉴定可以用非天然编码的氨基酸替换的氨基酸位置。

[0476] 本领域普通技术人员认识到这种IL-2的分析能够确定与埋藏在所述蛋白质的三级结构内的氨基酸残基相比，哪些氨基酸残基被表面暴露。因此，本发明的实施方式是用非天然编码的氨基酸替换作为表面暴露的残基的氨基酸。

[0477] 在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到LI-2中的一个或多个下述位置中：第1位之前(即在N-端处)，第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133位，或添加到所述蛋白质的羧基端，及其任何组合(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸)。

[0478] 在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到IL-2或其变体中的一个或多个下述位置中：第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72和107位之前，及其任何组合(SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸)。

[0479] 在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入到对应于IL-2或其变体中如下所述的二级结构或特定氨基酸的一个或多个下述区域中的任何位置处：在疏水相互作用的位点处；在与IL-2受体亚基(包括IL2Rα)相互作用的位点处或附近；在第3或35至45氨基酸位置内；在前107个N-端氨基酸内；在第61-72氨基酸位置内；每个所述位置为SEQ ID NO:2的位置或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸位置。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入在IL-2或其变体的一个或多个下述位置处：SEQ ID NO:2的第1位之前(即在N-端处)，第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43位，及其任何组合；或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸。在某些实施方式中，一个或多个非天然编码的氨基酸被并入在IL-2或其变体的一个或多个下述位置处：SEQ ID NO:2的第44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133位，或添加到所述蛋白质的羧基端，及其任何组合；或SEQ ID NO:3、5或7中的相应氨基酸。

[0480] 在某些实施方式中，所述IL-2多肽是激动剂，并且一个或多个这些区域中的非天然存在的氨基酸被连接到水溶性聚合物，包括但不限于：第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72和107位。在某些实施方式中，所述IL-2多肽是激动剂，并且一个或多个这些区域中的非天然存在的氨基酸被连接到水溶性聚合物，包括但不限于：在第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72和107位附近。

[0481] 广泛种类的非天然编码的氨基酸可以被替换或并入到IL-2中的给定位置中。通常，用于并入的具体的非天然编码的氨基酸在下述基础上选择：IL-2多肽或其他IL-2家族成员与其受体的三维晶体结构的检查，保守替换的偏好性(即基于芳基的非天然编码的氨基酸例如对乙酰基苯丙氨酸或O-炔丙基酪氨酸替换Phe、Tyr或Trp)，以及人们希望引入到

所述IL-2中的特定偶联化学(例如如果人们希望与带有炔基组成部分的水溶性聚合物实现Huisgen[3+2]环加成或者与带有芳基酯并因而并入膦组成部分的水溶性聚合物实现酰胺键形成,则引入4-叠氮基苯丙氨酸)。

[0482] 在一个实施方式中,所述方法还包括:在所述蛋白质中并入所述非天然氨基酸,其中所述非天然氨基酸包含第一反应性基团;以及将所述蛋白质与包含第二反应性基团的分子相接触(所述分子包括但不限于标记物、染料、聚合物、水溶性聚合物、聚乙二醇的衍生物、光交联剂、放射性核素、细胞毒性化合物、药物、亲和标记物、光亲和标记物、反应性化合物、树脂、第二蛋白质或多肽或多肽类似物、抗体或抗体片段、金属螯合剂、辅因子、脂肪酸、糖类、多核苷酸、DNA、RNA、反义多核苷酸、糖、水溶性树枝状聚合物、环糊精、抑制性核糖核酸、生物材料、纳米粒子、自旋标记物、荧光团、含金属组成部分、放射活性组成部分、新官能团、与其他分子共价或非共价相互作用的基团、光笼化组成部分、光化辐射可激发的组成部分、可光异构化的组成部分、生物素、生物素的衍生物、生物素类似物、掺有重原子的组成部分、化学可切割基团、光可切割基团、延长的侧链、碳连接的糖、氧化还原活性剂、氨基硫代酸、毒性组成部分、同位素标记的组成部分、生物物理探针、磷光基团、化学发光基团、电子致密基团、磁性基团、嵌入基团、发色团、能量转移试剂、生物活性药剂、可检测标记物、小分子、量子点、纳米发射体、放射性核苷酸、放射性发射体、中子捕获剂或上述分子的任何组合或任何其他所需化合物或物质)。所述第一反应性基团通过[3+2]环加成与所述第二反应性基团反应,以将所述分子附连到所述非天然氨基酸。在一个实施方式中,所述第一反应性基团是炔基或叠氮基组成部分,并且所述第二反应性基团是叠氮基或炔基组成部分。例如,所述第一反应性基团是炔基组成部分(包括但不限于非天然氨基酸对炔丙氧基苯丙氨酸中的),并且所述第二反应性基团是叠氮基组成部分。在另一个实例中,所述第一反应性基团是叠氮基组成部分(包括但不限于非天然氨基酸对叠氮基-L-苯丙氨酸中的),并且所述第二反应性基团是炔基组成部分。

[0483] 在某些情况下,将所述非天然编码的氨基酸替换与所述IL-2内的其他添加、替换或缺失相组合,以影响所述IL-2多肽的其他生物性状。在某些情况下,所述其他添加、替换或缺失可以提高所述IL-2的稳定性(包括但不限于蛋白水解降解的抗性)或提高所述IL-2对其受体的亲和性。在某些情况下,所述其他添加、替换或缺失可以提高所述IL-2的制药稳定性。在某些情况下,所述其他添加、替换或缺失可以增强所述IL-2的肿瘤抑制和/或肿瘤减小活性。在某些情况下,所述其他添加、替换或缺失可以提高所述IL-2或变体的溶解性(包括但不限于当在大肠杆菌或其他宿主细胞中表达时)。在某些实施方式中,添加、替换或缺失可以提高所述IL-2在大肠杆菌或其他重组宿主细胞中表达后的溶解性。在某些实施方式中,除了用于并入导致所述多肽在大肠杆菌或其他重组宿主细胞中表达后的溶解性提高的非天然氨基酸的另一个位点之外,还选择用于天然编码的或非天然氨基酸的替换的位点。在某些实施方式中,所述IL-2多肽包含另一个添加、替换或缺失,其调节对IL-2受体、结合蛋白或相关配体的亲和性,调节结合到IL-2受体后的信号转导,调节循环半衰期,调节释放或生物利用度,促进纯化,或改进或改变特定给药途径。在某些实施方式中,所述IL-2多肽包含提高所述IL-2变体对其受体的亲和性的添加、替换或缺失。在某些实施方式中,所述IL-2包含提高所述IL-2变体对IL-2-R1和/或IL-2-R2的亲和性的添加、替换或缺失。同样地,IL-2多肽可以包含化学或酶切割序列、蛋白酶切割序列、反应性基团、抗体结合结构域

(包括但不限于FLAG或聚His)或其他基于亲和性的序列(包括但不限于FLAG、聚His、GST等)或连接的分子(包括但不限于生物素),其改善检测(包括但不限于GFP)、纯化、通过组织或细胞膜的转运、前体药物释放或活化、IL-2尺寸减小或所述多肽的其他性状。

[0484] 在某些实施方式中,所述非天然编码的氨基酸的替换产生IL-2拮抗剂。在某些实施方式中,非天然编码的氨基酸被替换或添加在与受体结合相关的区域中。在某些实施方式中,IL-2拮抗剂包含导致IL-2起到拮抗剂作用的至少一个替换。在某些实施方式中,所述IL-2拮抗剂包含存在于所述IL-2分子的受体结合区中的连接到水溶性聚合物的非天然编码的氨基酸。

[0485] 在某些情况下,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸被一个或多个非天然编码的氨基酸替换。在某些情况下,所述IL-2还包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个天然存在的氨基酸被一个或多个非天然编码的氨基酸的替换。例如,在某些实施方式中,IL-2中的一个或多个残基被一个或多个非天然编码的氨基酸替换。在某些情况下,所述一个或多个非天然编码的残基被连接到一个或多个较低分子量的直链或支链PEG,由此相对于附连到单个较高分子量的PEG的物质提高结合亲和性和可比的血清半衰期。

[0486] VI.在非真核生物和真核生物中的表达

[0487] 为了获得克隆的IL-2多核苷酸的高水平表达,人们通常将编码本发明的IL-2多肽的多核苷酸亚克隆在表达载体中,所述表达载体含有指导转录的强启动子、转录/翻译终止子,以及如果用于编码蛋白质的核酸的话用于翻译起始的核糖体结合位点。适合的细菌启动子对于本领域普通技术人员来说是已知的,并描述在例如Sambrook等和Ausubel等中。

[0488] 在包括但不限于大肠杆菌(E.coli)、芽孢杆菌(Bacillus sp.)、荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、恶臭假单胞菌(Pseudomonas putida)和沙门氏菌(Salmonella)中,用于表达本发明的IL-2的细菌表达系统是可用的(Palva等,Gene 22:229-235(1983);Mosbach等,Nature 302:543-545(1983))。用于这些表达系统的试剂盒是可商购的。用于哺乳动物细胞、酵母和昆虫细胞的真核表达系统对于本领域普通技术人员来说是已知的,并且也是可商购的。在使用正交tRNA和氨酰基tRNA合成酶(上述)来表达本发明的IL-2多肽的情况下,用于表达的宿主细胞在它们使用所述正交组分的能力的基础上选择。示例性的宿主细胞包括革兰氏阳性细菌(包括但不限于短芽孢杆菌(B.brevis)、枯草芽孢杆菌(B.subtilis)或链霉菌(Streptomyces))和革兰氏阴性细菌(大肠杆菌(E.coli)、荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、恶臭假单胞菌(Pseudomonas putida))以及酵母和其他真核细胞。包含O-tRNA/O-RS对的细胞可以如本文中所述使用。

[0489] 本发明的真核宿主细胞或非真核宿主细胞提供了以有用的大量合成包含非天然氨基酸的蛋白质的能力。在一种情况下,所述组合物任选地包含包括但不限于至少10微克、至少50微克、至少75微克、至少100微克、至少200微克、至少250微克、至少500微克、至少1毫克、至少10毫克、至少100毫克、至少1克或更多的包含非天然氨基酸的蛋白质,或者可以使用体内蛋白质生产方法获得的量(关于重组蛋白生产和纯化的详情提供在本文中)。在另一种情况下,所述蛋白质任选地以包括但不限于至少10微克蛋白质/升、至少50微克蛋白质/升、至少75微克蛋白质/升、至少100微克蛋白质/升、至少200微克蛋白质/升、至少250微克蛋白质/升、至少500微克蛋白质/升、至少1毫克蛋白质/升或至少10毫克蛋白质/升或更高

的浓度存在于所述组合物中，包括但不限于在细胞裂解物、缓冲液、药物缓冲液或其他液体悬液中(包括但不限于在包括但不限于约1nl至约100L或更大之间的任何体积中)。包括至少一个非天然氨基酸的蛋白质在真核细胞中的大量(包括但不限于比使用其他方法(包括但不限于体外翻译)所通常可能的量更大)生产，是本发明的特点。

[0490] 本发明的真核宿主细胞或非真核宿主细胞提供了以有用的大量生物合成包含非天然氨基酸的蛋白质的能力。例如，包含非天然氨基酸的蛋白质可以以包括但不限于至少10μg/升、至少50μg/升、至少75μg/升、至少100μg/升、至少200μg/升、至少250μg/升或至少500μg/升、至少1mg/升、至少2mg/升、至少3mg/升、至少4mg/升、至少5mg/升、至少6mg/升、至少7mg/升、至少8mg/升、至少9mg/升、至少10mg/升、至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900mg/升、1g/升、5g/升、10g/升或更高的蛋白质浓度在细胞提取物、细胞裂解物、培养基、缓冲液等中生产。

[0491] 适合于IL-2的表达的大量载体是可商购的。用于真核宿主的有用的表达载体包括但不限于包含来自于SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。这样的载体包括pCDNA3.1(+)\Hyg(Invitrogen,Carlsbad,Calif.,USA)和pCI-neo(Stratagene,La Jolla,Calif.,USA)。可以使用细菌质粒例如来自于大肠杆菌的质粒，包括pBR322、pET3a和pET12a，广宿主范围质粒例如RP4，噬菌体DNA例如λ噬菌体例如NM989和其他DNA噬菌体例如M13和丝状单链DNA噬菌体的大量衍生物。2μ质粒及其衍生物、POT1载体(通过引用并入本文的美国专利号4,931,373)、在(Okkels,Ann.New York Aced.Sci.782,202 207,1996)中描述的pJSO37载体和pPICZ A、B或C(Invitrogen)，可以与酵母宿主细胞一起使用。对于昆虫细胞来说，载体包括但不限于pVL941、pBG311(Cate等，“用于苗勒管抑制物质的牛和人类基因的分离和所述人类基因在动物细胞中的表达”(Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance And Expression of the Human Gene In Animal Cells)，Cell,45,pp.685 98(1986))、pBluebac 4.5和pMelbac(Invitrogen,Carlsbad,CA)。

[0492] 编码IL-2或其变体的核苷酸序列可以也包括或者可以不包括编码信号肽的序列。当所述多肽要从它在其中表达的细胞分泌时，所述信号肽存在。这些信号肽可以是任何序列。所述信号肽可以是原核的或真核的。Coloma,M(1992)J.Imm.Methods 152:89 104描述了在哺乳动物细胞中使用的信号肽(鼠类Igκ轻链信号肽)。其他信号肽包括但不限于来自于酿酒酵母的α-因子信号肽(通过引用并入本文的美国专利号4,870,008)、小鼠唾液淀粉酶的信号肽(O.Hagenbuchle等，Nature 289,1981,pp.643-646)、改良的羧肽酶信号肽(L.A.Valls等，Cell 48,1987,pp.887-897)、酵母BAR1信号肽(WO 87/02670，其通过引用并入本文)和酵母天冬氨酸蛋白酶3(YAP3)信号肽(参见M.Egel-Mitani等，Yeast 6,1990,pp.127-137)。

[0493] 适合的哺乳动物宿主细胞的实例对于本领域普通技术人员来说是已知的。这些宿主细胞可以是中华仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如CHO-K1;ATCC CCL-61)、绿猴细胞(COS)(例如COS 1(ATCC CRL-1650)、COS 7(ATCC CRL-1651))、小鼠细胞(例如NS/0)、幼仓鼠肾(BHK)细胞系(例如ATCC CRL-1632或ATCC CCL-10)和人类细胞(例如HEK 293(ATCC CRL-1573))，以及组织培养物中的植物细胞。这些细胞系和其他细胞系可以从公共保藏库例如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,Rockville,Md)获得。为了提供IL-2

多肽的提高的糖基化，可以对哺乳动物宿主细胞进行修饰以表达唾液酸基转移酶例如1,6-唾液酸基转移酶，例如在通过引用并入本文的美国专利号5,047,335中所描述的。

[0494] 用于将外源DNA引入到哺乳动物宿主细胞中的方法包括但不限于磷酸钙介导的转染、电穿孔、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染、病毒载体和Life Technologies Ltd,Paisley,UK描述的使用Lipofectamin 2000和Roche Diagnostics Corporation,Indianapolis,USA描述的使用FuGENE 6的转染方法。这些方法在本领域中是公知的，并且被Ausbel等主编，1996，《分子生物学现代方法》(Current Protocols in Molecular Biology)，John Wiley&Sons,New York,USA来描述。哺乳动物细胞的培养可以按照已建立的方法来进行，例如在(《动物细胞生物技术、方法和方案》(Animal Cell Biotechnology,Methods and Protocols)，Nigel Jenkins主编，1999，Human Press Inc.Totowa,N.J.,USA以及Harrison Mass.和Rae IF，《细胞培养的通用技术》(General Techniques of Cell Culture)，Cambridge University Press 1997)中所公开的。

[0495] I.大肠杆菌(E.Coli)、假单胞菌物种(Pseudomonas species)和其他原核生物细菌表达技术对于本领域普通技术人员来说是已知的。可获得大量各种不同的载体用于细菌宿主中。所述载体可以是单拷贝或者低或高多拷贝载体。载体可用于克隆和/或表达。有鉴于关于载体的大量文献、许多载体的商业可获得性和甚至是描述载体及其限制性图谱和特征的手册，在这里并不需要深入讨论。正如众所周知的，载体通常包含允许进行选择的标记，所述标记可能提供细胞毒性药剂抗性、原养型或免疫力。通常存在提供不同特征的多个标记。

[0496] 细菌启动子是能够结合细菌RNA聚合酶并启动下游(3')编码序列(例如结构基因)转录成mRNA的任何DNA序列。启动子具有转录起始区，其通常位于编码序列的5'末端附近。这个转录起始区通常包括RNA聚合酶结合位点和转录起始位点。细菌启动子还可以具有被称为操纵子的第二个结构域，其可以与RNA合成开始处的邻近RNA聚合酶结合位点交叠。所述操纵子允许负调控的(可诱导的)转录，因为基因阻遏蛋白可以结合所述操纵子并因此抑制特定基因的转录。在不存在负调控元件例如操纵子的情况下可能发生组成型表达。此外，正调控可以通过基因激活蛋白结合序列来实现，所述序列如果存在的话，通常在所述RNA聚合酶结合序列附近(5')。基因激活蛋白的实例是分解代谢物激活蛋白(CAP)，其在大肠杆菌中帮助起始lac操纵子的转录(Raibaud等，ANNU.REV.GENET.(1984)18:173)。因此，调控表达可以是正或负的，从而增强或减弱转录。

[0497] 编码代谢途径酶的序列提供了特别有用的启动子序列。实例包括源自于糖代谢酶例如半乳糖、乳糖(lac)(Chang等，NATURE(1977)198:1056)和麦芽糖的启动子序列。其他实例包括源自于生物合成酶例如色氨酸(trp)的启动子序列(Goeddel等，NUC.ACIDS RES.(1980)8:4057;Yelverton等，NUCL.ACIDS RES.(1981)9:731;美国专利号4,738,921;欧洲专利公布号036 776和121 775，其通过引用并入本文)。β-半乳糖苷酶(bla)启动子系统(Weissmann(1981)，干扰素的克隆和其他错误(The cloning of interferon and other mistakes)，Interferon 3(I.Gresser主编))、噬菌体λPL(Shimatake等，NATURE(1981)292:128)和T5(美国专利号4,689,406，其通过引用并入本文)启动子系统也提供了有用的启动子序列。本发明的优选方法利用强启动子例如T7启动子来以高水平诱导IL-2多肽。这些载体的实例对于本领域普通技术人员来说是已知的，并包括来自于Novagen的pET29系列和在

通过引用并入本文的WO99/05297中描述的pPOP载体。这些表达系统在宿主中生产高水平的IL-2多肽，而不损害宿主细胞生存力或生长参数。pET19(Novagen)是本领域中已知的另一种载体。

[0498] 此外，自然界中不存在的合成启动子也起到细菌启动子的作用。例如，可以将一种细菌或噬菌体启动子的转录激活序列与另一种细菌或噬菌体启动子的操纵子序列联结，产生合成的杂合启动子(美国专利号4,551,433，其通过引用并入本文)。例如，tac启动子是一种杂合的trp-lac启动子，包含trp启动子和受到lac阻遏蛋白调控的lac操纵子序列两者(Amann等，GENE(1983)25:167;de Boer等，PROC.NATL.ACAD.SCI.(1983)80:21)。此外，细菌启动子可以包括具有结合细菌RNA聚合酶并起始转录的能力的非细菌来源的天然存在的启动子。非细菌来源的天然存在的启动子也可以与相容的RNA聚合酶耦合，以在原核生物中产生某些基因的高水平表达。噬菌体T7 RNA聚合酶/启动子系统是耦合启动子系统的实例(Studier等，J.MOL.BIOL.(1986)189:113;Tabor等，Proc Natl.Acad.Sci.(1985)82:1074)。此外，杂合启动子也可以包含噬菌体启动子和大肠杆菌操纵子区(欧洲专利公布号267 851)。

[0499] 除了有功能的启动子序列之外，高效的核糖体结合位点对于外来基因在原核生物中的表达也是有用的。在大肠杆菌中，所述核糖体结合位点被称为Shine-Dalgarno(SD)序列，并包括起始密码子(ATG)和位于所述起始密码子上游3-11个核苷酸的长度为3-9个核苷酸的序列(Shine等，NATURE(1975)254:34)。所述SD序列据认为通过SD序列与大肠杆菌16S rRNA的3'末端之间的碱基配对来促进mRNA与核糖体的结合(Steitz等，信使RNA中的遗传信号和核苷酸序列(Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA)，《生物调控和发育:基因表达》(Biological Regulation and Development:Gene Expression)(R.F.Goldberger主编，1979))。为了表达具有弱的核糖体结合位点的真核基因和原核基因(Sambrook等，克隆的基因在大肠杆菌中的表达(Expression of cloned genes in Escherichia coli)，《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)，1989)。

[0500] 术语“细菌宿主”或“细菌宿主细胞”是指可以用作或已被用作重组载体或其他转移DNA的受体的细菌。所述术语包括已被转染的原始细菌宿主细胞的后代。应该理解，由于偶然或故意的突变，单一亲代细胞的后代可能不一定在形态或整套基因组或总DNA上与原始亲代完全一致。所述亲代细胞的通过相关性质例如编码IL-2多肽的核苷酸序列的存在来表征的与所述亲代足够相似的后代，被包括在该定义所打算的后代之内。

[0501] 用于表达IL-2多肽的适合的宿主细菌的选择为本领域普通技术人员所知。在选择用于表达的细菌宿主中，适合的宿主可以包括那些显示出具有尤其是良好的包含体形成能力、低蛋白水解活性和总体稳健性的宿主。细菌宿主通常可以从各种不同的来源获得，包括但不限于加利福尼亚大学生物物理学和医学物理学系细菌遗传储用物保藏中心(Bacterial Genetic Stock Center,Department of Biophysics and Medical Physics,University of California(Berkeley,CA))和美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection(“ATCC”)(Manassas,VA))。工业/制药发酵通常使用源自于K株的细菌(例如W3110)或源自于B株的细菌(例如BL21)。这些菌株由于它们的生长参数被极好地了解并且是稳健的，因此是特别有用的。此外，这些菌株是非致病的，这出于安全性和环境原因

在商业上是重要的。适合的大肠杆菌宿主的其他实例包括但不限于BL21、DH10B菌株或其衍生株。在本发明的方法的另一个实施方式中，所述大肠杆菌菌株是蛋白酶减弱菌株，包括但不限于OMP-和LON-。所述宿主细胞菌株可以是假单胞菌属(Pseudomonas)物种，包括但不限于荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)和恶臭假单胞菌(Pseudomonas putida)。被命名为MB101株的荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens)生物变种1，已知对重组生产有用并且可用于治疗性蛋白生产过程。假单胞菌表达系统的实例包括可以从The Dow Chemical Company作为宿主菌株获得的系统(Midland,MI，可以在万维网网址dow.com处获得)。

[0502] 一旦重组宿主细胞菌株已被建立后(即表达构建物已被引入到宿主细胞中并且分离到带有正确的表达构建物的宿主细胞)，将所述重组宿主细胞菌株在适合于生产IL-2多肽的条件下培养。正如对于本领域普通技术人员来说显而易见的，培养所述重组宿主细胞菌株的方法取决于使用的表达构建物的本质和所述宿主细胞的身份。重组宿主菌株通常使用本领域普通技术人员已知的方法来培养。重组宿主细胞通常在含有可同化的碳、氮和无机盐来源并任选地含有维生素、氨基酸、生长因子和本领域普通技术人员已知的其他蛋白质培养增补物的液体培养基中培养。用于宿主细胞培养的液体培养基可以任选地含有用于防止不想要的微生物生长的抗生素或抗真菌剂和/或用于选择含有表达载体的宿主细胞的化合物，包括但不限于抗生素。

[0503] 重组宿主细胞可以以分批或连续方式培养，并以分批或连续方式进行细胞收获(在所述IL-2多肽在细胞内积累的情况下)或培养上清液收获。对于在原核宿主细胞中的生产来说，分批培养和细胞收获是优选的。

[0504] 本发明的IL-2多肽通常在重组系统中表达之后被纯化。所述IL-2多肽可以通过本领域中已知的各种不同方法从宿主细胞或培养基纯化。在细菌宿主细胞中生产的IL-2多肽可能溶解性不良或不溶解(采取包含体的形式)。在本发明的一个实施方式中，可以利用本文中公开的以及本领域中已知的方法在所述IL-2中容易地进行氨基酸替换，所述替换被选择成用于提高重组生产的蛋白质的溶解性的目的。在不溶性蛋白质的情况下，所述蛋白质可以从宿主细胞裂解物通过离心来收集，并且随后可以进一步进行细胞的均质化。在溶解性不良的蛋白质的情况下，可以添加化合物(包括但不限于聚乙烯亚胺(PEI))以引起部分可溶的蛋白质的沉淀。然后可以通过离心方便地收集所述沉淀的蛋白质。重组宿主细胞可以通过本领域普通技术人员已知的各种不同方法破碎或均质化，以从细胞内释放出所述包含体。宿主细胞破碎或均质化可以使用公知的技术来进行，包括但不限于酶法细胞破碎、超声处理、杜恩斯均质化或高压释放破碎。在本发明的方法的一个实施方式中，使用高压释放技术来破碎大肠杆菌宿主细胞，以释放出所述IL-2多肽的包含体。在处理IL-2多肽的包含体时，使均质化重复时间最小化可能是有利的，以便使包含体的得率最大化而没有由诸如溶解、机械剪切或蛋白水解等因素造成的损失。

[0505] 然后可以使用本领域中已知的多种适合的增溶剂中的任一种来溶解不可溶或沉淀的IL-2多肽。所述IL-2多肽可以用尿素或盐酸胍溶解。所述溶解的IL-2多肽的体积应该被最小化，以便可以使用可方便管理的批量大小来生产大量批次。这个因素在可能在数千升体积的批次中生长重组宿主的大规模商业化背景中可能是重要的。此外，当在大规模商业化背景中制造IL-2多肽，尤其是用于人类制药用途时，如果可能，应避免使用会损坏机器

和容器或蛋白质产品本身的苛刻的化学物质。在本发明的方法中已显示，较温和的变性剂尿素可以代替较苛刻的变性剂盐酸胍用于溶解IL-2多肽包含体。尿素的使用显著降低了损坏在IL-2多肽的制造和纯化过程中使用的不锈钢设备的风险，同时有效地溶解IL-2多肽包含体。

[0506] 在可溶性IL-2蛋白的情况下，所述IL-2可能被分泌到周质空间中或培养基中。此外，可溶性IL-2可能存在于宿主细胞的细胞质中。在进行纯化步骤之前可能希望浓缩可溶性IL-2。可以使用本领域普通技术人员已知的标准技术从例如细胞裂解物或培养基浓缩可溶性IL-2。此外，可以使用本领域普通技术人员已知的标准技术来破碎宿主细胞，并从所述宿主细胞的细胞质或周质空间释放出可溶性IL-2。

[0507] 通常来说，有时希望变性并还原表达的多肽，然后使所述多肽重折叠成优选的构象。例如，可以向感兴趣的翻译产物添加胍、脲、DTT、DTE和/或伴侣蛋白。还原、变性和复性蛋白质的方法对于本领域普通技术人员来说是已知的(参见上面的参考文献，以及Debinski等，(1993)J.Biol.Chem.，268:14065-14070；Kreitman和Pastan，(1993)Bioconjug.Chem.，4:581-585；和Buchner等，(1992)Anal.Biochem.，205:263-270)。例如，Debinski等描述了包含体蛋白在胍-DTE中的变性和还原。所述蛋白质可以在含有包括但不限于氧化型谷胱甘肽和L-精氨酸的氧化还原缓冲液中重折叠。可以使重折叠试剂流动或以其他方式移动以与一种或多种多肽或其他表达产物相接触，反之亦可。

[0508] 在IL-2多肽的原核生产的情况下，由此生产的IL-2多肽可能错误折叠并因此缺少或具有降低的生物活性。所述蛋白质的生物活性可以通过“重折叠”来恢复。一般来说，错误折叠的IL-2多肽通过使用例如一种或多种离液剂(例如脲和/或胍)和能够还原二硫键的还原剂(例如二硫苏糖醇DTT或2-巯基乙醇2-ME)溶解(其中IL-2多肽也是不可溶的)、解折叠和还原所述多肽链来重折叠。然后在中等浓度的离液剂下添加允许二硫键重新形成的氧化剂(例如氧、胱氨酸或胱胺)。IL-2多肽可以使用本领域中已知的标准方法来重折叠，例如在通过引用并入本文的美国专利号4,511,502、4,511,503和4,512,922中描述的方法。所述IL-2多肽也可以与其他蛋白质共折叠，以形成异二聚体或异多聚体。

[0509] 在重折叠后，所述IL-2可以被进一步纯化。IL-2的纯化可以使用本领域普通技术人员已知的各种不同技术来完成，包括疏水相互作用层析、孔径排阻层析、离子交换层析、反相高效液相色谱、亲和层析等或其任何组合。另外的纯化也可以包括纯化的蛋白的干燥或沉淀的步骤。

[0510] 在纯化后，可以通过本领域中已知的各种不同方法中的任一者，包括但不限于渗滤和透析，将IL-2在不同的缓冲液中交换和/或浓缩。作为单一纯化蛋白提供的IL-2可能会经历聚集和沉淀。

[0511] 所述纯化的IL-2可以是至少90％纯(正如通过反相高效液相色谱RP-HPLC或十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳SDS-PAGE所测量的)或至少95％纯或至少96％纯或至少97％纯或至少98％纯或至少99％或更高纯。不论所述IL-2的纯度的准确数值如何，所述IL-2对于用作药品或用于进一步加工例如与水溶性聚合物例如PEG偶联来说足够纯。

[0512] 某些IL-2分子可以在不存在其他活性成分或蛋白质(在赋形剂、载体和稳定剂、血清白蛋白等之外)的情况下用作治疗性药剂，或者它们可以与另一种蛋白质或聚合物复合。

[0513] 以前已显示，通过向用含有所需琥珀无义突变的基因编程的蛋白质合成反应添加

化学氨酰化的抑制子tRNA,可以将非天然氨基酸在体外位点特异性地并入到蛋白质中。使用这些方法,人们可以使用对特定氨基酸营养缺陷的菌株将许多常见20种氨基酸用结构相近的同源物替换,例如用氟代苯丙氨酸替换苯丙氨酸。参见例如Noren,C.J.,Anthony-Cahill,Griffith,M.C.,Schultz,P.G.,用于在蛋白质中位点特异性并入非天然氨基酸的通用方法(A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins),Science,244:182-188(1989);M.W.Nowak等,Science 268:439-42(1995);Bain,J.D.,Glabe,C.G.,Dix,T.A.,Chamberlin,A.R.,Diala,E.S.,非天然氨基酸在多肽中的生物合成位点特异性并入(Biosynthetic site-specific Incorporation of a unnatural amino acid into a polypeptide),J.Am Chem Soc,111:8013-8014(1989);N.Budisa等,FASEB J.13:41-51(1999);Ellman,J.A.,Mendel,D.,Anthony-Cahill,S.,Noren,C.J.,Schultz,P.G.,用于将非天然氨基酸位点特异性引入到蛋白质中的生物合成方法(Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins),Methods in Enz.,vol.202,301-336(1992);和Mendel,D.,Cornish,V.W.&Schultz,P.G.,使用扩展遗传密码的定点诱变(Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code),Annu Rev Biophys.Biomol Struct.24,435-62(1995)。

[0514] 例如,制备了识别终止密码子UAG并用非天然氨基酸化学氨酰化的抑制子tRNA。使用常规的定点诱变在蛋白质基因中感兴趣的位点处引入所述终止密码子TAG。参见例如Sayers,J.R.,Schmidt,W.Eckstein,F.,基于硫代磷酸酯的寡核苷酸指导的诱变中的5'-3'外切核酸酶(5'-3'Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagensis),Nucleic Acids Res,16(3):791-802(1988)。当所述酰化的抑制子tRNA和突变体基因被合并在体外转录/翻译系统中时,对所述UAG密码子做出响应并入所述非天然氨基酸,给出在所述特定位置处含有该氨基酸的蛋白质。使用[^{3}H]-Phe的实验和使用α-羟基酸的实验证实了只有所述所需氨基酸被并入在由UAG密码子指定的位置处,并且这个氨基酸不被并入在所述蛋白质中的任何其他位点处。参见例如Noren等,同上;Kobayashi等,(2003)Nature Structural Biology10(6):425-432;和Ellman,J.A.,Mendel,D.,Schultz,P.G.,新骨架结构在蛋白质中的位点特异性并入(Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins),Science,255(5041):197-200(1992)。

[0515] tRNA可以通过任何方法或技术用所需氨基酸氨酰化,包括但不限于化学或酶促氨酰化。

[0516] 氨酰化可以通过氨酰基tRNA合成酶或其他酶分子(包括但不限于核酶)来完成。术语"核酶"可以与"催化性RNA"互换。Cech和合作者(Cech,1987,Science,236:1532-1539;McCorkle等,1987,Concepts Biochem.64:221-226)证实了可以充当催化剂的天然存在的RNA(核酶)的存在。然而,尽管这些天然RNA催化剂仅显示出作用于核糖核酸底物用于切割和拼接,但核酶人工进化的最新发展已将催化谱扩展到各种不同的化学反应。研究已鉴定到可以在其自身的(2')3'-末端上催化氨酰基-RNA键的RNA分子(Illangakekare等,1995Science 267:643-647)和可以将氨基酸从一个RNA分子转移到另一个RNA分子的RNA分子(Lohse等,1996,Nature 381:442-444)。

[0517] 通过引用并入本文的美国专利申请公布2003/0228593描述了构建核酶的方法及其在用天然编码和非天然编码的氨基酸将tRNA氨酰化中的用途。可以将tRNA氨酰化的酶分子(包括但不限于核酶)的基质固定化的形式,可能能够对所述氨酰化的产物进行高效亲和纯化。适合的基质的实例包括琼脂糖、琼脂糖凝胶和磁珠。核酶的基质固定化的形式的生产和用于氨酰化的用途描述在Chemistry and Biology 2003,10:1077-1084和美国专利申请公布2003/0228593中,它们通过引用并入本文。

[0518] 化学氨酰化方法包括但不限于下述研究者所介绍的方法:Hecht和合作者(Hecht,S.M.Acc.Chem.Res.1992,25,545;Heckler,T.G.;Roesser,J.R.;Xu,C.;Chang,P.;Hecht,S.M.Biochemistry 1988,27,7254;Hecht,S.M.;Alford,B.L.;Kuroda,Y.;Kitano,S.J.Biol.Chem.1978,253,4517);Schultz、Chamberlin、Dougherty等人(Cornish,V.W.;Mendel,D.;Schultz,P.G.Angew.Chem.Int.Ed.Engl.1995,34,621;Robertson,S.A.;Ellman,J.A.;Schultz,P.G.J.Am.Chem.Soc.1991,113,2722;Noren,C.J.;Anthony-Cahill,S.J.;Griffith,M.C.;Schultz,P.G.Science 1989,244,182;Bain,J.D.;Glabe,C.G.;Dix,T.A.;Chamberlin,A.R.J.Am.Chem.Soc.1989,111,8013;Bain,J.D.等,Nature 1992,356,537;Gallivan,J.P.;Lester,H.A.;Dougherty,D.A.Chem.Biol.1997,4,740;Turcatti等,J.Biol.Chem.1996,271,19991;Nowak,M.W.等,Science,1995,268,439;Saks,M.E.等,J.Biol.Chem.1996,271,23169;Hohsaka,T.等,J.Am.Chem.Soc.1999,121,34),所述文献通过引用并入本文,以避免在氨酰化中使用合成酶。这些方法或其他化学氨酰化方法可用于将tRNA分子氨酰化。

[0519] 用于产生催化性RNA的方法可以包括产生随机化核酶序列的分开的合并物,对所述合并物进行定向进化,从所述合并物筛选所需的氨酰化活性,以及选择那些表现出所需氨酰化活性的核酶的序列。

[0520] 也可以使用重构的翻译系统。纯化的翻译因子的混合物也已被成功地用于将mRNA翻译成蛋白质,裂解物的组合或增补有纯化的翻译因子例如起始因子-1(IF-1)、IF-2、IF-3(α或β)、延伸因子T(EF-Tu)或终止因子的裂解物也是如此。无细胞系统也可以与转录/翻译系统耦合,其中将DNA引入到所述系统中,转录成mRN并翻译所述mRNA,正如在特别地通过引用并入本文的《分子生物学现代方法》(Current Protocols in Molecular Biology)(F.M.Ausubel等主编,Wiley Interscience,1993)中所描述的。在真核转录系统中转录的RNA可以采取异核RNA(hnRNA)或5′-末端加帽(7-甲基鸟苷)和3′末端poly A加尾的成熟mRNA的形式,这在某些翻译系统中可能是有利的。例如,在网织红细胞裂解物系统中加帽的mRNA以高效率被翻译。IX.偶联到IL-2多肽的大分子聚合物

[0521] 对本文描述的非天然氨基酸多肽的各种不同修饰可以使用本文中描述的组合物、方法、技术和策略来实施。这些修饰包括将其他官能团并入到所述多肽的非天然氨基酸组分上,所述其他官能团包括但不限于标记物、染料、聚合物、水溶性聚合物、聚乙二醇的衍生物、光交联剂、放射性核素、细胞毒性化合物、药物、亲和标记物、光亲和标记物、反应性化合物、树脂、第二蛋白质或多肽或多肽类似物、抗体或抗体片段、金属螯合剂、辅因子、脂肪酸、糖类、多核苷酸、DNA、RNA、反义多核苷酸、糖、水溶性树枝状聚合物、环糊精、抑制性核糖核酸、生物材料、纳米粒子、自旋标记物、荧光团、含金属组成部分、放射活性组成部分、新官能团、与其他分子共价或非共价相互作用的基团、光笼化组成部分、光化辐射可激发的组成部

分、可光异构化的组成部分、生物素、生物素的衍生物、生物素类似物、掺有重原子的组成部分、化学可切割基团、光可切割基团、延长的侧链、碳连接的糖、氧化还原活性剂、氨基硫代酸、毒性组成部分、同位素标记的组成部分、生物物理探针、磷光基团、化学发光基团、电子致密基团、磁性基团、嵌入基团、发色团、能量转移试剂、生物活性药剂、可检测标记物、小分子、量子点、纳米发射体、放射性核苷酸、放射性发射体、中子捕获剂或上述物质的任何组合或任何其他所需化合物或物质。作为本文中描述的组合物、方法、技术和策略的说明性而非限制性实例，下面的描述将聚焦于将大分子聚合物添加到非天然氨基酸多肽，并且应该理解所述组合物、方法、技术和策略也适用于(如有必要进行适当修改，并且本领域技术人员可以利用本公开做出这些修改)添加其他官能团，包括但不限于上面列出的那些。

[0522] 可以将广泛种类的大分子聚合物和其他分子连接到本发明的IL-2多肽，以调节所述IL-2多肽的生物学性质和/或为所述IL-2分子提供新的生物学性质。这些大分子聚合物可以通过天然编码的氨基酸、通过非天然编码的氨基酸、或者天然或非天然氨基酸的任何有功能的取代基、或者添加到天然或非天然氨基酸的任何取代基或官能团，连接到所述IL-2多肽。所述聚合物的分子量可以具有广阔范围，包括但不限于约100Da至约100,000Da之间或更大。所述聚合物的分子量可以在约100Da至约100,000Da之间，包括但不限于100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da和100Da。在某些实施方式中，所述聚合物的分子量在约100Da至约50,000Da之间。在某些实施方式中，所述聚合物的分子量在约100Da至约40,000Da之间。在某些实施方式中，所述聚合物的分子量在约1,000Da至约40,000Da之间。在某些实施方式中，所述聚合物的分子量在约5,000Da至约40,000Da之间。在某些实施方式中，所述聚合物的分子量在约10,000Da至约40,000Da之间。

[0523] 本发明提供聚合物:蛋白质偶联物的基本上均质的制备物。当在本文中使用时，“基本上均质的”意味着观察到聚合物:蛋白质偶联物分子超过总蛋白的一半。所述聚合物:蛋白质偶联物具有生物学活性，并且本文中提供的“基本上均质的”PEG化的IL-2多肽制备物是足以表现出均质制备物的优点例如在临床应用中易于获得批次间药代动力学的可预测性的均质制备物。

[0524] 人们也可以选择制备聚合物:蛋白质偶联物分子的混合物，并且本文中提供的优点在于人类可以选择包含在所述混合物中的单聚合物:蛋白质偶联物的比例。因此，如果需要，人们可以制备附连有各种不同数目(即二、三、四等)的聚合物组成部分的各种不同蛋白的混合物，并将所述偶联物与使用本发明的方法制备的单聚合物:蛋白质偶联物合并，获得具有预定比例的单聚合物:蛋白质偶联物的混合物。

[0525] 所选的聚合物可以是水溶性的，使得它所附连到的蛋白质在水性环境例如生理环境中不沉淀。所述聚合物可以是分支或不分支的。为了最终产物制备物的治疗性使用，所述聚合物将是可药用的。

[0526] 聚合物的实例包括但不限于聚烷基醚及其烷氧基封端的类似物(例如聚氧乙二醇、聚氧乙二醇/丙二醇及它们特别是聚氧乙二醇的甲氧基或乙氧基封端的类似物，聚氧乙

二醇也被称为聚乙二醇或PEG)，聚乙烯吡咯烷酮，聚乙烯基烷基醚，聚噁唑啉，聚烷基噁唑啉和聚羟基烷基噁唑啉，聚丙烯酰胺，聚烷基丙烯酰胺和聚羟基烷基丙烯酰胺(例如聚羟基丙基甲基丙烯酰胺及其衍生物)，聚丙烯酸羟基烷基酯，聚唾液酸及其类似物，亲水性肽序列，多糖及其衍生物，包括葡聚糖和葡聚糖衍生物，例如羧甲基葡聚糖、葡聚糖硫酸酯、氨基葡聚糖，纤维素及其衍生物例如羧甲基纤维素、羟基烷基纤维素，几丁质及其衍生物例如壳聚糖、琥珀酰壳聚糖、羧甲基几丁质、羧甲基壳聚糖，透明质酸及其衍生物，淀粉，藻酸盐，硫酸软骨素，白蛋白，普鲁兰和羧甲基普鲁兰，聚氨基酸及其衍生物例如聚谷氨酸、聚赖氨酸、聚天冬氨酸、聚天冬氨酰胺，马来酸酐共聚物例如苯乙烯马来酸酐共聚物、二乙烯基乙醚马来酸酐共聚物，聚乙烯醇，它们的共聚物，它们的三元聚合物，它们的混合物，以及上述物质的衍生物。

[0527] 聚乙二醇分子与蛋白质分子的比例可变，它们在反应混合物中的浓度也是如此。通常，最佳比率(就反应效率而言，因为存在极少过量的未反应的蛋白质或聚合物)可以由所选的聚乙二醇的分子量和可用的反应性基团的数目决定。对于分子量而言，通常聚合物的分子量越高，可以附连到蛋白质的聚合物分子的数目越少。同样地，当优化这些参数时，应该将聚合物的分支考虑在内。通常来说，分子量越高(或分支越多)，聚合物:蛋白质比率越高。

[0528] 当在本文中使用时，并且当考虑PEG:IL-2多肽偶联物时，术语“治疗有效量”是指向患者提供所需益处的量。所述量随着个体而变，并且取决于许多因素，包括患者的总体身体状况和待治疗的病症的根本原因。用于疗法的IL-2多肽的量提供了可接受的改变速率并将所需响应维持在有益的水平。本发明的组合物的治疗有效量可以由本领域普通技术人员使用可公开获得的材料和程序容易地确定。

[0529] 所述水溶性聚合物可以具有任何结构形式，包括但不限于直链、分叉或支链。通常，所述水溶性聚合物是聚亚烷基二醇例如聚乙二醇(PEG)，但其他水溶性聚合物也可以使用。作为实例，使用PEG来描述本发明的某些实施方式。

[0530] PEG是一种公知的水溶性聚合物，其可以商购或者可以按照本领域普通技术人员已知的方法通过乙二醇的开环聚合来制备(Sandler和Karo，《聚合物合成》(Polymer Synthesis)，Academic Press，New York，Vol.3，第138-161页)。术语“PEG”被广义地用于涵盖任何聚乙二醇分子，不论尺寸如何或在PEG的末端处是否具有修饰，并且当连接到IL-2多肽时可以由下式表示：

[0531] $XO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$

[0532] 其中n是2至10,000，并且X是H或末端修饰，包括但不限于C_{1-4}烷基、保护基团或末端官能团。

[0533] 在某些情况下，在本发明中使用的PEG在一个末端用羟基或甲氧基封端，即X是H或CH_3(“甲氧基PEG”)。或者，所述PEG可以用反应性基团封端，由此形成双官能聚合物。典型的反应性基团可以包括常用于与20种常见氨基酸中存在的官能团反应的反应性基团(包括但不限于马来酰亚胺基团、活化的碳酸酯(包括但不限于对硝基苯基酯)、活化的酯(包括但不限于N-羟基琥珀酰亚胺、对硝基苯基酯)和醛)，以及对20种常见氨基酸是惰性的但与非天然编码的氨基酸中存在的互补官能团特异性反应的官能团(包括但不限于叠氮基、炔基)。值得注意的是，在上式中用Y示出的所述PEG的另一个末端将通过天然存在或非天然编码的

氨基酸直接或间接地附连到IL-2多肽。例如,Y可以是与所述多肽的胺基(包括但不限于赖氨酸的ε胺基或N-端胺基)相连的酰胺、氨基甲酸酯或脲键。或者,Y可以是与硫醇基(包括但不限于半胱氨酸的硫醇基)相连的马来酰亚胺键。或者,Y可以是通往20种常见氨基酸通常不可接近的残基的键。例如,所述PEG上的叠氮基可以与所述IL-2多肽上的炔基反应,以形成Huisgen[3+2]环加成产物。或者,所述PEG上的炔基可以与非天然编码的氨基酸中存在的叠氮基反应,以形成类似的产物。在某些实施方式中,在适用时强亲核剂(包括但不限于肼、酰肼、羟胺、氨基脲)可以与非天然编码的氨基酸中存在的醛或酮基反应,以形成腙、肟或半卡巴腙,其在某些情况下可以通过用适合的还原剂处理来进一步还原。或者,所述强亲核剂可以通过非天然编码的氨基酸并入到所述IL-2多肽中,并用于优先与所述水溶性聚合物中存在的酮或醛基反应。

[0534] 对于PEG来说,可以根据实际所需使用任何分子质量,包括但不限于根据需要约100道尔顿(Da)至100,000Da或更大(包括但不限于有时0.1-50kDa或10-40kDa)。所述PEG的分子量可以具有广阔范围,包括但不限于约100Da至约100,000Da之间或更大。PEG可以在约100Da至约100,000Da之间,包括但不限于100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da和100Da。在某些实施方式中,PEG在约100Da至约50,000Da之间。在某些实施方式中,PEG在约100Da至约40,000Da之间。在某些实施方式中,PEG在约1,000Da至约40,000Da之间。在某些实施方式中,PEG在约5,000Da至约40,000Da之间。在某些实施方式中,PEG在约10,000Da至约40,000Da之间。也可以使用支链PEG,包括但不限于每条链具有1-100kDa(包括但不限于1-50kDa或5-20kDa)范围内的MW的PEG分子。所述支链PEG的每条链的分子量可以包括但不限于在约1,000Da至约100,000Da之间或更大。所述支链PEG的每条链的分子量可以在约1,000Da至约100,000Da之间,包括但不限于100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da和1,000Da。在某些实施方式中,所述支链PEG的每条链的分子量在约1,000Da至约50,000Da之间。在某些实施方式中,所述支链PEG的每条链的分子量在约1,000Da至约40,000Da之间。在某些实施方式中,所述支链PEG的每条链的分子量在约5,000Da至约40,000Da之间。在某些实施方式中,所述支链PEG的每条链的分子量在约5,000Da至约20,000Da之间。广范围的PEG分子被描述在包括但不限于Shearwater Polymers,Inc.目录、Nektar Therapeutics目录中,所述目录通过引用并入本文。

[0535] 通常,所述PEG分子的至少一个末端可用于与所述非天然编码的氨基酸反应。例如,带有炔和叠氮基组成部分并用于与氨基酸侧链反应的PEG衍生物,可用于将PEG附连到本文中所描述的非天然编码的氨基酸。如果所述非天然编码的氨基酸包含叠氮基,则所述PEG通常将含有炔基组成部分以执行[3+2]环加成产物的形成,或者含有包含膦基团的活化的PEG物质(即酯、碳酸酯)以执行酰胺键的形成。可选地,如果所述非天然编码的氨基酸包含炔,则所述PEG通常将含有叠氮基组成部分以执行[3+2]Huisgen环加成产物的形成。如果

所述非天然编码的氨基酸包含羰基，则所述PEG通常将包含强亲核剂(包括但不限于酰肼、肼、羟胺或氨基脲官能团)，以便分别执行相应的腙、肟和半卡巴腙键的形成。在其他可选方式中，可以使用上述反应性基团的方向的颠倒，即所述非天然编码的氨基酸中的叠氮基组成部分可以与含有炔的PEG衍生物反应。

[0536] 在某些实施方式中，所述带有PEG衍生物的IL-2多肽变体含有与所述非天然编码的氨基酸的侧链上存在的化学官能团具有反应性的化学官能团。

[0537] 在某些实施方式中，本发明提供了含有叠氮化物和乙炔的聚合物衍生物，其包含平均分子量为约800Da至约100,000Da的水溶性聚合物骨架。所述水溶性聚合物的聚合物骨架可以是聚乙二醇。然而，应该理解，广泛种类的水溶性聚合物，包括但不限于聚乙二醇和其他相关聚合物，包括聚葡萄糖和聚丙二醇，也适用于本发明的实践，并且术语PEG或聚乙二醇的使用旨在涵盖并包括所有此类分子。术语PEG包括但不限于采取任何形式的聚乙二醇，包括双官能PEG、多臂PEG、衍生化PEG、分叉PEG、支链PEG、悬垂PEG(即具有从聚合物骨架悬垂的一个或多个官能团的PEG或相关聚合物)或其中具有可降解的键的PEG。

[0538] PEG通常透明，无色，无臭，可溶于水，对热稳定，对许多化学试剂惰性，不水解或变质，并且通常是无毒的。聚乙二醇被认为是生物相容的，也就是说PEG能够与活组织或生物体共存而不引起损害。更具体来说，PEG是基本上无免疫原性的，也就是说PEG在体内不倾向于产生免疫应答。当附连到在体内具有某种所需功能的分子例如生物活性药剂时，PEG倾向于掩蔽所述药剂并且可以减少或消除任何免疫应答，使得生物体可以耐受所述药剂的存在。PEG偶联物不倾向于产生显著免疫应答或引起凝血或其他不良作用。具有式--CH_2CH_2O--$(CH_2CH_2O)_n$--CH_2CH_2--(其中n为约3至约4000，通常为约20至约2000)的PEG适合用于本发明。在本发明的某些实施方式中，具有约800Da至约100,000Da的分子量的PEG作为聚合物骨架特别有用。PEG的分子量可以具有广阔范围，包括但不限于约100Da至约100,000Da之间或更高。PEG的分子量可以在约100Da至约100,000Da之间，包括但不限于100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da和100Da。在某些实施方式中，PEG的分子量在约100Da至约50,000Da之间。在某些实施方式中，PEG的分子量在约100Da至约40,000Da之间。在某些实施方式中，PEG的分子量在约1,000Da至约40,000Da之间。在某些实施方式中，PEG的分子量在约5,000Da至约40,000Da之间。在某些实施方式中，PEG的分子量在约10,000Da至约40,000Da之间。

[0539] 所述聚合物骨架可以是直链或支链的。支链聚合物骨架在本领域中通常是已知的。通常，支链聚合物具有中央支链核心组成部分和连接到所述中央支链核心的多个线性聚合物链。PEG常常以支链形式使用，其可以通过将氧化乙烯加成到各种不同的多元醇例如甘油、甘油寡聚物、季戊四醇和山梨糖醇来制备。所述中央支链组成部分也可以源自于几种氨基酸例如赖氨酸。所述支链聚乙二醇可以以通用形式表示成R(-PEG-OH)$_m$，其中R源自于核心组成部分例如甘油、甘油寡聚物或季戊四醇，并且m表示臂的数量。多臂PEG分子例如在各自整体通过引用并入本文的美国专利号5,932,462、5,643,575、5,229,490、4,289,872、美国专利申请2003/0143596、WO 96/21469和WO 93/21259中所描述的那些，也可用作所述

聚合物骨架。

[0540] 支链PEG也可以采取由PEG(--$YCHZ_2$)$_n$所表示的分叉PEG的形式，其中Y是连接基团，Z是活化的末端基团，其通过确定长度的原子链连接到CH。

[0541] 另一种支链形式悬垂PEG具有沿着PEG骨架而不是在PEG链的末端处的反应性基团，例如羧基。

[0542] 除了这些形式的PEG之外，所述聚合物也可以被制备成在骨架中具有弱的或可降解的键。例如，PEG可以被制备成在聚合物骨架中具有易于水解的酯键。如下所示，这种水解导致所述聚合物被切割成较低分子量的片段：

[0543] -PEG-CO_2-PEG-+H_2O→PEG-CO_2H+HO-PEG-

[0544] 本领域普通技术人员应该理解，术语聚乙二醇或PEG代表或包括了本领域中已知的所有形式，包括但不限于本文中公开的那些。

[0545] 许多其他聚合物也适合用于本发明。在某些实施方式中，水溶性的、具有2至约300个末端的聚合物骨架在本发明中特别有用。适合的聚合物的实例包括但不限于其他聚亚烷基二醇例如聚丙二醇(“PPG”)、其共聚物(包括但不限于乙二醇和丙二醇的共聚物)、其三元聚合物、其混合物等。尽管聚合物骨架的每条链的分子量可变，但它通常在约800Da至约100,000Da，通常为约6,000Da至约80,000Da的范围内。所述聚合物骨架的每条链的分子量可以在约100Da至约100,000Da之间，包括但不限于100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da和100Da。在某些实施方式中，所述聚合物骨架的每条链的分子量在约100Da至约50,000Da之间。在某些实施方式中，所述聚合物骨架的每条链的分子量在约100Da至约40,000Da之间。在某些实施方式中，所述聚合物骨架的每条链的分子量在约1,000Da至约40,000Da之间。在某些实施方式中，所述聚合物骨架的每条链的分子量在约5,000Da至约40,000Da之间。在某些实施方式中，所述聚合物骨架的每条链的分子量在约10,000Da至约40,000Da之间。

[0546] 本领域技术人员将会认识到，前述基本上水溶性骨架的名单绝不是穷举的，而仅仅是说明性的，并且具有上述性质的所有聚合材料均被认为适合用于本发明。

[0547] 在本发明的某些实施方式中，聚合物衍生物是“多官能的”，意味着所述聚合物骨架具有至少两个末端并可能多达约300个末端被官能团官能化或活化。多官能聚合物衍生物包括但不限于具有两个末端的直链聚合物，每个末端被键合到可能相同或不同的官能团。

[0548] 在一个实施方式中，所述聚合物衍生物具有下述结构：

[0549] X—A—POLY—B—N＝N＝N

[0550] 其中：

[0551] N＝N＝N是叠氮基组成部分；

[0552] B是连接组成部分，其可以存在或不存在；

[0553] POLY是水溶性无抗原性聚合物；

[0554] A是连接组成部分，其可以存在或不存在并且可以与B相同或不同；并且

[0555] X是第二官能团。

[0556] 连接组成部分A和B的实例包括但不限于多官能化的烷基，其含有至多18个碳原子，并且可以含有1-10个之间的碳原子。杂原子例如氮、氧或硫可以被包括在所述烷基链内。所述烷基链也可以在杂原子处分支。连接组成部分A和B的其他实例包括但不限于多官能化的芳基，其含有至多10个碳原子，并且可以含有5-6个碳原子。所述芳基可以被一个或多个碳原子、氮、氧或硫原子取代。适合的连接基团的其他实例包括那些在各自通过引用并入本文的美国专利号5,932,462、5,643,575和美国专利申请公布2003/0143596中所描述的连接基团。本领域普通技术人员将会认识到，前述连接组成部分的名单绝不是穷举的，而仅仅是说明性的，并且具有上述性质的所有连接组成部分均被认为适合用于本发明。

[0557] 适合用作X的官能团的实例包括但不限于羟基、保护的羟基、烷氧基、活性酯例如N-羟基琥珀酰亚胺基酯和1-苯并三唑基酯、活性碳酸酯例如N-羟基琥珀酰亚胺基碳酸酯和1-苯并三唑基碳酸酯、缩醛、醛、醛水合物、烯基、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、活性砜、胺、氨氧基、保护的胺、酰肼、保护的酰肼、保护的硫醇、羧酸、保护的羧酸、异氰酸酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、乙烯基砜、二硫代吡啶、乙烯基吡啶、碘乙酰胺、环氧化物、乙二醛、二酮、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、三苯甲酸酯、烯烃、酮和叠氮化物。正如本领域普通技术人员所理解的，所选的X组成部分应该与所述叠氮基相容，使得不发生与所述叠氮基的反应。所述含叠氮基的聚合物衍生物可以是同双官能的，意味着所述第二官能团(即X)也是叠氮基组成部分，或者是异双官能的，意味着所述第二官能团是不同的官能团。

[0558] 术语“保护的”是指存在防止化学反应性官能团在某些反应条件下反应的保护基团或组成部分。所述保护基团根据待保护的化学反应性基团的类型而变。例如，如果所述化学反应性基团是胺或酰肼，则所述保护基团可以选自叔丁氧基羰基(t-Boc)和9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)。如果所述化学反应性基团是硫醇，则所述保护基团可以是邻吡啶基二硫化物。如果所述化学反应性基团是羧酸例如丁酸或丙酸或羟基，则所述保护基团可以是苯甲基或烷基例如甲基、乙基或叔丁基。本领域中已知的其他保护基团也可用于本发明。

[0559] 文献中的末端官能团的具体实例包括但不限于N-琥珀酰亚胺基碳酸酯(参见例如美国专利号5,281,698、5,468,478)、胺(参见例如Buckmann等，Makromol.Chem.182:1379(1981)，Zalipsky等，Eur.Polym.J.19:1177(1983))、酰肼(参见例如Andresz等，Makromol.Chem.179:301(1978))、琥珀酰亚胺基丙酸酯和琥珀酰亚胺基丁酸酯(参见例如Olson等，《聚乙二醇化学和生物学应用》(Poly(ethylene glycol)Chemistry&Biological Applications)，pp 170-181，Harris&Zalipsky主编，ACS，Washington，D.C.，1997；也参见美国专利号5,672,662)、琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(参见例如Abuchowski等，Cancer Biochem.Biophys.7:175(1984)和Joppich等，Makromol.Chem.180:1381(1979))、琥珀酰亚胺基酯(参见例如美国专利号4,670,417)、苯并三唑碳酸酯(参见例如美国专利号5,650,234)、缩水甘油基醚(参见例如Pitha等，Eur.J Biochem.94:11(1979)，Elling等，Biotech.Appl.Biochem.13:354(1991))、氧基羰基咪唑(参见例如Beauchamp等，Anal.Biochem.131:25(1983)，Tondelli等，J.Controlled Release 1:251(1985))、对硝基苯基碳酸酯(参见例如Veronese等，Appl.Biochem.Biotech.，11:141(1985)；和Sartore等，Appl.Biochem.Biotech.，27:45(1991))、醛(参见例如Harris等，J.Polym.Sci.Chem.Ed.22:341(1984)，美国专利号5,824,784，美国专利号5,252,714)、马

来酰亚胺(参见例如Goodson等,Biotechnology(NY)8:343(1990),Romani等,Chemistry of Peptides and Proteins 2:29(1984)和Kogan,Synthetic Comm.22:2417(1992))、邻吡啶基二硫化物(参见例如Woghiren等,Bioconj.Chem.4:314(1993))、丙烯醇(参见例如Sawhney等,Macromolecules,26:581(1993))、乙烯基砜(参见例如美国专利号5,900,461)。所有上述参考文献和专利通过引用并入本文。

[0560] 在本发明的某些实施方式中,本发明的聚合物衍生物包含具有下述结构的聚合物骨架:

[0561] X—CH_2CH_2O--$(CH_2CH_2O)_n$--CH_2CH_2-N=N=N

[0562] 其中:

[0563] X是如上所述的官能团;并且

[0564] n为约20至约4000。

[0565] 在另一个实施方式中,本发明的聚合物衍生物包含具有下述结构的聚合物骨架:

[0566] X—CH_2CH_2O--$(CH_2CH_2O)_n$--CH_2CH_2-O-$(CH_2)_m$-W-N=N=N

[0567] 其中:

[0568] W是包含1-10个之间的碳原子的脂族或芳香族接头组成部分;

[0569] n为约20至约4000;并且

[0570] X是如上所述的官能团。m在1至10之间。

[0571] 本发明的含叠氮基PEG衍生物可以通过本领域中已知的和/或本文中公开的各种不同方法来制备。在一种方法中,如下所示,将平均分子量为约800Da至约100,000Da、聚合物骨架具有键合到第一官能团的第一末端和键合到适合的离去基团的第二末端的水溶性聚合物骨架与叠氮基阴离子(其可以与大量适合的平衡离子中的任一者(包括钠、钾、叔丁基铵等)配对)进行反应。所述离去基团经历亲核置换并被所述叠氮基组成部分代替,得到所需的含叠氮基PEG聚合物。

[0572] X-PEG-L+N_3^-→X-PEG-N_3

[0573] 正如所示,适合用于本发明的聚合物骨架具有式X-PEG-L,其中PEG是聚乙二醇,X是不与叠氮基反应的官能团,并且L是适合的离去基团。适合的官能团的实例包括但不限于羟基、保护的羟基、缩醛、烯基、胺、氨氧基、保护的胺、保护的酰肼、保护的硫醇、羧酸、保护的羧酸、马来酰亚胺、二硫代吡啶以及乙烯基吡啶和铜。适合的离去基团的实例包括但不限于氯、溴、碘、甲磺酸酯、三苯甲酸酯和甲苯磺酸酯。

[0574] 在用于制备本发明的含叠氮基聚合物衍生物的另一个方法中,将带有叠氮基官能团的连接试剂与平均分子量为约800Da至约100,000Da的水溶性聚合物骨架相接触,其中所述连接试剂带有与所述PEG聚合物上的化学官能团选择性反应的化学官能团,以形成其中叠氮基通过连接基团与所述聚合物骨架分隔开的含叠氮基的聚合物衍生物产物。

[0575] 示例性反应图式如下所示:

[0576] X-PEG-M+N-接头-N=N=N→PG-X-PEG-接头-N=N=N

[0577] 其中:

[0578] PEG是聚乙二醇,X是封端基团例如烷氧基或如上所述的官能团;并且

[0579] M是与叠氮基官能团没有反应性但将与N官能团高效且选择性反应的官能团。

[0580] 适合的官能团的实例包括但不限于如果N是胺的话,M为羧酸、碳酸酯或活性酯;如

果N是酰肼或氨氧基组成部分的话,M是酮;如果N是亲核剂的话,M是离去基团。

[0581] 粗产物的纯化可以通过已知方法来完成,包括但不限于所述产物的沉淀,如果需要的话随后进行层析。

[0582] 更具体的实例在下面以PEG二胺为例示出,其中一个胺基被保护基团组成部分例如叔丁基-Boc保护,并将得到的单保护的PEG二胺与带有叠氮基官能团的连接组成部分反应:

[0583] $BocHN\text{-}PEG\text{-}NH_2+HO_2C\text{-}(CH_2)_3\text{-}N=N=N$

[0584] 在这种情况下,可以使用各种不同的活化剂例如亚硫酰氯或碳二亚胺试剂和N-羟基琥珀酰亚胺或N-羟基苯并三唑将所述胺基团偶联到羧酸基团,以在所述单胺PEG衍生物与所述带有叠氮基的接头组成部分之间产生酰胺键。在所述酰胺键成功形成之后,得到的N-叔丁基-Boc保护的含叠氮基衍生物可直接用于修饰生物活性分子,或者它可以被进一步精心设计以安装其他有用的官能团。例如,可以通过用强酸处理来水解所述N-t-Boc基团,以产生ω-氨基-PEG-叠氮化物。得到的胺可以用作合成把手以安装其他有用的官能团例如马来酰亚胺基团、活化的二硫化物、活化的酯等,用于产生有价值的异双官能试剂。

[0585] 当希望将不同分子附连到聚合物的每个末端时,异双官能衍生物是特别有用的。例如,ω-N-氨基-N-叠氮基PEG允许将具有活化的亲电基团的分子例如醛、酮、活化的酯、活化的碳酸酯等附连到所述PEG的一个末端,并将具有乙炔基团的分子附连到所述PEG的另一个末端。

[0586] 在本发明的另一个实施方式中,所述聚合物衍生物具有下述结构:

[0587] X—A—POLY—B—C≡C-R

[0588] 其中:

[0589] R可以是H或烷基、烯基、烷氧基或芳基或取代的芳基;

[0590] B是连接组成部分,其可以存在或不存在;

[0591] POLY是水溶性无抗原性聚合物;

[0592] A是连接组成部分,其可以存在或不存在,并且可以与B相同或不同;并且

[0593] X是第二官能团。

[0594] 连接组成部分A和B的实例包括但不限于多官能化的烷基,其含有至多18个碳原子,并且可以含有1-10个之间的碳原子。杂原子例如氮、氧或硫可以被包括在所述烷基链内。所述烷基链也可以在杂原子处分支。连接组成部分A和B的其他实例包括但不限于多官能化的芳基,其含有至多10个碳原子,并且可以含有5-6个碳原子。所述芳基可以被一个或多个碳原子、氮、氧或硫原子取代。适合的连接基团的其他实例包括那些在各自通过引用并入本文的美国专利号5,932,462、5,643,575和美国专利申请公布2003/0143596中所描述的连接基团。本领域普通技术人员将会认识到,前述连接组成部分的名单绝不是穷举的,而仅仅是说明性的,并且具有上述性质的广泛种类的连接组成部分被认为在本发明中有用。

[0595] 适合用作X的官能团的实例包括羟基、保护的羟基、烷氧基、活性酯例如N-羟基琥珀酰亚胺基酯和1-苯并三唑基酯、活性碳酸酯例如N-羟基琥珀酰亚胺基碳酸酯和1-苯并三唑基碳酸酯、缩醛、醛、醛水合物、烯基、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、活性砜、胺、氨氧基、保护的胺、酰肼、保护的酰肼、保护的硫醇、羧酸、保护的羧酸、异氰酸酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、乙烯基砜、二硫代吡啶、乙烯基吡啶、碘乙酰胺、环氧化物、乙二醛、二酮、甲磺

酸酯、甲苯磺酸酯、三苯甲酸酯、烯烃、酮和乙炔。正如将会理解的，所选的X组成部分应该与所述乙炔基相容，使得不发生与所述乙炔基的反应。所述含乙炔聚合物衍生物可以是同双官能的，意味着所述第二官能团(即X)也是乙炔组成部分，或者是异双官能的，意味着所述第二官能团是不同的官能团。

[0596] 在本发明的另一个实施方式中，所述聚合物衍生物包含具有下述结构的聚合物骨架：

[0597] $X—CH_2CH_2O--(CH_2CH_2O)_n--CH_2CH_2-O-(CH_2)_m-C\equiv CH$

[0598] 其中：

[0599] X是如上所述的官能团；

[0600] n为约20至约4000；并且

[0601] m在1至10之间。

[0602] 每种异双官能PEG聚合物的具体实例在下文中示出。

[0603] 本发明的含乙炔PEG衍生物可以使用本领域普通技术人员已知的和/或本文公开的方法来制备。在一种方法中，将平均分子量为约800Da至约100,000Da、聚合物骨架具有键合到第一官能团的第一末端和键合到适合的亲核基团的第二末端的水溶性聚合物骨架与带有乙炔官能团和适合于与所述PEG上的亲核基团反应的离去基团两者的化合物进行反应。当将所述带有亲核组成部分的PEG聚合物与所述带有离去基团的分子合并时，所述离去基团经历亲核取代并被所述亲核组成部分代替，得到所需的含乙炔聚合物。

[0604] $X\text{-}PEG\text{-}Nu+L\text{-}A\text{-}C\rightarrow X\text{-}PEG\text{-}Nu\text{-}A\text{-}C\equiv CR'$

[0605] 正如所示，用于所述反应的优选聚合物骨架具有式X-PEG-Nu，其中PEG是聚乙二醇，Nu是亲核组成部分，并且X是不与Nu、L或乙炔官能团反应的官能团。

[0606] Nu的实例包括但不限于主要通过SN2-类型的机制反应的胺、烷氧基、芳氧基、硫氢基、亚氨基、羧酸、酰肼、氨氧基。Nu基团的其他实例包括主要通过亲核加成反应进行反应的官能团。L基团的实例包括氯、溴、碘、甲磺酸酯、三苯甲酸酯和甲苯磺酸酯和预期经历亲核置换的其他基团，以及酮、醛、硫酯、烯烃、α-β不饱和羰基、碳酸酯和预期通过亲核剂经历加成的其他亲电基团。

[0607] 在本发明的另一个实施方式中，A是1-10个碳原子之间的脂族接头或6-14个碳原子之间的取代的芳基环。X是不与叠氮基反应的官能团，并且L是适合的离去基团。

[0608] 在用于制备本发明的含乙炔聚合物衍生物的另一种方法中，将平均分子量为约800Da至约100,000Da、在一个末端带有保护的官能团或封端剂并且在另一个末端带有适合的离去基团的PEG聚合物与乙炔阴离子相接触。

[0609] 示例性的反应图式如下所示：

[0610] $X\text{-}PEG\text{-}L+\text{-}C\equiv CR'\rightarrow X\text{-}PEG\text{-}C\equiv CR'$

[0611] 其中：

[0612] PEG是聚乙二醇，X是封端基团例如烷氧基或如上所述的官能团；并且

[0613] R'是H、烷基、烷氧基、芳基或芳氧基或取代的烷基、烷氧基、芳基或芳氧基。

[0614] 在上述实例中，离去基团L应该具有足够的反应性，以在与足够浓度的乙炔阴离子接触时经历SN2类型的置换。实现离去基团被乙炔阴离子的SN2置换所需的反应条件对于本领域普通技术人员来说是已知的。

[0615] 粗产物的纯化通常可以通过本领域中已知的方法来完全，包括但不限于所述产物的沉淀，随后如果需要的话进行层析。

[0616] 水溶性聚合物可以被连接到本发明的IL-2多肽。所述水溶性聚合物可以通过并入到所述IL-2多肽中的非天然编码的氨基酸、或非天然编码或天然编码的氨基酸的任何官能团或取代基、或添加到非天然编码或天然编码的氨基酸的任何官能团或取代基来连接。可选地，所述水溶性聚合物通过天然存在的氨基酸(包括但不限于半胱氨酸、赖氨酸或N-端残基的胺基)连接到并入有非天然编码的氨基酸的IL-2多肽。在某些情况下，本发明的IL-2多肽包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个非天然氨基酸，其中一个或多个非天然编码的氨基酸被连接到水溶性聚合物(包括但不限于PEG和/或寡糖)。在某些情况下，本发明的IL-2多肽还包含连接到水溶性聚合物的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个天然编码的氨基酸。在某些情况下，本发明的IL-2多肽包含连接到水溶性聚合物的一个或多个非天然编码的氨基酸和连接到水溶性聚合物的一个或多个天然存在的氨基酸。在某些实施方式中，在本发明中使用的水溶性聚合物提高所述IL-2多肽相对于未偶联形式的血清半衰期。

[0617] 连接到本发明的IL-2多肽的水溶性聚合物的数目(即PEG化或糖基化的程度)可以被调整，以提供改变的(包括但不限于提高或降低的)药理学、药代动力学或药效学特征例如体内半衰期。在某些实施方式中，IL-2的半衰期相对于未修饰的多肽被提高至少约10、20、30、40、50、60、70、80、90％、2倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、50倍或至少约100倍。

[0618] 含有强亲核基团(即酰肼、肼、羟胺或氨基脲)的PEG衍生物

[0619] 在本发明的一个实施方式中，将包含含羰基非天然编码的氨基酸的IL-2多肽用含有被直接连接到PEG骨架的末端肼、羟胺、酰肼或氨基脲组成部分的PEG衍生物修饰。

[0620] 在某些实施方式中，所述羟胺末端的PEG衍生物具有下述结构：

[0621] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-O-NH_2$

[0622] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等)，m是2-10，并且n是100-1,000(即平均分子量在5-40kDa之间)。

[0623] 在某些实施方式中，所述含有肼或酰肼的PEG衍生物具有下述结构：

[0624] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X-NH-NH_2$

[0625] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等)，m是2-10，并且n是100-1,000，X任选地是可以存在或不存在的羰基(C＝O)。

[0626] 在某些实施方式中，所述含有氨基脲的PEG衍生物具有下述结构：

[0627] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$

[0628] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等)，m是2-10，并且n是100-1,000。

[0629] 在本发明的另一个实施方式中，将包含含羰基氨基酸的IL-2多肽用含有利用酰胺键连接到PEG骨架的末端羟胺、酰肼、肼或氨基脲组成部分的PEG衍生物修饰。

[0630] 在某些实施方式中，所述羟胺末端的PEG衍生物具有下述结构：

[0631] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-O-NH_2$

[0632] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等)，m是2-10，并且n是100-1,000(即平均分子量在5-40kDa之间)。

[0633] 在某些实施方式中，所述含有肼或酰肼的PEG衍生物具有下述结构：

[0634] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-X-NH-NH_2$

[0635] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m是2-10,n是100-1,000,并且X任选地是可以存在或不存在的羰基(C=O)。

[0636] 在某些实施方式中,所述含有氨基脲的PEG衍生物具有下述结构:

[0637] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$

[0638] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m是2-10,并且n是100-1,000。

[0639] 在本发明的另一个实施方式中,将包含含羰基氨基酸的IL-2多肽用含有末端肼、羟胺、酰肼或氨基脲组成部分的支链PEG衍生物修饰,其中所述支链PEG的每条链具有10-40kDa并且可以为5-20kDa范围内的MW。

[0640] 在本发明的另一个实施方式中,将包含非天然编码的氨基酸的IL-2多肽用具有支链结构的PEG衍生物修饰。例如,在某些实施方式中,所述肼或酰肼末端的PEG衍生物具有下述结构:

[0641] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-NH-NH_2$

[0642] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m是2-10,并且n是100-1,000,并且X任选地是可以存在或不存在的羰基(C=O)。

[0643] 在某些实施方式中,所述含有氨基脲基的PEG衍生物具有下述结构:

[0644] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$

[0645] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等),X任选为NH、O、S、C(O)或不存在,m是2-10,并且n是100-1,000。

[0646] 在某些实施方式中,所述含有羟胺基团的PEG衍生物具有下述结构:

[0647] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)_m-O-NH_2$

[0648] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等),X任选为NH、O、S、C(O)或不存在,m是2-10,并且n是100-1,000。

[0649] 所述水溶性聚合物被连接到所述IL-2多肽的程度和位点可以调节所述IL-2多肽与IL-2受体的结合。在某些实施方式中,所述连接被安排成使得所述IL-2多肽以约400nM或更低的K_d、以150nM或更低的K_d并且在某些情况下以100nM或更低的K_d结合IL-2受体,所述K_d通过平衡结合测定法来测量,例如在Spencer等,J.Biol.Chem.,263:7862-7867(1988)中所描述的。

[0650] 用于聚合物的活化以及用于肽的偶联的方法和化学已在文献中描述并且在本领域中是已知的。用于聚合物活化的常用方法包括但不限于使用溴化氰、高碘酸盐、戊二醛、双环氧化物、表氯醇、二乙烯砜、碳二亚胺、磺酰卤、三氯代三嗪等的官能团活化(参见R.F.Taylor,(1991),《蛋白质固定化:基础与应用》(PROTEIN IMMOBILISATION.FUNDAMENTAL AND APPLICATIONS),Marcel Dekker,N.Y.;S.S.Wong,(1992),《蛋白质偶联和交联的化学》(CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING),CRC Press,Boca Raton;G.T.Hermanson等,(1993),《固定化亲和配体技术》(IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES),Academic Press,N.Y.;Dunn,R.L.等主编,《聚合物药物和药物递送系统》(POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS),ACS Symposium Series Vol.469,American Chemical Society,Washington,D.C.1991)。

[0651] 关于PEG的官能化和偶联,有几篇综述和单行本可用。参见例如Harris,

Macromol.Chem.Phys.C25:325-373(1985);Scouten,Methods in Enzymology 135:30-65(1987);Wong等,Enzyme Microb.Technol.14:866-874(1992);Delgado等,Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9:249-304(1992);Zalipsky,Bioconjugate Chem.6:150-165(1995)。

[0652] 用于聚合物活化的方法也可以在WO 94/17039、美国专利号5,324,844、WO 94/18247、WO 94/04193、美国专利号5,219,564、美国专利号5,122,614、WO 90/13540、美国专利号5,281,698和WO 93/15189中找到,以及用于活化的聚合物和酶之间的偶联的方法包括但不限于凝血因子VIII(WO 94/15625)、血红蛋白(WO 94/09027)、载氧分子(美国专利号4,412,989)、核糖核酸酶和超氧化物歧化酶(Veronese等,App.Biochem.Biotech.11:141-52(1985))。引用的所有参考文献和专利通过引用并入本文。

[0653] 含有非天然编码的氨基酸例如对叠氮基-L-苯丙氨酸的IL-2多肽的PEG化(即任何水溶性聚合物的添加)通过任何方便的方法来进行。例如,将IL-2多肽用末端为炔基的mPEG衍生物PEG化。简单来说,在室温下,在搅拌下向含有对叠氮基-L-Phe的IL-2多肽的水性溶液添加过量的固体mPEG(5000)-O-CH_2-C≡CH。通常,将所述水性溶液用pK_a接近反应将要进行时的pH(通常为约pH 4-10)的缓冲剂缓冲。用于例如pH 7.5下的PEG化的适合的缓冲剂的实例包括但不限于HEPES、磷酸盐、硼酸盐、TRIS-HCl、EPPS和TES。连续监测pH并在必要时调整。通常允许所述反应继续约1-48小时之间。

[0654] 随后对反应产物进行疏水相互作用层析,以将所述PEG化的IL-2多肽变体与游离的mPEG(5000)-O-CH_2-C≡CH和所述PEG化的IL-2多肽的任何高分子量复合物分离开,所述复合物可能在未被阻断的PEG在分子的两个末端被活化,从而交联IL-2多肽变体分子时形成。疏水相互作用层析过程中的条件使得游离的mPEG(5000)-O-CH_2-C≡CH流过柱,而任何交联的PEG化的IL-2多肽变体复合物在所需形式后洗脱,所述所需形式含有偶联到一个或多个PEG基团的一个IL-2多肽变体分子。适合的条件随着交联的复合物相对于所需偶联物的相对尺寸而变,并且由本领域普通技术人员容易地确定。将所述含有所需偶联物的洗脱液通过超滤浓缩并通过渗滤脱盐。

[0655] 使用上文概述的洗脱方法可以生产基本上纯化的PEG-IL-2,其中产生的PEG-IL-2具有至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%的纯度水平,特别是至少约75%、80%、85%的纯度水平,更特别是至少约90%的纯度水平、至少约95%的纯度水平、至少约99%或更高的纯度水平,正如通过适合的方法例如SDS/PAGE分析、RP-HPLC、SEC和毛细管电泳所确定的。如有必要,从所述疏水层析获得的PEG化的IL-2多肽可以通过本领域普通技术人员已知的一个或多个程序进一步纯化,所述程序包括但不限于亲和层析、阴离子或阳离子交换层析(使用包括但不限于DEAE SEPHAROSE)、硅胶层析、反相HPLC、凝胶过滤(使用包括但不限于SEPHADEX G-75)、疏水相互作用层析、孔径排阻层析、金属螯合剂层析、超滤/渗滤、乙醇沉淀、硫酸铵沉淀、层析聚焦、置换层析、电泳程序(包括但不限于制备型等电聚焦)、差异溶解性(包括但不限于硫酸铵沉淀)或萃取。表观分子量可以通过GPC,通过与球状蛋白标准品进行比较来估算(Preneta,AZ,《蛋白质纯化方法:实用方法》(PROTEIN PURIFICATION METHODS,A PRACTICAL APPROACH)(Harris&Angal主编),IRL Press 1989,293-306)。IL-2-PEG偶联物的纯度可以通过蛋白水解降解(包括但不限于胰蛋白酶切割),然后进行质谱分析来评估。

Pepinsky RB.等,J.Pharmcol.&Exp.Ther.297(3):1059-66(2001)。

[0656] 连接到本发明的IL-2多肽的氨基酸的水溶性聚合物可以不受限制地进一步衍生化或取代。

[0657] 含叠氮基PEG衍生物

[0658] 在本发明的另一个实施方式中,将IL-2多肽用含有将与非天然编码的氨基酸的侧链上存在的炔基组成部分反应的叠氮基组成部分的PEG衍生物修饰。通常,所述PEG衍生物将具有1-100kDa范围内并且在某些实施方式中10-40kDa范围内的平均分子量。

[0659] 在某些实施方式中,所述叠氮基末端的PEG衍生物具有下述结构:

[0660] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-N_3$

[0661] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m是2-10,并且n是100-1,000(即平均分子量在5-40kDa之间)。

[0662] 在另一个实施方式中,所述叠氮基末端的PEG衍生物具有下述结构:

[0663] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-N_3$

[0664] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m是2-10,p是2-10,并且n是100-1,000(即平均分子量在5-40kDa之间)。

[0665] 在本发明的另一个实施方式中,将包含含炔基氨基酸的IL-2多肽用含有末端叠氮基组成部分的支链PEG衍生物修饰,所述支链PEG的每条链具有10-40kDa范围内并且可以为5-20kDa范围内的MW。例如,在某些实施方式中,所述叠氮基末端的PEG衍生物具有下述结构:

[0666] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_pN_3$

[0667] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m是2-10,p是2-10,n是100-1,000,并且X任选地是O、N、S或羰基(C=O),其在每种情况下可以存在或不存在。

[0668] 含炔基PEG衍生物

[0669] 在本发明的另一个实施方式中,将IL-2多肽用含有将与非天然编码的氨基酸的侧链上存在的叠氮基组成部分反应的炔基组成部分的PEG衍生物修饰。

[0670] 在某些实施方式中,所述炔基末端的PEG衍生物具有下述结构:

[0671] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-C\equiv CH$

[0672] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m是2-10,并且n是100-1,000(即平均分子量在5-40kDa之间)。

[0673] 在本发明的另一个实施方式中,将包含含炔基非天然编码的氨基酸的IL-2多肽用含有利用酰胺键连接到PEG骨架的末端叠氮基或末端炔基组成部分的PEG衍生物修饰。

[0674] 在某些实施方式中,所述炔基末端的PEG衍生物具有下述结构:

[0675] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-C\equiv CH$

[0676] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m是2-10,p是2-10,并且n是100-1,000。

[0677] 在本发明的另一个实施方式中,将包含含叠氮基氨基酸的IL-2多肽用含有末端炔基组成部分的支链PEG衍生物修饰,所述支链PEG的每条链具有10-40kDa范围内并且可以为5-20kDa范围内的MW。例如,在某些实施方式中,所述炔基末端的PEG衍生物具有下述结构:

[0678] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_pC\equiv CH$

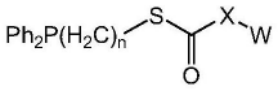
[0679] 其中R是简单烷基(甲基、乙基、丙基等),m是2-10,p是2-10,n是100-1,000,并且X

任选地是O、N、S或羰基(C=O)或不存在。

[0680] 含膦PEG衍生物

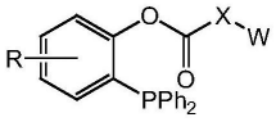
[0681] 在本发明的另一个实施方式中,将IL-2多肽用含有活化的官能团(包括但不限于酯、碳酸酯)并进一步包含将与非天然编码的氨基酸的侧链上的叠氮基组成部分反应的芳基膦基团的PEG衍生物修饰。通常,所述PEG衍生物具有1-100kDa范围内并且在某些实施方式中10-40kDa范围内的平均分子量。

[0682] 在某些实施方式中,所述PEG衍生物具有下述结构:

[0683] 

[0684] 其中n是1-10;X可以是O、N、S或不存在,Ph是苯基,并且W是水溶性聚合物。

[0685] 在某些实施方式中,所述PEG衍生物具有下述结构:

[0686] 

[0687] 其中X可以是O、N、S或不存在,Ph是苯基,W是水溶性聚合物,并且R可以是H、烷基、芳基、取代的烷基和取代的芳基。示例性的R基团包括但不限于-CH_2、-$C(CH_3)_3$、-OR'、-NR'R"、-SR'、-卤素、-C(O)R'、-CONR'R"、-$S(O)_2$R'、-$S(O)_2$NR'R"、-CN和-NO_2。R'、R"、R"'和R""各自独立地是指氢、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的芳基(包括但不限于被1-3个卤素取代的芳基)、取代或未取代的烷基、烷氧基或硫代烷氧基、或者芳烷基。当例如本发明的化合物包括超过一个R基团时,每个所述R基团独立地选择,当存在超过一个R'、R"、R'"和R""基团时,每个这些基团也是如此。当R'和R"被附连到同一个氮原子时,它们可以与所述氮原子组合以形成5、6或7元环。例如,-NR'R"意味着包括但不限于1-吡咯烷基和4-吗啉基。从上述取代基的讨论,本领域技术人员将会理解,术语"烷基"意味着包括包含键合到氢基团之外的其他基团的碳原子的基团,例如卤代烷基(包括但不限于-CF_3和-CH_2CF_3)和酰基(包括但不限于-$C(O)CH_3$、-$C(O)CF_3$、-$C(O)CH_2OCH_3$等)。

[0688] 其他PEG衍生物和通用PEG化技术

[0689] 可以连接到IL-2多肽的其他示例性PEG分子以及PEG化方法包括但不限于在例如下述文献中所描述的:美国专利公布号2004/0001838,2002/0052009,2003/0162949,2004/0013637,2003/0228274,2003/0220447,2003/0158333,2003/0143596,2003/0114647,2003/0105275,2003/0105224,2003/0023023,2002/0156047,2002/0099133,2002/0086939,2002/0082345,2002/0072573,2002/0052430,2002/0040076,2002/0037949,2002/0002250,2001/0056171,2001/0044526,2001/0021763,美国专利号6,646,110,5,824,778,5,476,653,5,219,564,5,629,384,5,736,625,4,902,502,5,281,698,5,122,614,5,473,034,5,516,673,5,382,657,6,552,167,6,610,281,6,515,100,6,461,603,6,436,386,6,214,966,5,990,237,5,900,461,5,739,208,5,672,662,5,446,090,5,808,096,5,612,460,5,324,844,5,252,714,6,420,339,6,201,072,6,451,346,6,306,821,5,559,213,5,747,646,5,834,594,5,849,860,5,980,948,6,004,573,6,129,912,WO 97/32607,EP 229,108,EP 402,378,WO 92/16555,WO 94/04193,WO 94/14758,WO 94/17039,WO 94/18247,WO 94/28024,WO 95/00162,WO 95/11924,WO95/13090,WO 95/33490,WO 96/

00080,WO 97/18832,WO 98/41562,WO 98/48837,WO 99/32134,WO 99/32139,WO 99/32140,WO 96/40791,WO 98/32466,WO 95/06058,EP 439 508,WO 97/03106,WO 96/21469,WO 95/13312,EP 921 131,WO 98/05363,EP 809 996,WO 96/41813,WO 96/07670,EP 605 963,EP 510 356,EP 400 472,EP 183 503和EP 154 316,它们通过引用并入本文。本文中描述的任何PEG分子可以以任何形式使用,包括但不限于单链、支链、多臂链、单官能、双官能、多官能或其任何组合。

[0690] 其他聚合物和PEG衍生物包括但不限于羟胺(氨氧基)PEG衍生物,被描述在全都整体通过引用并入本文的下述专利申请中:美国专利公布号2006/0194256,美国专利公布号2006/0217532,美国专利公布号2006/0217289,美国临时专利号60/755,338,美国临时专利号60/755,711,美国临时专利号60/755,018,国际专利申请号PCT/US06/49397,WO 2006/069246,美国临时专利号60/743,041,美国临时专利号60/743,040,国际专利申请号PCT/US06/47822,美国临时专利号60/882,819,美国临时专利号60/882,500和美国临时专利号60/870,594。

[0691] X.IL-2多肽的糖基化

[0692] 本发明包括并入有一个或多个带有糖残基的非天然编码的氨基酸的IL-2多肽。所述糖残基可以是天然(包括但不限于N-乙酰基葡萄糖胺)或非天然的(包括但不限于3-氟半乳糖)。所述糖可以通过N-或O-连接的糖苷键(包括但不限于N-乙酰基半乳糖-L-丝氨酸)或非天然的键(包括但不限于肟或相应的C-或S-连接的糖苷)连接到所述非天然编码的氨基酸。

[0693] 所述糖(包括但不限于糖基)组成部分可以在体内或体外添加到IL-2多肽。在本发明的某些实施方式中,将包含含羰基非天然编码的氨基酸的IL-2多肽用使用氨氧基衍生化的糖修饰,以产生通过肟键连接的相应的糖基化多肽。一旦附连到所述非天然编码的氨基酸后,所述糖可以通过用糖基转移酶和其他酶的处理进一步精心设计,以产生键合到所述IL-2多肽的寡糖。参见例如H.Liu等,J.Am.Chem.Soc.125:1702-1703(2003)。

[0694] 在本发明的某些实施方式中,将包含含羰基非天然编码的氨基酸的IL-2多肽用被制备成氨氧基衍生物的具有确定结构的聚糖直接修饰。本领域普通技术人员将会认识到,其他官能团(包括叠氮化物、炔、酰肼、肼和氨基脲)可用于将所述糖连接到所述非天然编码的氨基酸。在本发明的某些实施方式中,然后可以将包含含有叠氮基或炔基的非天然编码的氨基酸的IL-2多肽分别用包括但不限于炔基或叠氮基衍生物,通过包括但不限于Huisgen[3+2]环加成反应进行修饰。这种方法允许以极高的选择性修饰蛋白质。

[0695] XI.IL-2二聚体和多聚体

[0696] 本发明还提供了IL-2和IL-2类似物组合例如同二聚体、异二聚体、同多聚体或异多聚体(即三聚体、四聚体等),其中含有一个或多个非天然编码的氨基酸的IL-2被结合到另一个IL-2变体或不是IL-2变体的任何其他多肽,所述结合是直接结合到多肽骨架或通过接头结合。由于与单体相比分子量增加,所述IL-2二聚体或多聚体偶联物可能表现出新的或所需的性质,包括但不限于相对于单体IL-2不同的药理学、药代动力学、药效学性质、调节的治疗半衰期或调节的血浆半衰期。在某些实施方式中,本发明的IL-2二聚体调节IL-2受体的信号转导。在其他实施方式中,本发明的IL-2二聚体或多聚体将充当IL-2受体拮抗剂、激动剂或调节剂。

[0697] 在某些实施方式中，含有IL-2的二聚体或多聚体中存在的一个或多个IL-2分子包含连接到水溶性聚合物的非天然编码的氨基酸。在某些实施方式中，所述IL-2多肽通过包括但不限于Asn-Lys酰胺键或Cys-Cys二硫键直接相连。在某些实施方式中，所述IL-2多肽和/或连接的非IL-2分子包含不同的非天然编码的氨基酸以促进二聚化，包括但不限于第一IL-2多肽的一个非天然编码的氨基酸中的炔基和第二个分子的第二个非天然编码的氨基酸中的叠氮基将通过Huisgen[3+2]环加成被偶联。可选地，包含含酮非天然编码的氨基酸的IL-2和/或连接的非IL-2分子可以被偶联到包含含羟胺非天然编码的氨基酸的第二多肽，并且所述多肽通过相应的肟的形成进行反应。

[0698] 可选地，所述两个IL-2多肽和/或连接的非IL-2分子通过接头相连。可以使用任何异或同双官能接头来连接所述两个可以具有相同或不同的一级序列的分子和/或连接的非IL-2分子。在某些情况下，所述用于将所述IL-2和/或连接的非IL-2分子拴系在一起的接头可以是双官能PEG试剂。所述接头可以具有广范围的分子量或分子长度。更大或更小分子量的接头可用于提供IL-2与所述连接的实体之间或IL-2与其受体之间或如果有的话所述连接的实体与其结合配偶体之间的所需空间关系或构象。具有更长或更短的分子长度的接头也可用于提供IL-2与所述连接的实体之间或如果有的话所述连接的实体与其结合配偶体之间的所需空间或柔性。

[0699] 在某些实施方式中，本发明提供了具有哑铃结构的水溶性双官能接头，其包括：a)在聚合物骨架的至少第一末端上的含有叠氮化物、炔、肼、酰肼、羟胺或羰基的组成部分；和b)在所述聚合物骨架的第二末端上的至少一个第二官能团。所述第二官能团可以与所述第一官能团相同或不同。在某些实施方式中，所述第二官能团与所述第一官能团没有反应性。在某些实施方式中，本发明提供了水溶性化合物，其包含支链分子结构的至少一个臂。例如，所述支链分子结构可以是树枝状的。

[0700] 在某些实施方式中，本发明提供了包含一个或多个IL-2多肽的多聚体，其通过与具有下述结构的水溶性活化聚合物的反应来形成：

[0701] $R-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X$

[0702] 其中n是约5至3,000，m是2-10，X可以是含有叠氮化物、炔、肼、酰肼、氨氧基、羟胺、乙酰基或羰基的组成部分，并且R是可以与X相同或不同的封端基团、官能团或离去基团。R可以是例如选自羟基、保护的羟基、烷氧基、N-羟基琥珀酰亚胺基酯、1-苯并三唑基酯、N-羟基琥珀酰亚胺基碳酸酯、1-苯并三唑基碳酸酯、缩醛、醛、醛水合物、烯基、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺、活性砜、胺、氨氧基、保护的胺、酰肼、保护的酰肼、保护的硫醇、羧酸、保护的羧酸、异氰酸酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、乙烯基砜、二硫代吡啶、乙烯基吡啶、碘乙酰胺、环氧化物、乙二醛、二酮、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、三苯甲酸酯、烯烃和酮的官能团。

[0703] XII.IL-2多肽活性和IL-2多肽对IL-2受体的亲和性的测量

[0704] IL-2多肽活性可以使用标准的或已知的体外或体内测定法来确定。PEG-IL-2可以通过本领域中已知的适合的方法来分析生物活性。这些测定法包括但不限于IL-2响应性基因的活化、受体结合测定法、抗病毒活性测定法、细胞病理效应抑制测定法、抗增殖测定法、免疫调节测定法和监测MHC分子的诱导的测定法。

[0705] 可以分析PEG-IL-2多肽激活IL-2敏感性信号转导途径的能力。一个实例是干扰素刺激的响应元件(ISRE)测定法。将组成性表达IL-2受体的细胞用ISRE-萤光素酶载体

(pISRE-luc,Clontech)瞬时转染。在转染后,将所述细胞用IL-2多肽处理。测试了许多蛋白浓度例如0.0001-10ng/mL,以产生剂量响应曲线。如果所述IL-2多肽结合并活化IL-2受体,则得到的信号转导级联诱导萤光素酶表达。发光可以以大量方式测量,例如通过使用TopCount™或Fusion™微孔板读板器和Steady-Glo®萤光素酶测定系统(Promega)。

[0706] 可以分析IL-2多肽结合到IL-2受体的能力。对于包含非天然氨基酸的未PEG化或PEG化的IL-2多肽来说,IL-2对其受体的亲和性可以使用BIAcore™生物传感器(Pharmacia)来测量。适合的结合测定法包括但不限于BIAcore测定法(Pearce等,Biochemistry 38:81-89(1999))和AScreen™测定法(PerkinElmer)。

[0707] 不论使用何种方法产生IL-2多肽,都对所述IL-2多肽进行生物活性测定。通常,用于生物活性的试验应该提供所需结果的分析,例如生物活性的提高或降低(与修饰的IL-2相比)、不同的生物活性(与修饰的IL-2相比)、受体或结合配偶体亲和性分析、IL-2本身或其受体的构象或结构变化(与修饰的IL-2相比)或血清半衰期分析。

[0708] XIII.效力、功能性体内半衰期和药代动力学参数的测量

[0709] 本发明的一个重要方面是通过构建偶联有或不偶联有水溶性聚合物组成部分的IL-2多肽来获得延长的生物半衰期。IL-2多肽血清浓度在给药后的快速下降,使得评估对使用偶联和非偶联的IL-2多肽及其变体的治疗的生物学响应变得重要。本发明的偶联和非偶联的IL-2多肽及其变体在给药例如通过皮下或i.v.给药后也可能具有延长的血清半衰期,使得通过例如ELISA方法或通过初筛测定法进行测量成为可能。可以使用来自于商业化来源例如Invitrogen(Carlsbad,CA)的ELISA或RIA试剂盒。体内生物半衰期的测量如本文中所述来进行。

[0710] 包含非天然编码的氨基酸的IL-2多肽的效力和功能性体内半衰期可以按照本领域普通技术人员已知的方案来确定。

[0711] 包含非天然编码的氨基酸的IL-2多肽的药代动力学参数可以在正常的Sprague-Dawley雄性大鼠中评估(每个治疗组N=5只动物)。动物接收25ug/大鼠iv或50ug/大鼠sc的单剂量,并根据预先确定的时间过程获取大约5-7个血液样品,所述时间过程通常覆盖对于未偶联到水溶性聚合物的包含非天然编码的氨基酸的IL-2多肽来说的约6小时到对于包含非天然编码的氨基酸并偶联到水溶性聚合物的IL-2多肽来说的约4天。可以将不含非天然编码的氨基酸的IL-2的药代动力学数据与为包含非天然编码的氨基酸的IL-2多肽获得的数据进行直接比较。

[0712] XIV.给药和药物组合物

[0713] 本发明的多肽或蛋白质(包括但不限于IL-2、合成酶、包含一个或多个非天然氨基酸的蛋白质等)任选地用于治疗性用途,包括但不限于与适合的药物载体相组合。这些组合物包含例如治疗有效量的所述化合物和可药用载体或赋形剂。这种载体或赋形剂包括但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇和/或其组合。制造制剂以适合于给药方式。总的来说,给药蛋白质的方法对于本领域普通技术人员来说是已知的,并且可以应用于本发明的多肽的给药。组合物可以采取水溶性形式,例如作为可药用盐存在,这意味着包括酸和碱加成盐两者。

[0714] 包含本发明的一种或多种多肽的治疗性组合物任选地按照本领域普通技术人员已知的方法在一种或多种适合的体外和/或体内疾病动物模型中试验,以确认功效、组织代

谢并估算剂量。具体来说，剂量最初可以通过本文中的非天然多肽与天然氨基酸同源物的活性、稳定性或其他适合的度量的比较(包括但不限于被修饰成包括一个或多个非天然氨基酸的IL-2多肽与天然氨基酸IL-2多肽的比较和被修饰成包括一个或多个非天然氨基酸的IL-2多肽与目前可用的IL-2治疗的比较)，即在相关测定法中确定。

[0715] 给药通过常用于引入分子以最终与血液或组织细胞接触的任何途径来进行。本发明的非天然氨基酸多肽以任何适合的方式，任选地与一种或多种可药用载体一起给药。在本发明的情形中将这些多肽给药到患者的适合的方法是可用的，并且尽管超过一种途径可用于给药特定组合物，但特定途径通常可以提供比另一种途径更加即时且更加有效的作用或反应。

[0716] 可药用载体部分由待给药的具体组合物并由给药所述组合物的具体方法决定。因此，本发明的药物组合物存在广泛种类的适合制剂。

[0717] 本发明的IL-2多肽可以通过适合于蛋白质或肽的任何常规途径给药，包括但不限于肠胃外，例如注射，包括但不限于皮下或静脉内或任何其他形式的注射或输注。多肽组合物可以通过多种途径(包括但不限于口服、静脉内、腹膜内、肌肉内、透皮、皮下、局部、舌下或直肠方式)给药。包含修饰或未修饰的非天然氨基酸多肽的组合物也可以通过脂质体给药。这些给药途径和适合的制剂对于本领域技术人员来说是公知的。IL-2多肽可以单独地或与其他适合的组分例如药物载体相组合使用。IL-2多肽可以与其他药剂或治疗剂相组合使用。

[0718] 单独或与其他适合的组分相组合的包含非天然氨基酸的IL-2多肽，也可以被制造成气溶胶制剂(即它们可以被“雾化”)以通过吸入给药。气溶胶制剂可以被放置在可接受的加压的推进剂例如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等中。

[0719] 适合于肠胃外给药例如通过关节内、静脉内、肌肉内、真皮内、腹膜内和皮下途径给药的制剂包括水性和非水性等渗无菌注射溶液，其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和向制剂赋予与目标接受者的血液等渗的溶质，还包括水性和非水性无菌悬液，其可以包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。IL-2的制剂可以存在于单剂量或多剂量密封容器例如安瓿和小管中。

[0720] 肠胃外给药和静脉内给药是优选的给药方法。具体来说，已经用于天然氨基酸同源物治疗剂的给药途径(包括但不限于常用于EPO、GH、G-CSF、GM-CSF、IFN例如IL-2、白介素、抗体、FGF和/或任何其他药物递送的蛋白质的给药途径)以及目前正在使用的制剂，为本发明的多肽提供了优选的给药途径和制剂。

[0721] 在本发明的情形中，给药到患者的剂量足以随时间在所述患者中获得有益的治疗响应或其他适合的活性，这取决于应用。所述剂量由特定载体或制剂的功效、使用的非天然氨基酸多肽的活性、稳定性或血清半衰期、患者的状况以及待治疗的患者的体重或表面积决定。剂量的大小也由特定患者中与特定载体、制剂等的给药相伴的任何不良副作用的存在、本质和程度决定。

[0722] 在将在疾病(包括但不限于中性粒细胞减少症、再生障碍性贫血、周期性中性粒细胞减少症、特发性中性粒细胞减少症、Chdiak-Higashi综合征、系统性红斑狼疮(SLE)、白血病、骨髓增生异常综合征和骨髓纤维化等)的治疗或预防中给药的载体或制剂的有效量的确定中，医生们评估循环血浆水平、制剂毒性、疾病进展和/或在相关时抗非天然氨基酸多

肽抗体的产生。

[0723] 给药到例如70千克的患者的剂量通常在与常用治疗性蛋白的剂量等效的范围内，并根据相关组合物的改变的活性或血清半衰期进行调整。本发明的载体或药物制剂可以通过任何已知的常规疗法(包括抗体给药，疫苗给药，细胞毒性药剂、天然氨基酸多肽、核酸、核苷酸类似物、生物响应改良剂等的给药)来补充治疗条件。

[0724] 对于给药来说，本发明的制剂以一定速率给药，所述速率由相关制剂的LD-50或ED-50和/或非天然氨基酸多肽在各种不同浓度下的任何副作用的观察决定，包括但不限于适用于所述患者的体重和总体健康。给药可以通过单剂量或分剂量来完成。

[0725] 如果经历制剂输注的患者发生发热、寒战或肌肉疼痛，则他/她接受适合剂量的阿司匹林、布洛芬、对乙酰氨基酚或其他控制疼痛/发热的药物。经历对输注的反应例如发热、肌肉疼痛和寒战的患者在将来的输注之前30分钟预先给药阿司匹林、对乙酰氨基酚或包括但不限于苯拉海明。哌替啶被用于对退烧药和抗组胺药没有快速响应的更严重的寒战和肌肉疼痛。根据所述反应的严重性减缓或中断细胞输注。

[0726] 本发明的人类IL-2多肽可以直接给药到哺乳动物对象。给药通过常用于将IL-2多肽引入到对象的任何途径来进行。根据本发明的实施方式所述的IL-2多肽组合物包括适合于口服、直肠、局部、吸入(包括但不限于通过气溶胶)、颊(包括但不限于舌下)、阴道、肠胃外(包括但不限于皮下、肌肉内、真皮内、关节内、胸膜内、腹膜内、脑内、动脉内或静脉内)、局部(及皮肤和粘膜表面两者，包括气道表面)、肺、眼内、鼻内和透皮给药的组合物，尽管在任何给定情况下最适合的途径取决于待治疗的病症的本质和严重性。给药可以是局部或全身性的。化合物的制剂可以存在于单剂量或多剂量密封容器例如安瓿和小管中。本发明的IL-2多肽可以以单位剂量注射形式用可药用载体制备成混合物(包括但不限于溶液、悬液或乳液)。本发明的IL-2多肽也可以通过连续输注(使用包括但不限于小型泵例如渗透泵)、单次快速浓注或缓慢释放储库制剂来给药。

[0727] 适合于给药的制剂包括水性和非水性溶液，可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和向制剂赋予等渗的溶质的等渗无菌溶液，以及可以包含悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂的水性和非水性无菌悬液。溶液和悬液可以从以前描述的种类的无菌粉剂、颗粒剂和片剂制备。

[0728] 冷冻干燥是一种用于呈现蛋白质的常用技术，其用于从感兴趣的蛋白质制备物中除去水。冷冻干燥或冻干是将待干燥的材料首先冷冻，然后在真空环境中通过升华除去冰或冷冻的溶剂的过程。在冻干前的制剂中可以包括赋形剂，以提高冷冻干燥过程中的稳定性和/或提高冻干产品在储存后的稳定性。Pikal,M.Biopharm.3(9)26-30(1990)和Arakawa等,Pharm.Res.8(3):285-291(1991)。

[0729] 药物的喷雾干燥对于本领域普通技术人员来说也是已知的。例如参见Broadhead,J.等,药物的喷雾干燥(The Spray Drying of Pharmaceuticals),Drug Dev.Ind.Pharm,18(11&12),1169-1206(1992)。除了小分子药物之外，各种不同的生物材料已被喷雾干燥，它们包括:酶，血清，血浆，微生物和酵母。喷雾干燥是一种有用的技术，因为它可以在一步过程中将液体药物制剂转变成细小、无尘或团聚的粉末。基本技术包括下述四个步骤:a)进料溶液雾化成喷雾剂;b)喷雾剂-空气接触;c)喷雾剂的干燥;和d)干燥的产物与干燥空气的分离。通过引用并入本文的美国专利号6,235,710和6,001,800描述了通过喷雾干燥制备

重组促红细胞生成素。

[0730] 本发明的药物组合物和制剂可以包含可药用载体、赋形剂或稳定剂。可药用载体部分由待给药的具体组合物以及由用于给药所述组合物的具体方法决定。因此，本发明的药物组合物存在广泛种类的适合制剂(包括任选的可药用载体、赋形剂或稳定剂)(参见例如《Remington制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)，第17版，1985)。

[0731] 适合的载体包括但不限于缓冲剂，包括琥珀酸盐、磷酸盐、硼酸盐、HEPES、柠檬酸盐、组氨酸、咪唑、乙酸盐、碳酸氢盐和其他有机酸；抗氧化剂，包括但不限于抗坏血酸；低分子量多肽，包括但不限于小于约10个残基的多肽；蛋白质，包括但不限于血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，包括但不限于甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸、组氨酸或组氨酸衍生物、甲硫氨酸、谷氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他糖类，包括但不限于海藻糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，包括但不限于EDTA和乙二胺四乙酸二钠；二价金属离子，包括但不限于锌、钴或铜；糖醇，包括但不限于甘露糖醇或山梨糖醇；成盐平衡离子，包括但不限于钠和氯化钠；填充剂例如微晶体纤维素、乳糖、玉米和其他淀粉；粘合剂；甜味剂和其他调味剂；着色剂；和/或非离子型表面活性剂，包括但不限于Tween™(包括但不限于Tween 80(聚山梨醇酯80)和Tween 20(聚山梨醇酯20)、Pluronics™和其他普朗尼克酸(包括但不限于普朗尼克酸F68(泊洛沙姆188))或PEG。适合的表面活性剂包括例如但不限于基于聚氧化乙烯-聚氧化丙烯-聚氧化乙烯即(PEO-PPO-PEO)或聚氧化丙烯-聚氧化乙烯-聚氧化丙烯即(PPO-PEO-PPO)的聚醚或其组合。PEO-PPO-PEO和PPO-PEO-PPO可以在商品名Pluronics™、R-Pluronics™、Tetronics™和R-Tetronics™下商购(BASF Wyandotte Corp.,Wyandotte,Mich.)，并且被进一步描述在整体通过引用并入本文的美国专利号4,820,352中。其他乙烯/聚丙烯嵌段聚合物可能是适合的表面活性剂。表面活性剂或表面活性剂的组合可用于使PEG化的IL-2针对一种或多种胁迫(包括但不限于由搅动引起的胁迫)稳定。某些上述物质可以被称为“增量剂”。某些物质也可以被称为“张力调节剂”。抗微生物防腐剂也可用于获得产品稳定性和抗微生物有效性；适合的防腐剂包括但不限于苯甲醇、苯扎氯铵、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯/丙酯、甲酚和苯酚或其组合。通过引用并入本文的美国专利号7,144,574描述了可能适合于本发明的药物组合物和制剂和其他递送制剂的其他材料。

[0732] 本发明的IL-2多肽，包括连接到水溶性聚合物例如PEG的IL-2多肽，也可以通过持续释放系统或作为其一部分给药。持续释放组合物包括包括但不限于采取塑形制品形式的半透性聚合物基质，包括但不限于薄膜或微胶囊。持续释放基质包括来自于生物相容材料例如聚(甲基丙烯酸2-羟基乙基酯)(Langer等，J.Biomed.Mater.Res.,15:267-277(1981)；Langer,Chem.Tech.,12:98-105(1982))、乙烯-乙酸乙烯酯(Langer等，同上)或聚D-(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988)、聚丙交酯(聚乳酸)(美国专利号3,773,919;EP 58,481)、聚乙交酯(乙醇酸的聚合物)、聚丙交酯-共-乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)、聚酸酐、L-谷氨酸和γ-乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman等，BioPolymers,22,547-556(1983))、聚原酸酯、多肽、透明质酸、胶原蛋白、硫酸软骨素、羧酸、脂肪酸、磷脂、多糖、核酸、聚氨基酸、氨基酸例如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、多核苷酸、聚乙烯基丙烯、聚乙烯吡咯烷酮和硅酮。持续释放组合物还包括脂质体包裹的化合物。含有化合物的脂质体通过本身已知的方法来制备：DE 3,218,121;Eppstein等，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,82:3688-3692(1985)；Hwang等，

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,77:4030-4034(1980);EP 52,322;EP 36,676;美国专利号4,619,794;EP 143,949;美国专利号5,021,234;日本专利申请83-118008;美国专利号4,485,045和4,544,545;和EP 102,324。引用的所有参考文献和专利通过引用并入本文。

[0733] 脂质体包裹的IL-2多肽可以通过例如下述文献中描述的方法来制备:DE 3,218,121;Eppstein等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,82:3688-3692(1985);Hwang等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,77:4030-4034(1980);EP 52,322;EP 36,676;美国专利号4,619,794;EP 143,949;美国专利号5,021,234;日本专利申请83-118008;美国专利号4,485,045和4,544,545;和EP 102,324。脂质体的组成和大小是公知的,或者能够由本领域普通技术人员凭经验容易地确定。脂质体的一些实例描述在例如下述文献中:Park JW等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:1327-1331(1995);Lasic D和Papahadjopoulos D主编,《脂质体的医学应用》(MEDICAL APPLICATIONS OF LIPOSOMES)(1998);Drummond DC等,用于癌症疗法的脂质体药物递送系统(Liposomal drug delivery systems for cancer therapy),Teicher B主编,《癌症药物发现与开发》(CANCER DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT)(2002);Park JW等,Clin.Cancer Res.8:1172-1181(2002);Nielsen UB等,Biochim.Biophys.Acta 1591(1-3):109-118(2002);Mamot C等,Cancer Res.63:3154-3161(2003)。引用的所有参考文献和专利通过引用并入本文。

[0734] 在本发明的情形中,给药到患者的剂量应该足以随时间在所述对象中引起有益响应。通常,每剂肠胃外给药的本发明的IL-2多肽的总治疗有效量在每天约0.01μg/kg至约100μg/kg或约0.05mg/kg至约1mg/kg患者体重的范围内,尽管这取决于治疗判断。在这个实施方式的特定情况下,所述偶联物可以以每天大于4μ/kg至每天约20μg/kg的范围内的剂量给药。在其他情况下,所述偶联物可以以每天大于4μg/kg至每天约9μg/kg的范围内的剂量给药。在其他情况下,所述偶联物可以以每天约4μg/kg至每天约12.5μg/kg的范围内的剂量给药。在特定情况下,所述偶联物可以以等于或低于没有过度毒性的耐受的最高剂量的剂量给药。此外,所述偶联物可以每周给药至少两次,或者所述偶联物可以每周给药至少三次、每周至少四次、每周至少五次、每周至少六次或每周七次。在特定情况下,在所述偶联物给药超过一次的情况下,所述偶联物可以以每天每次大于4μg/kg的剂量给药。具体来说,所述偶联物可以在两周或更长的时间内给药。在某些情况下,与参比样品、即不与本发明的偶联物接触的细胞的样品相比,表达白介素-2受体的细胞的生长可以被抑制至少50%、至少65%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%。在这个实施方式的特定情况下,所述偶联物可以以每天约5.3μg/kg的剂量或以每天约7.1μg/kg的剂量或以每天约9.4μg/kg的剂量或以每天约12.5μg/kg的剂量给药。给药的频率也取决于治疗判断,并且与被批准用于人类的可商购的IL-2多肽产品相比可以更加频繁或更不频繁。通常,本发明的IL-2多肽、PEG化的IL-2多肽、偶联的IL-2多肽或PEG化的偶联的IL-2多肽可以通过上述的任何给药途径来给药。

[0735] XV.本发明的IL-2多肽的治疗性用途

[0736] 本发明的IL-2多肽可用于治疗广范围的障碍。本发明还包括有风险、正患有和/或已患有对IL-2、CD8+T-细胞刺激和/或IL-2制剂具有响应性的癌症的哺乳动物的治疗方法。IL-2多肽的给药可以对观察的几种临床参数产生短期效果,即,即时的有益效果,这可以是从给药起12或24小时,并且另一方面,也可能产生长期效果,有益地减缓肿瘤生长的进展,

减小肿瘤尺寸和/或提高循环CD8+T细胞水平，并且本发明的IL-2多肽可以通过本领域技术人员已知的任何手段来给药，并且可以有利地通过输注，例如以足以获得所需药理效果的剂量通过动脉、腹膜内或静脉内注射和/或输注来给药。

[0737] 所述IL-2多肽的剂量可以在每次治疗每kg体重10-200mg或40-80mg IL-2多肽的范围内。例如，给药的IL-2多肽的剂量可以是每kg体重约20-100mg IL-2多肽，作为快速浓注和/或作为临床上必要的时间长度例如从几分钟至几小时例如最长24小时时间段的输注来提供。如有必要，所述IL-2多肽给药可以重复一次或几次。IL-2多肽的给药可以与其他药剂例如化学治疗剂的给药相组合。此外，本发明涉及一种预防和/或治疗癌症的方法，所述方法包括向需要的对象给药有效量的IL-2多肽。

[0738] 所述IL-2的平均量可以改变，并且具体来说应该基于合格医师的推荐意见和处方。IL-2的准确量是偏好性问题，取决于诸如待治疗病症的准确类型、待治疗患者的状况以及组合物中的其他成分等因素。本发明还提供了治疗有效量的另一种活性药剂的给药。待给药的量可以由本领域普通技术人员根据使用IL-2的疗法容易地确定。

实施例

[0739] 提供了下述实施例以说明但不是限制所要求保护的发明。

[0740] 实施例1-IL-2中待突变成琥珀终止密码子以并入非天然氨基酸的残基位置的确定

[0741] IL-2已被用于治疗几种癌症例如肾细胞癌和转移黑素瘤。可商购的IL-2 Aldesleukin®是一种重组蛋白，其未被糖基化，已除去丙氨酸-1并且用丝氨酸-125替换了残基半胱氨酸-125(Whittington等，Drugs，46(3):pp:446-514(1993))。尽管IL-2是癌症治疗中最早被FDA批准的细胞因子，但已显示IL-2在以高剂量使用时表现出严重副作用。这极大限制了它在潜在患者上的应用。所述严重副作用的根本机制已被归因于IL-2与其受体之一IL-2Rα的结合。通常，当包括IL-2Rα(或CD25)、IL-2Rβ(或CD122)和IL-2Rγ(或CD132)的所有三种受体都存在于组织中时，IL-2不仅可以与这些受体形成异三聚体复合物，而且可以与IL-2Rβ和IL-2Rγ形成异二聚体复合物。在临床背景中，当使用高剂量IL-2时，IL-2开始结合IL-2αβγ，这是T_{reg}细胞中的主要受体形式。T_{reg}细胞的抑制性效应引起IL-2在癌症免疫疗法中的应用的不想要的效应。为了减轻IL-2的副作用，以前已使用过许多方法。主要突破之一是来自于Nektar的发明，其使用6个PEG化的赖氨酸来掩蔽IL-2表面上的IL2Rα结合区(Charych等，Clin Cancer Res，22(3):pp:680-90(2016))。PEG化的IL-2不仅具有延长的半衰期，而且显示出急剧降低的副作用。然而，来自于活性研究的结果显示，在这种非均质6-PEG化的IL-2混合物中PEG化的IL-2的有效形式是仅仅单PEG化的形式。因此，需要具有均质产物的更有效的PEG化的IL-2。

[0742] 在本申请中，并入的非天然氨基酸提供了在IL-2PEG化中使用的独特偶联位点。得到的PEG化的IL-2突变蛋白质具有均质产物而不是以前来自于Nektar的非均质的6-PEG化的IL-2。

[0743] 在产生IL-2突变蛋白质中使用的位点可以通过分析IL-2及其异三聚体受体的现有晶体结构来选择。具体来说，IL-2Rα及其与IL-2的界面的结构已被详细调查(图1)。所述界面被分成包含疏水中心和极化区的两个区域。所述疏水中心在IL-2Rα残基Leu-2^{α}、Met-

25$^{\alpha}$、Leu-42$^{\alpha}$和Tyr-43$^{\alpha}$与IL-2残基Phe-42^{IL-2}、Phe-44^{IL-2}、Tyr-45^{IL-2}、Pro-65^{IL-2}和Leu-72^{IL-2}之间形成。所述极化区在IL-2Rα和IL-2的5个离子对(包括Lys-38$^{\alpha}$/Glu-61^{IL-2}、Arg-36$^{\alpha}$/Glu-62^{IL-2}、Glu-1$^{\alpha}$/Lys-35^{IL-2}、Asp-6$^{\alpha}$/Arg-38^{IL-2}和Glu-29$^{\alpha}$/Lys-43^{IL-2})之间形成。此外,静电作图表明某些其他残基可能在介导IL-2Rα与IL-2之间的相互作用中发挥作用。这些残基是Thr-37^{IL-2}、Thre-41^{IL-2}、Lys-64^{IL-2}、Glu-68^{IL-2}和Tyr-107^{IL-2}。因此,可以使用的位点是Phe-42^{IL-2}、Phe-44^{IL-2}、Tyr-45^{IL-2}、Pro-65^{IL-2}、Leu-72^{IL-2}、Glu-61^{IL-2}、Glu-62^{IL-2}、Lys-35^{IL-2}、Arg-38^{IL-2}、Lys-43^{IL-2}、Thr-37^{IL-2}、Thr-3^{IL-2}、Lys-64^{IL-2}、Glu-68^{IL-2}和Tyr-107^{IL-2}。用于生产具有非天然氨基酸的突变蛋白质的蛋白质序列的名单列于下面的表2中:

[0744] 表2.具有在PEG化中使用的潜在位点的IL-2蛋白序列

[0745]

SEQ ID. NO	残 基 位置	具有并入的非天然氨基酸的蛋白质序列
9	F42	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLT*UKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
10	F44	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFK*UYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
11	Y45	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKF*UMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[0746]

12	P65	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELK*ULEEVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
13	L72	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN *UAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
14	E61	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLE*UELKPLEEVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
15	E62	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE*ULKPLEUVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
16	K35	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP*U LTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
17	R38	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL T*UMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
18	K43	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTF*UFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
19	T37	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL *URMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL

[0747]

		NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
20	T3	AP*USSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPK LTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
21	K64	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEL*UPLEEVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
22	E68	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLE*UVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
23	Y107	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCE* UADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[0748] *U:非天然氨基酸

[0749] 实施例2:人类IL-2表达系统

[0750] 本节描述了用于包含非天然氨基酸的IL-2多肽的表达方法。将宿主细胞用正交tRNA、正交氨酰基tRNA合成酶和包含选择器密码子的如SEQ ID NO:4、6或8中所示的编码IL-2多肽的多核苷酸或编码SEQ ID NO:1、2、3、5、7和9至23中所示的氨基酸序列的多核苷酸的构建物转化。

[0751] 大肠杆菌表达载体构建和序列验证:本实施例详述了包括非天然编码的氨基酸的人类IL-2(hIL-2)在大肠杆菌中的克隆和表达。所有人类IL-2表达质粒如下所述通过基于重组的克隆方法使用Gibson组装试剂盒(New England Biolabs(NEB),Ipswich,MA)或使用QuikChange诱变试剂盒(Agilent Technologies,Santa Clara,CA),在大肠杆菌NEB5α克隆菌株(New England Biolabs,MA)中构建。所述大肠杆菌表达质粒示出在图2中。

[0752] Gibson组装:用于扩增含有供体片段的各种不同的感兴趣基因(GOI)的引物在它们的5'-端具有约18-24个碱基对(bp)的与受体载体序列交叠的序列用于同源重组,并且在Integrated DNA Technologies(IDT)(San Diego,CA)合成。所述PCR片段使用高保真DNA聚合酶混合物Pfu Ultra II Hotstart PCR主混合物(目录号600852,Agilent Technologies)来扩增。将PCR产物用Dpn1限制性酶(NEB#R0176L)在37℃消化2小时以除去

质粒背景，然后使用Qiagen PCR柱纯化试剂盒(Qiagen,Valencia,CA;#28104)进行柱纯化，并通过Nanodrop(ThermoFisher,Carlsbad,CA)定量。将受体载体通过用所述载体内独有的限制性酶(NEB,MA)在供应商推荐的温度下消化3至5小时进行线性化，PCR柱纯化并定量。将供体插入片段和适合制备的受体载体以3:1的摩尔比混合，使用Gibson组装试剂盒(NEB#E2611S)在50℃温育15min，然后用于转化到大肠杆菌NEB5α菌株(NEB#2987)中。

[0753] 重组体通过将Gibson组装混合物在含有适合的抗生素的LB琼脂板上铺板来回收。第二天，将4至6个良好分离的单菌落接种到5mL LB+50μg/mL硫酸卡那霉素(Sigma,St Louis,MO;cat#K0254)培养基中，并在37℃生长过夜。使用Qiagen质粒DNA小量制备试剂盒(Qiagen#27104)分离重组质粒，并通过DNA测序(Eton Biosciences,San Diego,CA)验证。完整GOI区加上100bp上游和100bp下游序列使用基因特异性测序引物来验证。

[0754] QuickChange诱变(QCM)：所有含有TAG终止密码子的琥珀变体使用QuickChange Lightning定点诱变试剂盒(Agilent Technologies#201519)来产生。所有QCM寡核苷酸使用QuickChange Web Portal(Agilent Technologies)来设计，并从IDT(San Diego,CA)订购。QCM PCR混合物含有5μl 10x缓冲液，2.5μl dNTP混合物，1μl(100ng)质粒模板，1μl寡聚物混合物(各10uM浓度)，1μl QuickChange Lightning酶，2.5μl Quick溶液和37μl蒸馏水(DW)。所述DNA使用试剂盒推荐的PCR程序扩增仅仅18个循环。

[0755] 在PCR反应完成后，将混合物用伴随试剂盒(Agilent Technologies)而来的DpnI酶在37℃消化2-3小时，并在凝胶上运行以检查扩增的PCR产物的存在。随后，将2.5至5μl PCR产物转化到大肠杆菌NEB5α菌株中。然后分离来自于4至6个菌落的重组质粒，并如在上文Gibson组装部分中所述进行序列验证。

[0756] 表达菌株(AXID)构建和验证：为了制备AXID生产菌株，将化学感受态大肠杆菌W3110B60宿主细胞用序列验证的质粒DNA(50ng)转化，重组细胞在含有50μg/mL硫酸卡那霉素(Sigma,cat#K0254)的2xYT+1％葡萄糖琼脂板上选择，并在37℃温育过夜。然后将来自于新鲜转化平板的单菌落在含有50μg/mL硫酸卡那霉素的2xYT+1％葡萄糖琼脂板上，通过连续三次划线并在37℃温育过夜来繁殖三次。最后，将来自于第三次划线平板的单菌落接种在含有50μg/mL硫酸卡那霉素(Sigma,cat#K0254)的20mL Super Broth(Fisher-Optigrow™,#BP1432-10B1)中，并在37℃和250rpm下温育过夜。然后将生长过夜的培养物用甘油稀释到最终甘油浓度为20％(w/v)(KIC,Ref#67790-GL99UK)。然后将该细胞悬液分配成1mL等分试样，置于几个冷冻管中并在-80℃冷冻，作为AXID生产菌株管。

[0757] 在如上所述产生AXID生产菌株的甘油管后，将它们通过DNA测序和抗生素抗性标记的表型表征进一步验证。为了确认AXID生产菌株管具有在生产宿主中的正确质粒，对质粒进行序列验证。将含有50μg/mL硫酸卡那霉素的20mL LB用来自于AXID克隆的甘油管的穿刺物接种，并在37℃和250rpm下生长过夜。使用Qiagen小量制备试剂盒(#27104)分离质粒DNA，并通过DNA测序(Eton Biosciences,CA)确认所述分离的质粒中存在完整的GOI ORF。

[0758] 为了进一步验证所述AXID生产菌株的菌株基因型，将来自于同一个管的细胞在4个独立的LB平板上划线：含有50ug/mL硫酸卡那霉素的LB，含有15ug/mL四环素的LB，含有34ug/mL氯霉素的LB和含有75ug/mL甲氧苄啶的LB。然后检查它们在所有这些平板上的阳性生长，正如对W3110B60生产宿主菌株的菌株基因型所预期的。

[0759] 表达系统：hIL-2的氨基酸序列和编码hIL-2的大肠杆菌密码子优化的DNA序列示

出在表1和2中。包含正交tRNA(O-tRNA)和正交氨酰基tRNA合成酶(O-RS)的引入的翻译系统被用于表达含有非天然编码的氨基酸的hIL-2(参见质粒图谱pKG0269;图2)。所述O-RS优先用非天然编码的氨基酸将所述O-tRNA氨酰化。进而,所述翻译系统对编码的选择器密码子做出响应将所述非天然编码的氨基酸插入到IL-2或IL-2变体中。适合的O-RS和O-tRNA序列描述在题为"氨酰基-tRNA合成酶组合物及其用途"(Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof)的WO2006/068802和题为"tRNA的组合物及其用途"(Compositions of tRNA and Uses Thereof)的WO2007/021297中,所述专利申请整体通过引用并入本文。

[0760] 用含有所述修饰的IL-2变体多核苷酸序列和正交氨酰基tRNA合成酶/tRNA对(特异性针对所需非天然编码的氨基酸)的质粒转化大肠杆菌,允许将非天然编码的氨基酸位点特异性并入到所述IL-2多肽中。IL-2变体多肽的表达在T7启动子的控制之下,并通过在培养基中添加阿拉伯糖来诱导(参见质粒图谱pKG0269;图2)。

[0761] 使用对乙酰基-苯丙氨酸(pAF)的抑制:将用于表达IL-2多肽的质粒转化到W3110B60大肠杆菌细胞中。向所述细胞添加对乙酰基-苯丙氨酸(pAF),并通过添加阿拉伯糖来诱导蛋白质表达。进行IL-2多肽的表达的SDS-PAGE分析,并观察所述IL-2多肽。运行了多个泳道,用于原始的野生型IL-2多肽与pAF替换的IL-2多肽之间的比较,后者是具有在特定氨基酸残基处制造的例如对乙酰基苯丙氨酸替换的IL-2。T7聚合酶的表达在阿拉伯糖可诱导的T7噬菌体启动子的控制之下。向所述细胞添加对乙酰基-苯丙氨酸(pAF),并通过添加阿拉伯糖(最终0.2%)来诱导蛋白质表达。将培养物在37℃温育几小时(3 -5小时)。

[0762] 用于在大肠杆菌中提高hIL-2表达的其他构建物:为了提高hIL-2在大肠杆菌中的生产,除了本文中报告的在大肠杆菌密码子用法的基础上的DNA序列优化之外,可以进一步优化下述表达参数:测试除了T7噬菌体启动子之外的不同启动子,例如阿拉伯糖B(araB)、pTrc和噬菌体T5启动子;hIL-2mRNA的稳定化;除了标准的W3110B60菌株之外的不同大肠杆菌宿主菌株的筛选;生产过程参数优化例如温度、培养基、诱导物浓度等;转录和翻译控制元件优化,例如起始和终止密码子、核糖体结合位点(RBS)、转录终止子等;质粒拷贝数和质粒稳定性优化;翻译起始区(TIR)优化。

[0763] 实施例3-本实施例详细描述了大肠杆菌摇瓶表达试验和高细胞密度发酵

[0764] 摇瓶表达试验:使用如上所述的AXID生产菌株在摇瓶实验中试验hIL-2表达。简单来说,将来自于AXID甘油管的接种物置于含有50μg/mL硫酸卡那霉素(Sigma,MO)的5mL Super Broth(Fisher-Optigrow™,#BP1432-10B1)培养基中,并在37℃振摇生长过夜。将所述过夜培养物在含有50μg/mL硫酸卡那霉素(Sigma,MO)的Super Broth(Fisher-Optigrow™,#BP1432-10B1)培养基中1:100稀释,并在37℃振摇生长。当培养物密度达到OD600为0.6-0.8时,将它用添加的0.2%阿拉伯糖和pAF诱导,随后在生产几小时(通常为3至5小时)后收获。取出收获的细胞的等分试样并通过SDS-PAGE进行分析。通过改变温度、诱导持续时间和诱导物浓度对hIL-2的最适表达进行标准化。按照下述用于分析hIL2表达的Western测定法,使用针对hIL-2的标准单克隆抗体对粗提物进行的免疫印迹证实了hIL-2的表达(图3A):将收获的细胞沉积物归一化到OD600为5,并溶解在含有溶菌酶(100μg/ml)和DNase 1(1U/ml)的计算量的B-PER溶液(ThermoFisher)中。通过以高速涡旋振荡2-5分钟并通过在37℃和250rpm下温育所述混合物,将所述沉积物混合。将所述样品与制造商提供

的样品缓冲液(4X)和样品还原剂(10x)混合,将终浓度调整到1x。将总共20μl样品与hIL2标准品(R&D Systems,Minneapolis,MN)一起装载到预制聚丙烯酰胺凝胶(ThermoFisher)上,并在1x MES缓冲液(ThermoFisher)中进行电泳分离。使用iBlot装置和凝胶转移堆栈将蛋白质样品转移到硝基纤维素膜上。将hIL2用山羊抗人IL-2抗原抗体(R&D Systems)捕获,并通过HRP偶联的抗山羊IgG第二抗体(R&D Systems)使用opti 4CN比色法底物(Bio-Rad,Hercules,CA)来检测。

[0765] 高细胞密度发酵:用于生产hIL-2的发酵过程由两个阶段构成:(i)接种物制备,和(ii)发酵罐生产。所述接种物从单个甘油管开始,融化,在250mL带挡板锥形瓶中在50mL确定种子培养基中1:1000(v/v)稀释,并在37℃和250rpm下温育。在使用之前,将发酵罐清洁并压热灭菌。向发酵罐添加特定量的基础培养基并蒸气灭菌。在接种之前向所述基础培养基添加特定量的硫酸卡那霉素溶液、进料培养基和P2000消泡剂。在压热灭菌后添加到发酵罐的所有溶液在无菌添加之前被0.2μm过滤或压热灭菌。

[0766] 将所述发酵罐批式装料4L利用甘油作为碳源的化学限定培养基。向发酵罐添加种子培养物至初始OD600nm为0.05。使用480至1200rpm的搅拌以及6psig的头部压力和5slpm的空气流量的氧气富集,将溶氧维持在30%空气饱和度。温度和pH分别被控制在37℃和7.0。当所述培养物达到OD600nm为35±5时,开始以0.25mL/L/min的速率补料。因此,L-Ala-pAcF(也被称为L-Ala-pAF)二肽以0.4g/L的量添加。在二肽添加后15分钟,将培养物用终浓度为2g/L的L-阿拉伯糖诱导。在诱导后6h收获培养物。

[0767] 反相HPLC滴度分析:首先将1.0mL大肠杆菌发酵样品(细胞糊)干燥并称重,以确定用于样品制备的质量。将Lysonase Bioprocessing试剂(EMD Millipore#71230)和Benzonase核酸酶试剂(EMD Millipore#70664)各自在BugBuster蛋白质提取试剂(EMD Millipore#70584)中1:500稀释,并用于细胞糊的化学裂解。向1.0mL干燥的细胞糊添加1.0mL所述Bugbuster-Lysonase-Benzonase混合物,并将得到的混合物剧烈涡旋振荡。然后将混合物放置在Eppendorf Thermomixer R摇床上,在22℃下以1000rpm振摇20分钟。在温育后,将细胞裂解物以16,050rcf离心5分钟以沉积细胞碎片。然后将细胞裂解物上清液的200μL等分试样通过0.22μm PVDF离心管式过滤器(EMD Millipore#UFC30GVNB)以16,050rcf离心过滤1分钟。然后通过反相层析分析过滤的产物,以确定发酵样品中存在的hIL2的量。使用装填有3.5μm粒子的4.6x 150mm Zorbax 300SB-C3(Agilent#863973-909)反相柱将hIL2与宿主细胞蛋白污染物分离开。在水中含有0.1%三氟乙酸的流动相A被用于结合hIL2。在乙腈中含有0.1%三氟乙酸的流动相B被用于将hIL2从柱洗脱。样品中hIL2的量通过将来自于固定进样体积的观察到的面积计数针对从使用纯化的hIL2产生的标准曲线获得的线性方程进行比较来确定。如图3B中所示例的几种试验的IL-2琥珀变体,在高细胞密度大肠杆菌发酵中显示出约65至150mg/L范围内的高滴度表达。

[0768] 实施例4-本实施例详细描述了包含体制备、重折叠、纯化和PEG化

[0769] 包含体制备和溶解:将从高细胞密度发酵收获的细胞糊在4℃的包含体(IB)缓冲液I(50mM Tris pH 8.0;100mM NaCl;1mM EDTA;1%Triton X-100;4℃)中通过混合重悬浮至最终10%固形物。通过将所述重悬浮的材料通过微射流机总共两次,将细胞裂解。然后将样品离心(14,000g;15分钟;4℃),倾析上清液。将包含体沉积物通过重悬浮在另外体积的IB缓冲液I(50mM Tris pH 8.0;100mM NaCl;1mM EDTA;1% Triton X-100;4℃)中进行洗

涤，并将所述重悬浮的材料通过微射流机总共两次。然后将样品离心(14,000g;15分钟;4℃)，倾析上清液。将包含体沉积物各自重悬浮在1体积的缓冲液II(50mM Tris pH 8.0;100mM NaCl;1mM EDTA;4℃)中。将所述样品离心(14,000g;15分钟;4℃)，倾析上清液。将包含体沉积物重悬浮在1/2体积的缓冲液II(50mM Tris pH 8.0;100mM NaCl;1mM EDTA;4℃)中。然后将所述包含体在适合的容器中分成等分试样。将样品离心(14,000g;15分钟;4℃)，倾析上清液。将所述包含体溶解或储存在-80℃下直至进一步使用。

[0770] 将包含体在增溶缓冲液(20mM Tris,pH 8.0;8M胍;10mMβ-ME)中溶解到终浓度在10-15mg/mL之间。然后将所述溶解的包含体在室温下，在恒定混合下温育1小时或直至完全溶解。然后将样品离心(10,000g;20分钟;4℃)以除去任何未溶解的材料。然后如果蛋白质浓度高，则通过用另外的增溶缓冲液稀释来调节每个样品的蛋白质浓度。

[0771] 重折叠和纯化:通过将所述样品在20mM Tris,pH 8.0;60％蔗糖;4℃中稀释至终浓度为0.5mg/mL来进行重折叠。允许重折叠在4℃下进行5天。将重折叠的材料用Milli-Q H_2O 1:1稀释。将材料通过0.22μmPES滤器过滤，并装载到在20mM Tris,pH 8.0;0.15M NaCl(缓冲液A)中平衡的Blue Sepharose FF柱(GE Healthcare)上。在冲洗流中，将柱用5倍柱体积的30％缓冲液B(20mM Tris,pH 8.0;2M NaCl;50％乙二醇)洗涤。通过用10倍柱体积的100％缓冲液B冲洗柱来洗脱IL-2多肽。

[0772] PEG化和PEG化后的纯化:取IL-2合并物并用Milli-Q水稀释10X。用50％冰醋酸将每个样品的pH调整到4.0。将样品浓缩至～1.0mg/mL。向每个样品添加1:12摩尔过量的活化的PEG(羟胺PEG)。然后将所述样品在27℃下温育48-72小时。取出样品并将样品用水(<8m/S)稀释8-10倍，并装载到在缓冲液A(50mM NaAc,pH 6.0;50mM NaCl;0.05％ Zwittergent 3-14)中平衡的SP HP柱(GE Healthcare)上。用5倍柱体积的缓冲液B(50mM NaAc,pH 6.0;500mM NaCl;0.05％Zwittergent 3-14)洗脱IL-2多肽。将IL-2的级分合并，并在IL-2储存缓冲液(20mM NaAc,pH 5.0;150mM NaCl;0.05％ Zwittergent 3-14)中平衡的Superdex 200孔径排阻柱上运行。收集PEG化的材料并储存在4℃下。

[0773] 实施例5-本实施例详细描述了从大肠杆菌和哺乳动物表达系统纯化IL-2。本实施例还公开了PEG化、位点特异性偶联以及PEG-IL-2纯化过程。

[0774] 从大肠杆菌包含体制备物制备:通过一系列洗涤步骤分离IL-2包含体。将冷冻的细胞糊重悬浮在洗涤缓冲液I(50mM Tris,pH 8.0;1％triton X-100;1M尿素，5mM EDTA，1mM PMSF)中至10％(W/V)的浓度，在4℃均质化，然后离心(15,000g,30分钟,4℃)。舍弃上清液，并将包含体沉积物重悬浮在洗涤缓冲液II(50mM Tris,pH 8.0;1％triton X-100;1M尿素,5mM EDTA)中。将重悬浮的包含体在4℃以15,000g离心30分钟。舍弃上清液，并将包含体沉积物重悬浮在洗涤缓冲液III(50mM Tris,pH 8.0;脱氧胆酸钠,5mM EDTA)中。将重悬浮的包含体在4℃下以15,000g离心30分钟。舍弃上清液，并将包含体沉积物重悬浮在水中，然后在4℃下以15,000g离心30分钟。将洗涤过的包含体储存在-80℃下直至进一步使用。

[0775] 重折叠:通过在水中重悬浮并将混合物的pH调整到pH 12.2来溶解IL-2包含体。通过离心(12,000g,15分钟)除去不溶性材料。溶解的IL-2通过将pH调低到pH 8.8±0.2进行重折叠。通过向重折叠反应添加50μM胱氨酸来促进适合的二硫键形成。允许所述重折叠反应在室温放置16-22小时。通过用盐酸将所述重折叠反应调整到pH 6.8来沉淀宿主细胞污染物。通过离心(12,000g,15分钟)除去沉淀物，用氢氧化钠将澄清的上清液调整到pH 7.8

并进行0.22μm过滤。

[0776] 柱纯化:将重折叠的IL-2装载到在缓冲液A(20mM磷酸钠,pH7.8)中平衡的Capto Adhere Impres(GE Healthcare)柱上。在装载后,将所述柱用缓冲液A(20mM磷酸钠,pH 7.8)洗涤,并使用在20个柱体积内直至100%缓冲液B(20mM磷酸钠,20mM柠檬酸,pH 4.0)的线性pH梯度将IL-2从柱上洗脱。收集含有IL-2的级分,用10%乙酸将pH调整到4.0,然后在20mM乙酸钠,2.5%海藻糖,pH 4.0中进行缓冲液交换。将IL-2浓缩到1-10mg/mL,0.22μM过滤,并储存在-80℃下。

[0777] 从真核表达系统纯化IL-2:将含有带His标签的IL-2的细胞培养基用氢氧化钠将pH调整到7.8,并装载到在20mM磷酸钠,pH 7.8中平衡的Ni Excel柱(GE Healthcare)上。在装载后,将所述柱用缓冲液A(20mM磷酸钠,pH 7.8)洗涤,然后用洗涤缓冲液B(20mM磷酸钠,1.0M氯化钠,30mM咪唑,pH 7.8)洗涤,以除去宿主细胞污染物。用洗脱缓冲液(10mM磷酸钠,300mM咪唑,pH 7.8)将IL-2从柱上洗脱,并将含有IL-2的级分合并。将所述IL-2合并材料装载到在缓冲液A(20mM磷酸钠,pH 7.8)中平衡的Capto Adhere Impres(GE Healthcare)柱上。在装载后,将所述柱用缓冲液A(20mM磷酸钠,pH 7.8)洗涤,并使用在20个柱体积内直至100%缓冲液B(20mM磷酸钠,20mM柠檬酸,pH 4.0)的线性pH梯度将IL-2从柱上洗脱。收集含有IL-2的级分,用10%乙酸将pH调整到4.0,然后在20mM乙酸钠,2.5%海藻糖,pH 4.0中进行缓冲液交换。将IL-2浓缩到1-10mg/mL,0.22μM过滤,并储存在-80℃下直至进一步使用。

[0778] 位点特异性偶联和PEG-IL-2纯化:将含有非天然氨基酸(nnAA)对乙酰基苯丙氨酸的IL-2变体在偶联缓冲液(20mM乙酸钠,pH 4.0)中进行缓冲液交换,并浓缩至1-10mg/mL。向反应添加最终100mM的乙酰肼,然后添加10倍摩尔过量的氨氧基官能化的PEG。将所述偶联反应在25-30℃温育18-20小时。在偶联后,将所述PEG化的IL-2用20mM pH 5.0的乙酸钠1:10稀释,并装载到Capto SP Impres柱上。在装载后,将所述柱用缓冲液A(20mM乙酸钠,pH 5.0)洗涤,并使用在20个柱体积内直至100%缓冲液B(20mM乙酸钠,1.0M氯化钠,pH 5.0)的线性梯度将PEG化的IL-2从柱上洗脱。收集含有PEG化的IL-2的级分,并在10mM磷酸钠、100mM氯化钠、2.5%海藻糖、pH 7.0中进行缓冲液交换。将IL-2浓缩到1-2mg/mL,0.22μM过滤,并储存在-80℃下直至进一步使用。

[0779] 通过生物层干涉仪进行IL-2/CD-25结合测定:IL-2/CD25多浓度结合动力学实验在Octet RED96(PALL/ForteBio)仪器上,在30℃下进行。将抗人类Fc抗体捕获生物传感器(PALL/ForteBio,目录号18-5063)用1X HBS-P+缓冲液(GE Healthcare,目录号BR-1008-27)中的纯化的CD25-Fc融合蛋白装载。达到0.8nm至1.0nm之间的固定化水平。将载样的生物传感器用1X HBS-P+缓冲液洗涤,以在测量结合和解离动力学之前除去任何未结合的蛋白质。对于结合阶段的监测来说,将IL-2分析物样品用1X HBS-P+缓冲液稀释并转移到实心黑色96孔板(Greiner Bio-One,目录号655209)。允许IL-2样品与装载有CD25-Fc的生物传感器结合60秒。解离阶段在含有1X HBS-P+缓冲液的实心黑色96孔板的孔中记录90秒。使用平行缓冲液空白减除法引用数据,将基线与y轴对齐,并在10.0版Octet数据分析软件(PALL/ForteBio)中通过Savitzky-Golay过滤器进行平滑处理。使用描述1:1结合化学计量学的Langmuir模型对处理后的动力学传感图进行全局拟合(图4A)。

[0780] 实施例6-本实施例详细描述了包括非天然编码的氨基酸的IL-2在哺乳动物系统中的克隆和表达。本实施例还描述了评估修饰的IL-2的生物学活性的方法。

[0781] 在哺乳动物细胞中制备IL-2变体。天然人类IL-2是一种糖基化蛋白，其在Thr-3上具有O-连接的糖基化(Conradt等，Eur J Biochem,153(2):pp:255-61(1985))。尽管已显示非糖基化IL-2具有与糖基化IL-2相似的活性，但糖基化人类IL-2已显示在活化的人类T细胞的克隆生长和长期繁殖方面具有更好的活性。也有一些报告表明天然IL-2具有更高的特异性活性。还已表明，IL-2在哺乳动物细胞中的表达与它们在大肠杆菌中的表达相比具有优势(Kim等，J Microbiol Biotechnol,14(4),810-815(2004))。在本发明中，野生型IL-2及其分别在上文表1和2中设计的各种不同的突变蛋白质，可以在CHO细胞中生产(正如在本文实施例中所描述的)。

[0782] 为了生产在所需位置处含有非天然氨基酸的IL-2突变蛋白质，将每种突变蛋白质在稳定的合并物或稳定的细胞系中生产，所述细胞系源自于转染的平台细胞系，其含有工程化的正交tRNA/tRNA合成酶对(Tian等，Proc Natl Acad Sci U S A,111(5):pp:1766-71(2014)和PCT/2018US/035764:其各自整体通过引用并入本文)。简单来说，将CHOK1细胞工程化改造成稳定表达专有正交tRNA合成酶(O-RS)及其同源琥珀抑制性tRNA(O-tRNA)的平台细胞系，用于例如在CHO细胞中将非天然氨基酸例如pAF高效并入到治疗性蛋白例如IL-2中。然后使所述平台细胞系预先适应悬浮生长，用于在生物反应器中快速发展。所述平台细胞系已被充分表征和进化，具有提高的非天然氨基酸并入效率和克隆选择效率。所述平台细胞系被用作母体细胞，以通过快速且高效的瞬时表达以高于100mg/L的滴度生产用于早期研究使用的并入有非天然氨基酸的治疗性蛋白质。进行瞬时转染和稳定的合并物生产，以评估候选分子的表达并为鉴定先导分子的功能测定法提供材料。通过将GS表达系统中含有琥珀无义密码子的感兴趣基因转染到平台细胞系中来产生生产细胞系，以生产并入有非天然氨基酸的IL-2蛋白。使用所述平台细胞系作为母体细胞来实施稳定细胞系开发策略，以获得在3-4个月内具有5-10PCD并在6个月内具有20-30PCD的生产细胞系。

[0783] 在本发明中，合成了具有其天然信号肽序列的人类IL-2cDNA(NM_000586.3)并将其克隆到含有GS选择标记的哺乳动物表达载体中(图4B)。如表1中所示，所述克隆的野生型人类IL-2cDNA保留了它的每个氨基酸的原始DNA序列，没有任何突变。相反，在IL-2变体(表2)的产生期间，所述15种突变蛋白质中的每一者具有独特位置被突变成琥珀终止密码子(TAG)，其可以在工程化细胞中被抑制和表达以生产含有nnAA的蛋白质。

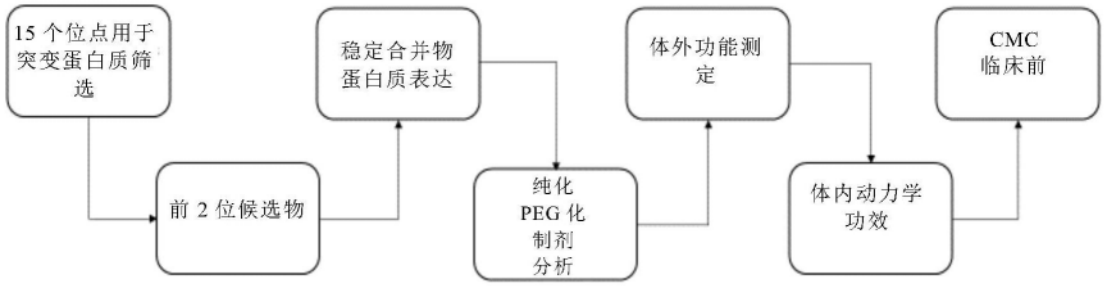
[0784] 用于IL-2变体表达的工程化CHO细胞的建立。工程化CHO细胞源自于以前建立的专有平台细胞(PCT/2018US/035764，其整体通过引用并入本文)的基因敲除。简单来说，使用基于网络的靶发现工具CRISPy来快速鉴定在CHO-K1细胞中具有零脱靶的优选在早期外显子中的gRNA靶序列。将所述gRNA克隆到共表达CHO密码子优化形式的Cas9的哺乳动物表达载体pGNCV中。用蛋白表达载体转染生产细胞系以产生细胞合并物，然后进行克隆以鉴定具有基因敲除的单细胞分离株。来自于多个项目的组合结果的插入缺失(插入/缺失)频率，对于细胞合并物和单细胞分离株来说分别为30-90％和50-80％。使用CRISPR来敲除CHO细胞中的靶基因。具体来说，为了提高IL-2的mRNA稳定性，使用CRISPR技术敲除UPF1基因。用于敲除的gRNA示出在图5中。在筛选了192个克隆后获得两个UPF1-KO细胞系，并通过测序确认其具有UPF1敲除(图6)。然后将所述得到的UPF1-KO细胞系用于瞬时表达IL-2变体。

[0785] IL-2在工程化CHO细胞中的瞬时表达。将IL-2变体在如上实施例中所公开获得的UPF1-KO细胞系中瞬时表达。使用用于悬浮细胞的Amaxa试剂盒(Lonza)，使用电穿孔进行转

染。将6ug如上实施例中所公开制备的质粒转染到2X 10^6个工程化CHO细胞中。在转染后，将细胞在37℃下温育4天，然后使用来自于Invitrogen(Carlsbad,CA)的商品化试剂盒通过ELISA分析滴度。如图7A和7B中所示，在瞬时表达期间，在15种变体中变体F42表现出最高的表达水平。

[0786] IL-2变体在CTLL-2细胞中的T细胞扩增试验。使用来自于被转染的工程化CHO细胞的瞬时表达的F42变体上清液进行CTLL-2细胞扩增测定法。在所述细胞增殖测定法期间，将野生型IL-2用作100％增殖的对照(示出在图8中)。在所述测定法中将变体F42制备成连续稀释液，10ng/mL、3.33ng/mL、1.11ng/mL、0.37ng/mL、0.12ng/mL和0.04ng/mL。使用Cell Titer Glo(Promega,WI)来进行细胞增殖。在TECAN genios pro上读取发光信号。正如在图8中所示，F42显示出0.24ng/mL左右的EC_{50}，同时与其野生型对照相比保留95％的功能。用于研究本发明的IL-2变体的通用程序显示如下：

[0787]



[0788] 具有非天然氨基酸的PEG化的IL-2突变蛋白质的功效研究的通用程序

[0789] 实施例7-通过CTLL-2细胞扩增筛选IL-2变体

[0790] 利用如实施例中所公开的CTLL-2细胞扩增测定法，筛选了包括本领域中已知的16个最初选择的位点(包括野生型)和4个其他位点(K32、K48、K49、K76)的20种不同的IL-2变体(Charych,D.等,PLoS One,12(7):p.e0179431,2017)。如图9和表3中所示，大多数变体在诱变后保留它们的活性。由于CTLL-2细胞具有残留的IL-2Rα表达这一性质，带有与CTLL2细胞结合最低的诱变的变体仍表现出一定的与IL-2Rα的固有结合，尽管这种结合极低。例如，观察到与IL-2Rα表现出最低结合的P65 IL-2变体与IL-2Rα显示出一定的固有的偏倚结合。鉴定到的变体被进一步分析它们在PEG化之后的结合能力。

[0791] 表3.使用CTLL2增殖测定法的IL-2变体的活性

[0792]

IL-2变体	EC50(nM)
WT	1.96
T3	1.86
K32	0.27
K35	2.39
T37	1.64
R38	1.67
F42	8.70
K43	0.17
F44	0.37
Y45	1.87

K48	2.87
K49	3.93
E61	1.17
E62	1.98
K64	4.09
P65	13.90
E68	1.73
L72	2.45
K76	0.29
Y107	1.60

[0793] 实施例8-使用体外结合测定法分析所选的变体

[0794] 使用在上述实施例中所描述的体外结合测定法生物层干涉仪测定法，进行了所选变体P65、Y45、E61、F42、K35、K49和T37的分析。每个变体分别在它们的特定位点处偶联有20K PEG。然后通过在实施例中别处描述的BLI(生物层干涉仪)测定法分析PEG化的变体。如图10A-10C中所示，在Octet上测试了PEG化的变体与IL-2Rα的结合。在测定中使用野生型IL-2作为阳性对照。在PEG化后，大多数变体显示出在92.9％至99.9％之间的急剧降低的与IL-2Rα的结合。在所测试的PEG化变体中，P65和Y45显示出活性阻断超过99％，表4。

[0795] 表4.IL-2变体的体外结合活性

[0796]

IL-2变体	稳态Kd(nM)	与IL-2Rα的结合的阻断
IL-2WT	11	0％
P65-PEG20K	32000	99.9％
Y45-PEG20K	1900	99.4％
E61-EPG20K	1400	99.0％
F42-PEG20K	1100	99.0％
K35-PEG20K	840	98.7％
K49-PEG20K	180	93.8％
T37-PEG20K	155	92.9％

[0797] 实施例9-使用PathHunter二聚化测定法分析所选的变体

[0798] 为了发现用于PEG偶联的最佳位点，使用了由DiscoverX(Fremont,CA)开发的PathHunter二聚化测定法。总的来说，所述测定法系统使用外源表达的IL-2受体，其已被工程化改造成具有酶的互补结合结构域，一旦以前分开的受体通过添加IL-2分子二聚化后被激活，产生化学发光信号(图11)。在U2OS细胞中产生了两种细胞系。一种细胞系表达三种受体IL-2Rα、IL-2Rβ和IL-2Rγ。另一种细胞系表达IL-2Rβ和IL-2Rγ。每种变体的结合EC_{50}值的比率(EC_{50}-βγ/EC_{50}-αβγ)被用于估算它们的相对保留结合能力。如表5中所示，可能最好的变体具有1的值，意味着它们的100％的βγ结合能力得以保留，而α结合被100％阻断。正如注意到的，变体Y45-BR4(偶联有20K 4-支链PEG的变体Y45)和P65-PEG20K(偶联有20K-直链PEG的变体P65)显示出最低的值，表明这两种PEG化的变体将是用于进一步评估的最佳候选者。

[0799] 表5.使用二聚化测定法的IL-2变体的结合活性-实验1

[0800]

化合物	βγEC50(nM)	αβγEC50(nM)	βγ/αβγ比率
可能最好的	0.41	0.41	1
Y45-BR4	5.69	1.18	5
P65-PEG20K	7.40	1.51	5
Y45-BR2	6.10	0.46	13
IL-2WT	0.41	0.02	25
E61-PEG20K	3.78	0.02	168
Y45-PEG20K	5.50	0.03	206

[0801] 正如表6中所示,在进行的另一项实验中,除了变体Y45-BR4和P65-PEG20K之外,变体P65-BR4(偶联有20K 4-支链PEG的变体P65)和P65-BR2(偶联有20K 2-支链PEG的变体P65)也被选择作为用于进一步评估的候选者。

[0802] 表6.使用二聚化测定法的IL-2变体的改进的结合活性-实验2

[0803]

化合物	βγEC50(nM)	αβγEC50(nM)	βγ/αβγ比率
可能最好的	0.41	0.41	1
P65-BR4	8.50	4.86	1.75
P65-BR2	13.06	4.80	2.96
Y45-BR4	3.67	0.84	4.31
P65-PEG20K	5.21	1.10	5.06
Y45-BR2	3.39	0.40	8.34
IL-2WT	0.41	0.03	16.67
Y45-PEG20K	2.34	0.04	30.87

[0804] 实施例10-IL-2变体的离体pSTAT5测定法

[0805] 为了进一步评估PEG化的变体的体外功能,使用了利用PBMC的离体测定法。如图12中所示,IL-2与其受体的结合触发了STAT5的磷酸化(pSTAT5)的提高。因此,检测pSTAT5水平将是IL-2变体与内源IL-2受体的结合的指示物。将人类全PBMC用所选的PEG化的变体例如Y45-BR2(偶联有20K 2-支链PEG的变体Y45)、Y45-BR4(偶联有20K 4-支链PEG的变体Y45)和P65-PEG20K(偶联有直链20KPEG的变体P65)处理,然后分离成两个群体CD8+T细胞和CD4+Treg细胞。正如表7中所示,所有三种变体对于它们的保留的βγ结合活性和阻断的α结合活性而言,表现出大大改进的活性。这些结果得到了如表8中所示的另一项pSTAT5测定法中试验的变体的进一步支持。来自于这个pSTAT5测定法(表8)的结果显示,对于它们的降低的与Treg细胞结合的能力和相对维持的与CD8+细胞的结合而言,许多变体具有急剧改进的活性。在表8中,计算的CD8+/Treg比率被用于指示变体的排序,以便可以通过相似的排序系统将PathHunter测定法结果直接与pSTAT5测定法结果进行比较。

[0806] 表7-使用离体测定法的IL-2变体的结合活性-实验1

[0807]

化合物	EC50-CD8（nM）	EC50-Treg（nM）	βγ-保留活性（%）	αβγ-保留活性（%）	比率（βγ/αβγ）
IL-2 WT	0.1346	0.00034	100	100	1.00
Y45-BR2	1.065	0.4504	12.64	0.1	169.87
Y45-BR4	2.714	1.337	4.96	0.03	197.88
P65-PEG20K	9.204	4.179	1.46	0.01	182.38

[0808] 表8-使用离体测定法的IL-2变体的改进的结合活性-实验2

[0809]

化合物	EC50-CD8(nM)	EC50-Treg（nM）	比率（CD8/Treg）
IL-2 WT	0.03377	0.0002857	118.2
Y45-BR2	4.604	36.003	0.13
Y45-PEG20K	3.367	5.377	0.61
P65-BR2	41.467	111.644	0.37
Y45-BR4	7.462	3.398	2.20

[0810]

P65-PEG20K	10.643	4.514	2.36
P65-BR4	23.961	4.351	5.51

[0811] 实施例11-在CHO哺乳动物细胞中生产的糖基化IL-2和大肠杆菌中生产的非糖基化IL-2的存在下CTLL-2细胞的克隆生长和长期繁殖的比较

[0812] 已报道本源人类IL-2是一种糖基化蛋白，其在Thr-3上具有O-连接的糖基化(Conradt等，Eur J Biochem 153(2):255-261(1985))。与非糖基化IL-2相比，这种糖基化的功能与在生理pH下更高的溶解性、更慢的体内清除和在癌症疗法中更低的免疫原性相关(Robb等，Proc Natl Acad Sci U S A 81(20):6486-6490(1984)；Goodson等，Biotechnology(NY)8(4):343-346(1990))。更重要的是，已显示在促进同种活化的人类T细胞的克隆生长和长期繁殖中，糖基化IL-2优于非糖基化IL-2(Pawelec等，Immunobiology 174(1):67-75(1987))，表明在治疗性应用中糖基化IL-2是更好的选择。

[0813] 为了进一步分析糖基化IL-2和非糖基化IL-2的生物功能，进行了分析CTLL-2细胞的克隆生长速率和长期繁殖频率的实验(图13)。将单个CTLL-2细胞放置在具有γ-辐照过的CF1-MEF(小鼠胚胎成纤维细胞)细胞的预包被饲养细胞层的96孔板(Thermo Fisher，Waltham,MA,CAT#A34180)中。在使用各种不同浓度(0.005nM、0.05nM、0.5nM和5nM)的从CHO细胞或大肠杆菌生产的野生型IL-2的单一处理的19天生长期间，对长出的集落数目的百分率和19天温育结束时存活的集落的百分率进行计数和分析。如图13中所示(以0.5nM处理为例)，糖基化IL-2与非糖基化IL-2相比在促进克隆生长中显示出优越活性。平均来说，在作为CTLL-2细胞生长的最适细胞培养条件的0.5nM IL-2浓度存在下，糖基化IL-2促进克隆生长的能力为非糖基化IL-2的两倍高。在长期温育(～19天)后，来自于糖基化IL-2处理的集落存活率为非糖基化IL-2处理的4倍高。所述数据清楚地证明糖基化IL-2在促进IL-2响应性细胞的克隆生长和长期繁殖方面具有优越的活性，并进一步支持了它的有希望的治疗应

用。

[0814] 实施例12-在新的稳定宿主CHO细胞系中IL-2表达的滴度提高

[0815] 在本领域中已尝试了许多方法来提高野生型IL-2及其变体在CHO细胞中的表达(参见例如Kim等,J Microbiol Biotechnol,14(4),810-815(2004))。然而,在工业中提高含有非天然氨基酸的蛋白质的表达,受到在哺乳动物细胞中相对低的产率的挑战。在本发明中为了解决这一难题,利用了在PCT/2018US/035764(其整体通过引用并入本文)中公开的用于在真核细胞系中改进蛋白质滴度生产的专有技术来产生IL-2及其变体的稳定的合并细胞,并将其用于所产生的稳定IL-2细胞系。

[0816] 简单来说,发现表达Bax/Bak敲除的不同的五代平台细胞系急剧提高IL-2的蛋白质表达,并将IL-2蛋白产量提高到比母体细胞系高约40%。除了通过Bax/Bak敲除在这些细胞中抑制凋亡之外,还发现UPF1敲除进一步提高IL-2的表达。

[0817] 野生型IL-2及其变体(F42、Y45和P65)两者已通过产生它们的稳定合并物进行试验。如图14中所示,三种IL-2变体F42、Y45和P65、包括野生型IL-2的稳定合并物,与本领域中已有的水平相比具有极大提高的表达水平(参见例如Kim等,J Microbiol Biotechnol.,14(4),810-815,(2004)),在产生各自的稳定合并物后对于野生型来说高达约740mg/L,对于F42变体来说高达120mg/L(示出在图14中)。所述数据显示,通过产生具有高效掺入的非天然氨基酸的新的CHO细胞系,可以改进或提高IL-2蛋白的生产或产率。还已表明,表达水平和功能是位点特异性相关的。

[0818] 实施例13-IL-2变体F42-R38A显示出IL-2Rα结合的完全阻断

[0819] 正如本文中所公开的,将所述非天然编码的氨基酸替换与所述IL-2内的其他添加、替换或缺失相组合,以影响所述IL-2多肽的其他生物学性状,包括但不限于提高所述IL-2的稳定性(包括但不限于对蛋白水解降解的抗性)或提高所述IL-2对其受体的亲和性,提高所述IL-2的药物稳定性,增强所述IL-2的肿瘤抑制和/或肿瘤减小的活性,提高所述IL-2或变体的溶解性(包括但不限于当在大肠杆菌或其他宿主细胞中表达时),提高所述IL-2在大肠杆菌或其他重组宿主细胞中表达后的溶解性,提高所述多肽在大肠杆菌或其他重组宿主细胞中表达后的溶解性,调节对IL-2受体、结合蛋白或相关配体的亲和性,调节与IL-2受体结合后的信号转导,调节循环半衰期,调节释放或生物利用度,促进纯化,或改善或改变特定给药途径,提高IL-2变体对其受体的亲和性,提高IL-2变体对IL-2-Rβ和/或IL-2-Rγ的亲和性。

[0820] 因此,为了改进变体F42的功能,在CHO细胞中制备了具有另外的突变R38A的新变体。如图15A中所示,在稳定细胞系产生期间,在稳定的合并物中使用IL-2变体F42中的非天然氨基酸和天然氨基酸替换的组合,滴度提高到118mg/L。在R38A突变存在下,变体F42的蛋白质表达水平不仅得以维持,而且显示出20%的提高。为了试验PEG化的F42-R38A变体的功能,进行了CTLL-2细胞结合测定法。如表9中所示,F42-R38A 20K 2-支链PEG(变体F42-R38-BR2)偶联物显示出15.9nM的EC_{50},与此相比F42显示出3.6nM的EC_{50},因此结合阻断效率提高超过4倍(图15B)。基于野生型IL-2的0.025nM的EC_{50},结合阻断效率超过99.9%。就高的蛋白质表达水平和阻断与IL-2Rα结合的效率而言,这种变体显示出用于治疗性应用的极大潜力。

[0821] 表9.PEG化的F42-R38A变体的CTLL-2结合测定法

[0822]

	WT-IL2	F42-PEG20K-BR2	F42-R38A-PEG20K-BR2
EC50	0.025nM	3.6nM	15.9nM

[0823] 通过BLI评估了F42pAF变体、R38A-F42pAF变体(包含非天然氨基酸和点突变)和F42-R38A-PEG20K-BR2的结合动力学,以确定R38A突变对于IL-2Rα的结合的影响。图15C示出了三种构建物的结合传感图,并且相关的结合常数(KD)示出在表10中。正如在表10中看到的,IL-2-F42pAF具有20nM的IL-2Rα结合KD。添加R38A突变后,IL-2-F42-R38ApAF具有233nM的IL-2Rα结合KD,这对应于IL-2Rα结合的12倍的降低。在将IL-2-R38A-F42pAF与20K 2-支链PEG分子偶联后,IL-2Rα结合被阻止。所述结果清楚地证明,添加的突变有效地阻断F42-R38A与其受体IL-2Rα的结合。

[0824] 表10.具有天然和非天然氨基酸替换的IL-2PEG化变体的结合

[0825]

	F42pAF	F42-PEG20K-BR2	F42-R38A-PEG20K-BR2
K_D	20nM	233nM	无结合

[0826] 应当理解,本文描述的实施例和实施方式仅用于说明目的,并且根据其进行的各种不同修改或改变将被本领域普通技术人员建议,并将被包括在本申请的精神和范围以及随附的权利要求书的范围之内。在本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和/或其他文献为所有目的整体通过引用并入本文,其程度等同于每个单独的出版物、专利、专利申请和/或其他文献被单独地指明为所有目的通过引用并入本文。

[0827] 本发明通过下述编号的实施方式进一步描述。

[0828] 1.一种包含一个或多个非天然编码的氨基酸的IL-2多肽,其中所述IL-2多肽与野生型IL-2相比与其受体亚基的相互作用降低。

[0829] 2.实施方式1的IL-2,其中所述IL-2多肽与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3 90%同源。

[0830] 3.实施方式1的IL-2,其中所述IL-2多肽与SEQ ID NO:2至少95%同源。

[0831] 4.实施方式1的IL-2,其中所述IL-2多肽与SEQ ID NO:2至少98%同源。

[0832] 5.实施方式1的IL-2,其中所述IL-2多肽与SEQ ID NO:2至少99%同源。

[0833] 6.实施方式1的IL-2,其中所述IL-2被偶联到一个或多个水溶性聚合物。

[0834] 7.实施方式6的IL-2,其中至少一个所述水溶性聚合物被连接到至少一个所述非天然编码的氨基酸。

[0835] 8实施方式7的IL-2,其中所述水溶性聚合物是PEG。

[0836] 9.实施方式8的IL-2,其中所述PEG具有10至50之间的分子量。

[0837] 10.实施方式1的IL-2,其中所述非天然编码的氨基酸被替换在选自下述残基的位置处:第1位之前(即在N-端处),第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133位,或被添加到所述蛋白质的羧基端,及其任何组合。

[0838] 11.实施方式10的IL-2,其中所述IL-2与野生型IL-2相比包含调节所述IL-2多肽

对其IL2Rα受体亚基的亲和性的一个或多个氨基酸替换、添加或缺失。

[0839] 12.实施方式10的IL-2,其中所述IL-2包含提高所述IL-2的稳定性或溶解性的一个或多个氨基酸替换、添加或缺失。

[0840] 13.实施方式10的IL-2,其中所述IL-2包含提高所述IL-2多肽在重组宿主细胞中的表达或体外合成的一个或多个氨基酸替换、添加或缺失。

[0841] 14.实施方式10的IL-2,其中所述非天然编码的氨基酸被替换在选自第3、35、37、38、41、42、43、44、45、61、62、64、65、68、72和107位残基及其任何组合的位置处。

[0842] 15.实施方式10的IL-2,其中所述非天然编码的氨基酸对原本对所述多肽中的20种常见氨基酸中的任一者无反应性的接头、聚合物或生物活性分子具有反应性。

[0843] 16.实施方式10的IL-2,其中所述非天然编码的氨基酸包含羰基、氨氧基、肼基、酰肼基、氨基脲基、叠氮基或炔基。

[0844] 17.实施方式16的IL-2,其中所述非天然编码的氨基酸包含羰基。

[0845] 18.实施方式10的IL-2,其中所述IL-2被连接到生物活性分子、细胞毒性药剂、水溶性聚合物或免疫刺激剂。

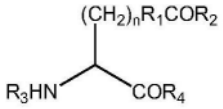
[0846] 19.实施方式18的IL-2,其中偶联的IL-2被附连到一个或多个水溶性聚合物。

[0847] 20.实施方式18的IL-2,其中所述生物活性分子、细胞毒性药剂或免疫刺激剂通过接头连接到所述IL-2。

[0848] 21.实施方式18的IL-2,其中所述生物活性分子、细胞毒性药剂或免疫刺激剂通过可切割或不可切割的接头连接到所述IL-2。

[0849] 22.实施方式18的IL-2,其中所述生物活性分子、细胞毒性药剂或免疫刺激剂被直接偶联到所述IL-2中的一个或多个所述非天然编码的氨基酸。

[0850] 23.实施方式10的IL-2,其中所述非天然编码的氨基酸具有下述结构:

[0851] 

[0852] 其中n是0-10;R1是烷基、芳基、取代的烷基或取代的芳基;R2是H、烷基、芳基、取代的烷基和取代的芳基;R3是H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团;并且R4是H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。

[0853] 24.实施方式23的IL-2,其中所述非天然编码的氨基酸包含氨氧基。

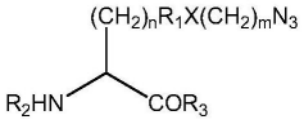
[0854] 25.实施方式23的IL-2,其中所述非天然编码的氨基酸包含酰肼基。

[0855] 26.实施方式23的IL-2,其中所述非天然编码的氨基酸包含肼基。

[0856] 27.实施方式23的IL-2,其中所述非天然编码的氨基酸残基包含氨基脲基。

[0857] 28.实施方式23的IL-2多肽,其中所述非天然编码的氨基酸残基包含叠氮基。

[0858] 29.实施方式1的IL-2,其中所述非天然编码的氨基酸具有下述结构:

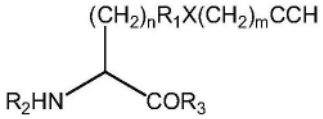
[0859] 

[0860] 其中n是0-10;R1是烷基、芳基、取代的烷基、取代的芳基或不存在;X是O、N、S或不存在;m是0-10;R2是H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团,并且R3是H、氨基酸、多肽或羧基端

修饰基团。

[0861] 30.实施方式29的IL-2,其中所述非天然编码的氨基酸包含炔基。

[0862] 31.实施方式1的IL-2,其中所述非天然编码的氨基酸具有下述结构:

[0863] 

[0864] 其中n是0-10;R1是烷基、芳基、取代的烷基或取代的芳基;X是O、N、S或不存在;m是0-10;R2是H、氨基酸、多肽或氨基端修饰基团,并且R3是H、氨基酸、多肽或羧基端修饰基团。

[0865] 32.实施方式7的IL-2,其中所述水溶性聚合物具有约0.1kDa至约100kDa之间的分子量。

[0866] 33.实施方式32的IL-2多肽,其中所述水溶性聚合物具有约0.1kDa至约50kDa之间的分子量。

[0867] 34.实施方式16的IL-2,其中所述氨氧基、肼、酰肼或氨基脲基通过酰胺键连接到所述水溶性聚合物。

[0868] 35.实施方式19的IL-2,其通过将包含羰基的水溶性聚合物与包含含有氨氧基、肼、酰肼或氨基脲基的非天然编码的氨基酸的多肽进行反应来制造。

[0869] 36.实施方式1的IL-2,其中所述IL-2被糖基化。

[0870] 37.实施方式1的IL-2,其中所述IL-2多肽还包含通过所述非天然编码的氨基酸连接到所述多肽的接头、聚合物或生物活性分子。

[0871] 38.实施方式37的IL-2,其中所述接头、聚合物或生物活性分子通过糖组成部分连接到所述多肽。

[0872] 39.一种制造实施方式1的IL-2的方法,所述方法包括将包含非天然编码的氨基酸的分离的IL-2多肽与包含与所述非天然编码的氨基酸反应的组成部分的接头、聚合物或生物活性分子相接触。

[0873] 40.实施方式39的方法,其中所述聚合物包含选自水溶性聚合物和聚乙二醇的组成部分。

[0874] 41.实施方式39的方法,其中所述非天然编码的氨基酸包含羰基、氨氧基、酰肼基、肼基、氨基脲基、叠氮基或炔基。

[0875] 42.实施方式39的方法,其中所述非天然编码的氨基酸包含羰基组成部分,并且所述接头、聚合物或生物活性分子包含氨氧基、肼、酰肼或氨基脲组成部分。

[0876] 43.实施方式39的方法,其中所述氨氧基、肼、酰肼或氨基脲组成部分通过酰胺键连接到所述接头、聚合物或生物活性分子。

[0877] 44.实施方式39的方法,其中所述非天然编码的氨基酸包含炔基组成部分,并且所述接头、聚合物或生物活性分子包含叠氮基组成部分。

[0878] 45.实施方式39的方法,其中所述非天然编码的氨基酸包含叠氮基组成部分,并且所述接头、聚合物或生物活性分子包含炔基组成部分。

[0879] 46.实施方式7的IL-2多肽,其中所述水溶性聚合物是聚乙二醇组成部分。

[0880] 47.实施方式46的IL-2多肽,其中所述聚乙二醇组成部分是支链或多臂聚合物。

[0881] 48.一种组合物,其包含实施方式10的IL-2和可药用载体。

[0882] 49.实施方式48的组合物,其中所述非天然编码的氨基酸被连接到水溶性聚合物。

[0883] 50.一种治疗具有受IL-2调节的障碍的患者的方法,所述方法包括向所述患者给药治疗有效量的实施方式42的组合物。

[0884] 51.一种组合物,其包含偶联到生物活性分子的实施方式10的IL-2和可药用载体。

[0885] 52.一种组合物,其包含实施方式10的IL-2和可药用载体,所述IL-2还包含接头和偶联物。

[0886] 53.一种制造包含非天然编码的氨基酸的IL-2的方法,所述方法包括将包含编码IL-2多肽的包含选择器密码子的一种或多种多核苷酸、正交RNA合成酶和正交tRNA的细胞在允许包含非天然编码的氨基酸的所述IL-2多肽的表达的条件下培养;和纯化所述多肽。

[0887] 54.一种调节IL-2多肽的血清半衰期或循环时间的方法,所述方法包括用一个或多个非天然编码的氨基酸替换所述多肽中的任意一个或多个天然存在的氨基酸。

[0888] 55.一种IL-2多肽,其包含在重组宿主细胞中提高所述IL-2多肽的表达的一个或多个氨基酸替换、添加或缺失。

[0889] 56.一种IL-2多肽,其包含至少一个接头、聚合物或生物活性分子,其中所述接头、聚合物或生物活性分子通过经核糖体并入到所述多肽中的非天然编码的氨基酸的官能团附连到所述多肽。

[0890] 57.一种IL-2多肽,其包含附连到一个或多个非天然编码的氨基酸的接头、聚合物或生物活性分子,其中所述非天然编码的氨基酸在预选的位点处经核糖体并入到所述多肽中。

[0891] 58.一种在被诊断为患有癌症的人中减少肿瘤细胞的数目的方法,所述方法包括向需要这种减少的人给药包含实施方式56的PEG-IL-2A的药物组合物。

[0892] 59.实施方式58的方法,其中所述偶联物以约0.1μ/kg至约50μ/kg的剂量给药。

[0001] 序列表

[0002] <110> 安布罗克斯股份有限公司

[0003] <120> 白介素-2多肽偶联物及其用途

[0004] <130> AMBX-0227.00PCT

[0005] <150> 62/729,925

[0006] <151> 2018-09-11

[0007] <150> 62/815,964

[0008] <151> 2019-03-08

[0009] <160> 23

[0010] <170> PatentIn version 3.5

[0011] <210> 1

[0012] <211> 153

[0013] <212> PRT

[0014] <213> 人

[0015] <400> 1

[0016] Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

[0017] 1 5 10 15

[0018] Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu

[0019] 20 25 30

[0020] Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile

[0021] 35 40 45

[0022] Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe

[0023] 50 55 60

[0024] Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu

[0025] 65 70 75 80

[0026] Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys

[0027] 85 90 95

[0028] Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile

[0029] 100 105 110

[0030] Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala

[0031] 115 120 125

[0032] Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe

[0033] 130 135 140

[0034] Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

[0035] 145 150

[0036] <210> 2

[0037] <211> 133

[0038] <212> PRT

[0039] <213> 人

[0040] <400> 2

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

[0042] 1 5 10 15

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

[0044] 20 25 30

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

[0046] 35 40 45

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

[0048] 50 55 60

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

[0050] 65 70 75 80

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

[0052] 85 90 95

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

[0054] 100 105 110

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

[0056] 115 120 125

[0057] Ile Ser Thr Leu Thr

[0058] 130

[0059] <210> 3

[0060] <211> 133

[0061] <212> PRT

[0062] <213> 大肠杆菌(E. Coli)

[0063] <400> 3

[0064] Met Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

[0065] 1 5 10 15

[0066] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

[0067] 20 25 30

[0068] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

[0069] 35 40 45

[0070] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

[0071] 50 55 60

[0072] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

[0073] 65 70 75 80

[0074] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

[0075] 85 90 95

[0076] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

[0077] 100 105 110

[0078] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
[0079] 115 120 125
[0080] Ile Ser Thr Leu Thr
[0081] 130
[0082] <210> 4
[0083] <211> 399
[0084] <212> DNA
[0085] <213> 大肠杆菌(E. Coli)
[0086] <400> 4
[0087] atgccgacca gcagtagcac caagaaaact cagctgcagc tggagcatct gctgctggat 60
[0088] ttacagatga ttctgaatgg cattaataat tacaaaaatc cgaaactgac ccgcatgctg 120
[0089] accttcaagt tctacatgcc gaagaaggcc accgaactga agcatctgca gtgtttagaa 180
[0090] gaggaactga agccgctgga agaggtgctg aatttagccc agagcaaaaa cttccatctg 240
[0091] cgcccgcgcg atttaattag caatattaac gtgattgtgc tggaactgaa aggcagcgag 300
[0092] accaccttta tgtgcgagta cgcagatgag accgccacca tcgtggaatt tttaaaccgc 360
[0093] tggatcacct tcagccagag tatcattagc actttaacc 399
[0094] <210> 5
[0095] <211> 134
[0096] <212> PRT
[0097] <213> 大肠杆菌(E. Coli)
[0098] <400> 5
[0099] Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
[0100] 1 5 10 15
[0101] His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
[0102] 20 25 30
[0103] Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
[0104] 35 40 45
[0105] Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
[0106] 50 55 60
[0107] Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
[0108] 65 70 75 80
[0109] Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
[0110] 85 90 95
[0111] Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
[0112] 100 105 110
[0113] Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser
[0114] 115 120 125
[0115] Ile Ile Ser Thr Leu Thr
[0116] 130

[0117] <210> 6

[0118] <211> 402

[0119] <212> DNA

[0120] <213> 人

[0121] <400> 6

[0122] atggcaccga ccagcagtag caccaagaaa actcagctgc agctggagca tctgctgctg 60

[0123] gatttacaga tgattctgaa tggcattaat aattacaaaa atccgaaact gacccgcatg 120

[0124] ctgaccttca agttctacat gccgaagaag gccaccgaac tgaagcatct gcagtgttta 180

[0125] gaagaggaac tgaagccgct ggaagaggtg ctgaatttag cccagagcaa aaacttccat 240

[0126] ctgcgcccgc gcgatttaat tagcaatatt aacgtgattg tgctggaact gaaaggcagc 300

[0127] gagaccacct ttatgtgcga gtacgcagat gagaccgcca ccatcgtgga atttttaaac 360

[0128] cgctggatca ccttcagcca gagtatcatt agcactttaa cc 402

[0129] <210> 7

[0130] <211> 132

[0131] <212> PRT

[0132] <213> 人

[0133] <400> 7

[0134] Met Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

[0135] 1 5 10 15

[0136] Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

[0137] 20 25 30

[0138] Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys

[0139] 35 40 45

[0140] Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

[0141] 50 55 60

[0142] Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

[0143] 65 70 75 80

[0144] Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

[0145] 85 90 95

[0146] Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr

[0147] 100 105 110

[0148] Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile

[0149] 115 120 125

[0150] Ser Thr Leu Thr

[0151] 130

[0152] <210> 8

[0153] <211> 396

[0154] <212> DNA

[0155] <213> 人

[0156] <400> 8

[0157] atgaccagca gtagcaccaa gaaaactcag ctgcagctgg agcatctgct gctggattta 60

[0158] cagatgattc tgaatggcat taataattac aaaaatccga aactgacccg catgctgacc 120

[0159] ttcaagttct acatgccgaa gaaggccacc gaactgaagc atctgcagtg tttagaagag 180

[0160] gaactgaagc cgctggaaga ggtgctgaat ttagcccaga gcaaaaactt ccatctgcgc 240

[0161] ccgcgcgatt taattagcaa tattaacgtg attgtgctgg aactgaaagg cagcgagacc 300

[0162] acctttatgt gcgagtacgc agatgagacc gccaccatcg tggaattttt aaaccgctgg 360

[0163] atcaccttca gccagagtat cattagcact ttaacc 396

[0164] <210> 9

[0165] <211> 133

[0166] <212> PRT

[0167] <213> 人

[0168] <220>

[0169] <221> misc_feature

[0170] <222> (42)..(42)

[0171] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸

[0172] <400> 9

[0173] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

[0174] 1 5 10 15

[0175] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

[0176] 20 25 30

[0177] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Xaa Lys Phe Tyr Met Pro Lys

[0178] 35 40 45

[0179] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

[0180] 50 55 60

[0181] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

[0182] 65 70 75 80

[0183] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

[0184] 85 90 95

[0185] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

[0186] 100 105 110

[0187] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

[0188] 115 120 125

[0189] Ile Ser Thr Leu Thr

[0190] 130

[0191] <210> 10

[0192] <211> 133

[0193] <212> PRT

[0194] <213> 人

[0195] <220>

[0196] <221> misc_feature

[0197] <222> (44)..(44)

[0198] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸

[0199] <400> 10

[0200] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

[0201] 1 5 10 15

[0202] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

[0203] 20 25 30

[0204] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Xaa Tyr Met Pro Lys

[0205] 35 40 45

[0206] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

[0207] 50 55 60

[0208] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

[0209] 65 70 75 80

[0210] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

[0211] 85 90 95

[0212] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

[0213] 100 105 110

[0214] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

[0215] 115 120 125

[0216] Ile Ser Thr Leu Thr

[0217] 130

[0218] <210> 11

[0219] <211> 133

[0220] <212> PRT

[0221] <213> 人

[0222] <220>

[0223] <221> misc_feature

[0224] <222> (45)..(45)

[0225] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸

[0226] <400> 11

[0227] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

[0228] 1 5 10 15

[0229] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

[0230] 20 25 30

[0231] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Xaa Met Pro Lys

[0232] 35 40 45

[0233] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

[0234] 50 55 60

[0235] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

[0236] 65 70 75 80

[0237] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

[0238] 85 90 95

[0239] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

[0240] 100 105 110

[0241] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

[0242] 115 120 125

[0243] Ile Ser Thr Leu Thr

[0244] 130

[0245] <210> 12

[0246] <211> 133

[0247] <212> PRT

[0248] <213> 人

[0249] <220>

[0250] <221> misc_feature

[0251] <222> (65)..(65)

[0252] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸

[0253] <400> 12

[0254] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

[0255] 1 5 10 15

[0256] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

[0257] 20 25 30

[0258] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

[0259] 35 40 45

[0260] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

[0261] 50 55 60

[0262] Xaa Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

[0263] 65 70 75 80

[0264] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

[0265] 85 90 95

[0266] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

[0267] 100 105 110

[0268] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

[0269] 115 120 125

[0270] Ile Ser Thr Leu Thr

[0271] 130

[0272] <210> 13

[0273] <211> 133

[0274] <212> PRT

[0275] <213> 人

[0276] <220>

[0277] <221> misc_feature

[0278] <222> (72)..(72)

[0279] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸

[0280] <400> 13

[0281] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

[0282] 1 5 10 15

[0283] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

[0284] 20 25 30

[0285] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

[0286] 35 40 45

[0287] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

[0288] 50 55 60

[0289] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Xaa Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

[0290] 65 70 75 80

[0291] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

[0292] 85 90 95

[0293] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

[0294] 100 105 110

[0295] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

[0296] 115 120 125

[0297] Ile Ser Thr Leu Thr

[0298] 130

[0299] <210> 14

[0300] <211> 133

[0301] <212> PRT

[0302] <213> 人

[0303] <220>

[0304] <221> misc_feature

[0305] <222> (61)..(61)

[0306] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸

[0307] <400> 14

[0308] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

[0309] 1 5 10 15

[0310] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

[0311] 20 25 30

[0312] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
[0313] 35 40 45
[0314] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Xaa Glu Leu Lys
[0315] 50 55 60
[0316] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
[0317] 65 70 75 80
[0318] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
[0319] 85 90 95
[0320] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
[0321] 100 105 110
[0322] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
[0323] 115 120 125
[0324] Ile Ser Thr Leu Thr
[0325] 130
[0326] <210> 15
[0327] <211> 133
[0328] <212> PRT
[0329] <213> 人
[0330] <220>
[0331] <221> misc_feature
[0332] <222> (62)..(62)
[0333] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸
[0334] <220>
[0335] <221> misc_feature
[0336] <222> (68)..(68)
[0337] <223> Xaa = U =非天然氨基酸
[0338] <400> 15
[0339] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
[0340] 1 5 10 15
[0341] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
[0342] 20 25 30
[0343] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
[0344] 35 40 45
[0345] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Xaa Leu Lys
[0346] 50 55 60
[0347] Pro Leu Glu Xaa Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
[0348] 65 70 75 80
[0349] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
[0350] 85 90 95

[0351] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
[0352] 100 105 110
[0353] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
[0354] 115 120 125
[0355] Ile Ser Thr Leu Thr
[0356] 130
[0357] <210> 16
[0358] <211> 133
[0359] <212> PRT
[0360] <213> 人
[0361] <220>
[0362] <221> misc_feature
[0363] <222> (35)..(35)
[0364] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸
[0365] <400> 16
[0366] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
[0367] 1 5 10 15
[0368] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
[0369] 20 25 30
[0370] Asn Pro Xaa Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
[0371] 35 40 45
[0372] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
[0373] 50 55 60
[0374] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
[0375] 65 70 75 80
[0376] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
[0377] 85 90 95
[0378] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
[0379] 100 105 110
[0380] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
[0381] 115 120 125
[0382] Ile Ser Thr Leu Thr
[0383] 130
[0384] <210> 17
[0385] <211> 133
[0386] <212> PRT
[0387] <213> 人
[0388] <220>
[0389] <221> misc_feature

[0390] <222> (38)..(38)

[0391] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸

[0392] <400> 17

[0393] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

[0394] 1 5 10 15

[0395] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

[0396] 20 25 30

[0397] Asn Pro Lys Leu Thr Xaa Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

[0398] 35 40 45

[0399] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

[0400] 50 55 60

[0401] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

[0402] 65 70 75 80

[0403] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

[0404] 85 90 95

[0405] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

[0406] 100 105 110

[0407] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

[0408] 115 120 125

[0409] Ile Ser Thr Leu Thr

[0410] 130

[0411] <210> 18

[0412] <211> 133

[0413] <212> PRT

[0414] <213> 人

[0415] <220>

[0416] <221> misc_feature

[0417] <222> (43)..(43)

[0418] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸

[0419] <400> 18

[0420] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

[0421] 1 5 10 15

[0422] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

[0423] 20 25 30

[0424] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Xaa Phe Tyr Met Pro Lys

[0425] 35 40 45

[0426] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

[0427] 50 55 60

[0428] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

[0429] 65 70 75 80
[0430] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
[0431] 85 90 95
[0432] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
[0433] 100 105 110
[0434] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
[0435] 115 120 125
[0436] Ile Ser Thr Leu Thr
[0437] 130
[0438] <210> 19
[0439] <211> 133
[0440] <212> PRT
[0441] <213> 人
[0442] <220>
[0443] <221> misc_feature
[0444] <222> (37)..(37)
[0445] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸
[0446] <400> 19
[0447] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
[0448] 1 5 10 15
[0449] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
[0450] 20 25 30
[0451] Asn Pro Lys Leu Xaa Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
[0452] 35 40 45
[0453] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
[0454] 50 55 60
[0455] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
[0456] 65 70 75 80
[0457] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
[0458] 85 90 95
[0459] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
[0460] 100 105 110
[0461] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
[0462] 115 120 125
[0463] Ile Ser Thr Leu Thr
[0464] 130
[0465] <210> 20
[0466] <211> 133
[0467] <212> PRT

[0468] <213> 人

[0469] <220>

[0470] <221> misc_feature

[0471] <222> (3)..(3)

[0472] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸

[0473] <400> 20

[0474] Ala Pro Xaa Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

[0475] 1 5 10 15

[0476] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

[0477] 20 25 30

[0478] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

[0479] 35 40 45

[0480] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

[0481] 50 55 60

[0482] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

[0483] 65 70 75 80

[0484] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

[0485] 85 90 95

[0486] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

[0487] 100 105 110

[0488] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

[0489] 115 120 125

[0490] Ile Ser Thr Leu Thr

[0491] 130

[0492] <210> 21

[0493] <211> 133

[0494] <212> PRT

[0495] <213> 人

[0496] <220>

[0497] <221> misc_feature

[0498] <222> (64)..(64)

[0499] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸

[0500] <400> 21

[0501] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

[0502] 1 5 10 15

[0503] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

[0504] 20 25 30

[0505] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

[0506] 35 40 45

[0507] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Xaa
[0508] 50 55 60
[0509] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
[0510] 65 70 75 80
[0511] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
[0512] 85 90 95
[0513] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
[0514] 100 105 110
[0515] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
[0516] 115 120 125
[0517] Ile Ser Thr Leu Thr
[0518] 130
[0519] <210> 22
[0520] <211> 133
[0521] <212> PRT
[0522] <213> 人
[0523] <220>
[0524] <221> misc_feature
[0525] <222> (68)..(68)
[0526] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸
[0527] <400> 22
[0528] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
[0529] 1 5 10 15
[0530] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
[0531] 20 25 30
[0532] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
[0533] 35 40 45
[0534] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
[0535] 50 55 60
[0536] Pro Leu Glu Xaa Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
[0537] 65 70 75 80
[0538] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
[0539] 85 90 95
[0540] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
[0541] 100 105 110
[0542] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
[0543] 115 120 125
[0544] Ile Ser Thr Leu Thr
[0545] 130

[0546] <210> 23

[0547] <211> 133

[0548] <212> PRT

[0549] <213> 人

[0550] <220>

[0551] <221> misc_feature

[0552] <222> (107)..(107)

[0553] <223> Xaa = *U =非天然氨基酸

[0554] <400> 23

[0555] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

[0556] 1 5 10 15

[0557] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

[0558] 20 25 30

[0559] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

[0560] 35 40 45

[0561] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

[0562] 50 55 60

[0563] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

[0564] 65 70 75 80

[0565] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

[0566] 85 90 95

[0567] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Xaa Ala Asp Glu Thr Ala

[0568] 100 105 110

[0569] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

[0570] 115 120 125

[0571] Ile Ser Thr Leu Thr

[0572] 130

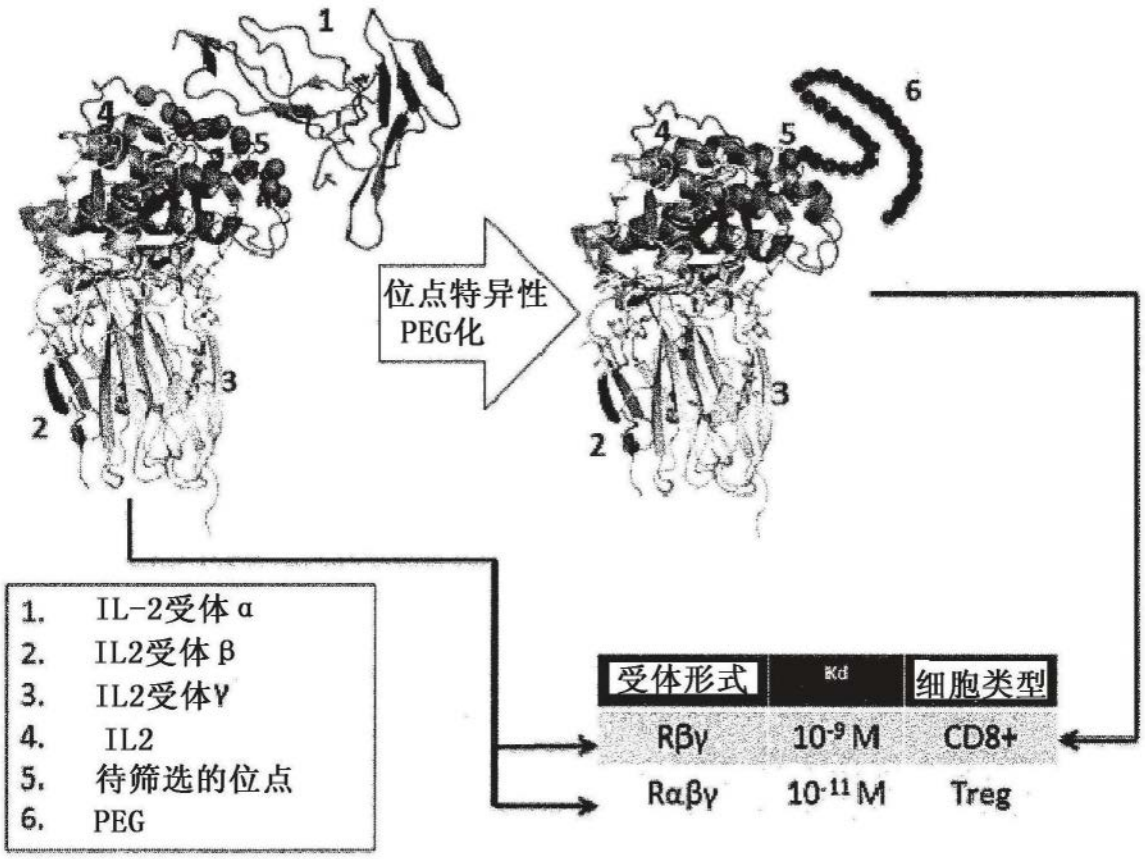

1
2
3
4
5
6
位点特异性
PEG化
1. IL-2受体α
2. IL2受体β
3. IL2受体γ
4. IL2
5. 待筛选的位点
6. PEG
受体形式
Kd
细胞类型
Rβγ
10-9 M
CD8+
Rαβγ
10-11 M
Treg

图1

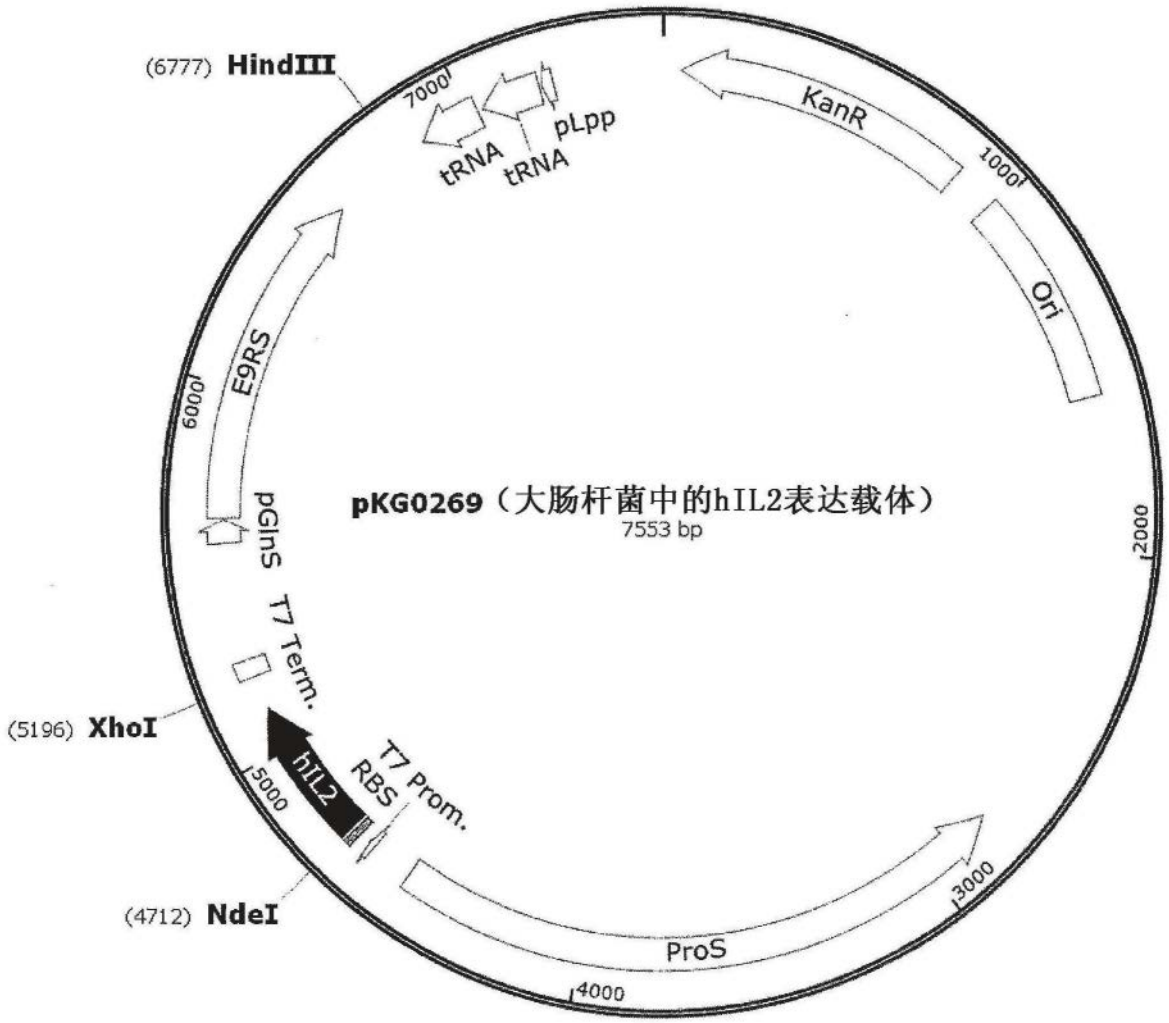

(6777) HindIII
7000
tRNA
tRNA
pLpp
KanR
1000
Ori
2000
pKG0269（大肠杆菌中的hIL2表达载体）
7553 bp
E9RS
6000
pGlnS
T7 Term.
(5196) XhoI
hIL2
T7 Prom.
RBS
5000
(4712) NdeI
ProS
3000
4000

图2

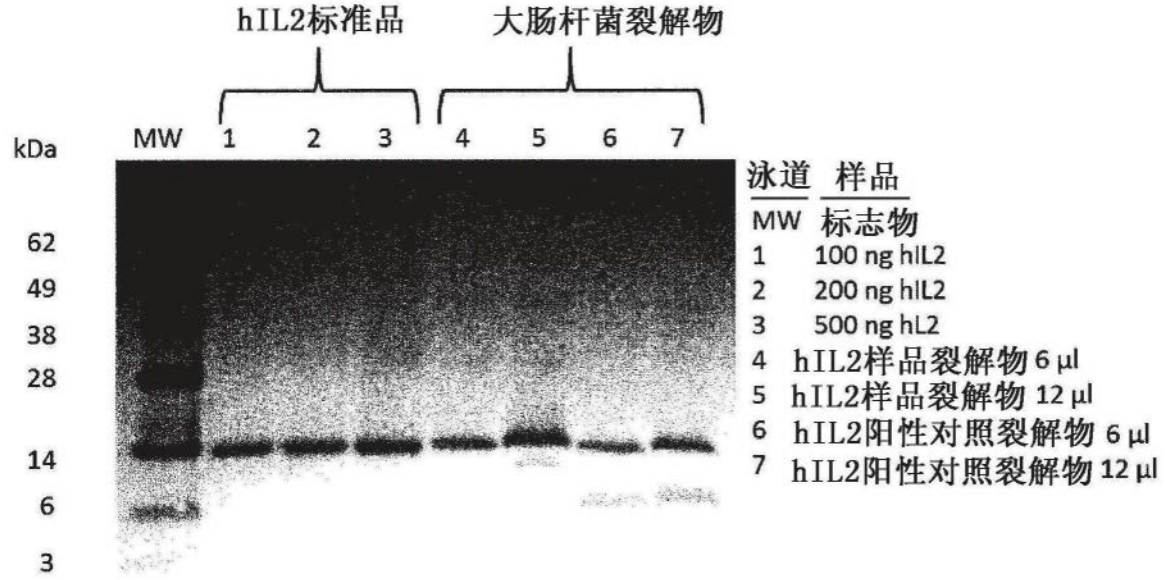

hIL2标准品
大肠杆菌裂解物
kDa
MW
1
2
3
4
5
6
7
62
49
38
28
14
6
3
泳道 样品
MW 标志物
1 100 ng hIL2
2 200 ng hIL2
3 500 ng hL2
4 hIL2样品裂解物 6 μl
5 hIL2样品裂解物 12 μl
6 hIL2阳性对照裂解物 6 μl
7 hIL2阳性对照裂解物 12 μl

图3A

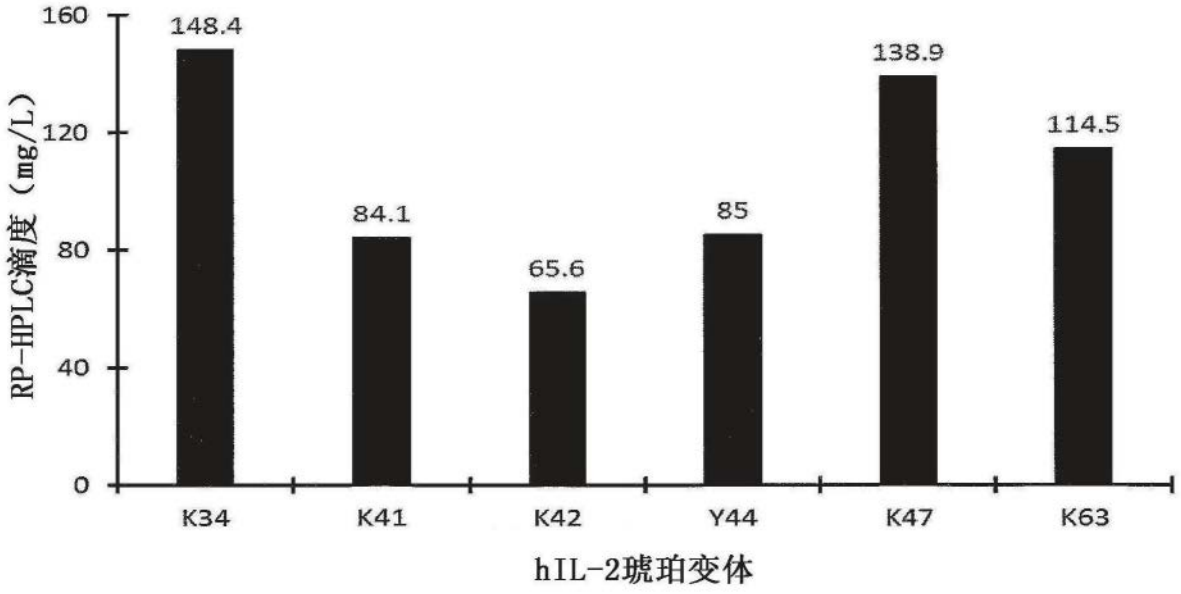

RP-HPLC滴度（mg/L）
160
120
80
40
0
148.4
84.1
65.6
85
138.9
114.5
K34
K41
K42
Y44
K47
K63
hIL-2琥珀变体

图3B

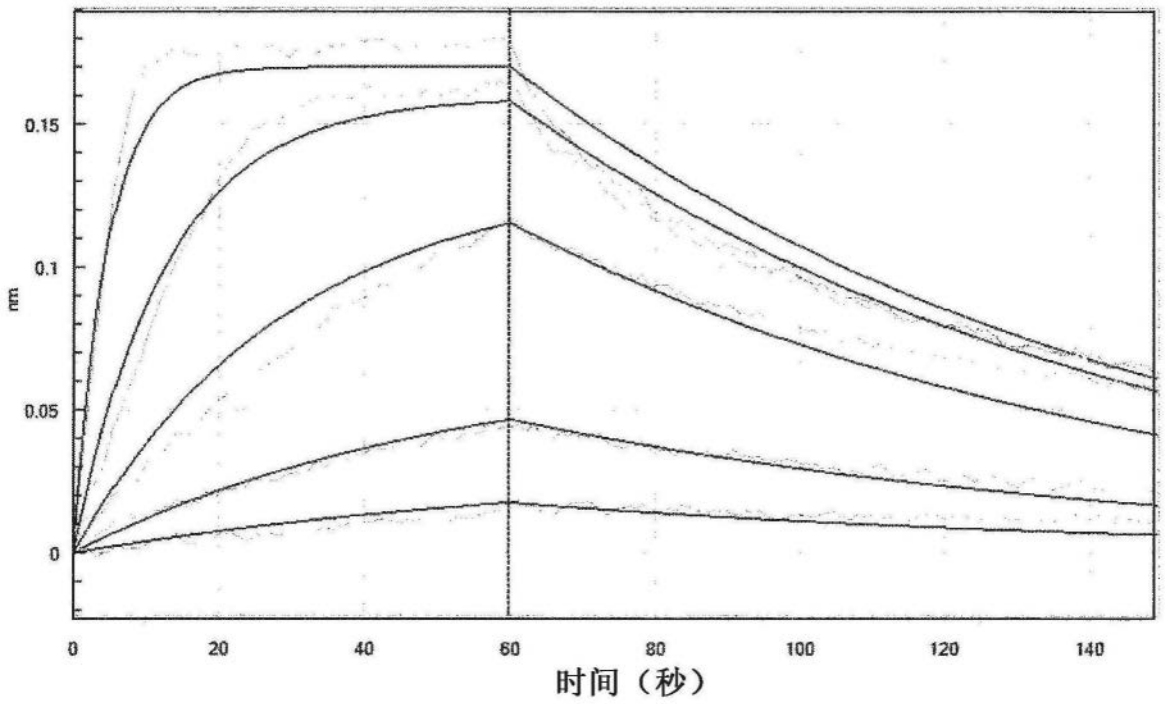


图4A

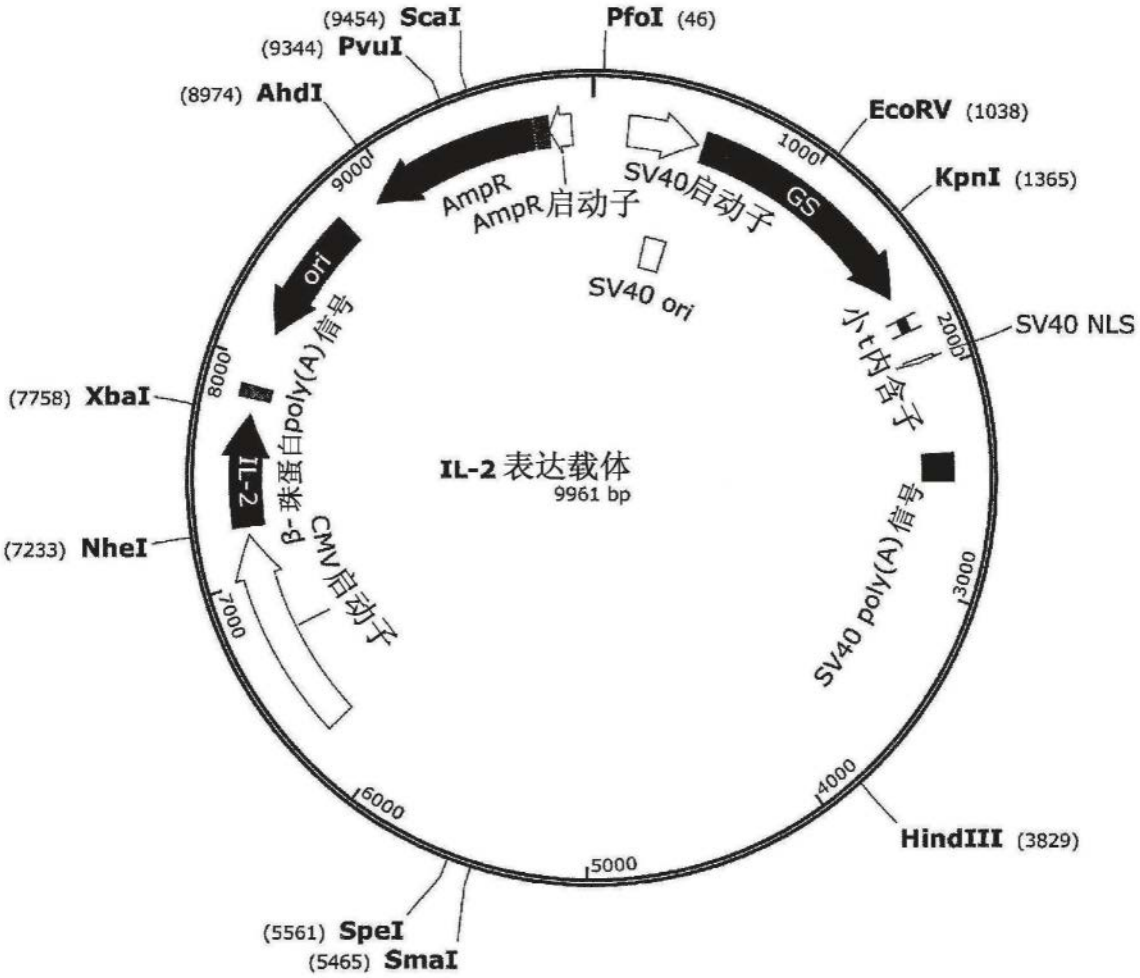

(9454) ScaI
PfoI (46)
(9344) PvuI
(8974) AhdI
EcoRV (1038)
KpnI (1365)
SV40 NLS
(7758) XbaI
(7233) NheI
HindIII (3829)
(5561) SpeI
(5465) SmaI
AmpR
AmpR启动子
SV40启动子
GS
ori
SV40 ori
小t内含子
SV40 poly(A)信号
IL-2
β-珠蛋白poly(A)信号
CMV启动子
IL-2 表达载体
9961 bp
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000

图4B

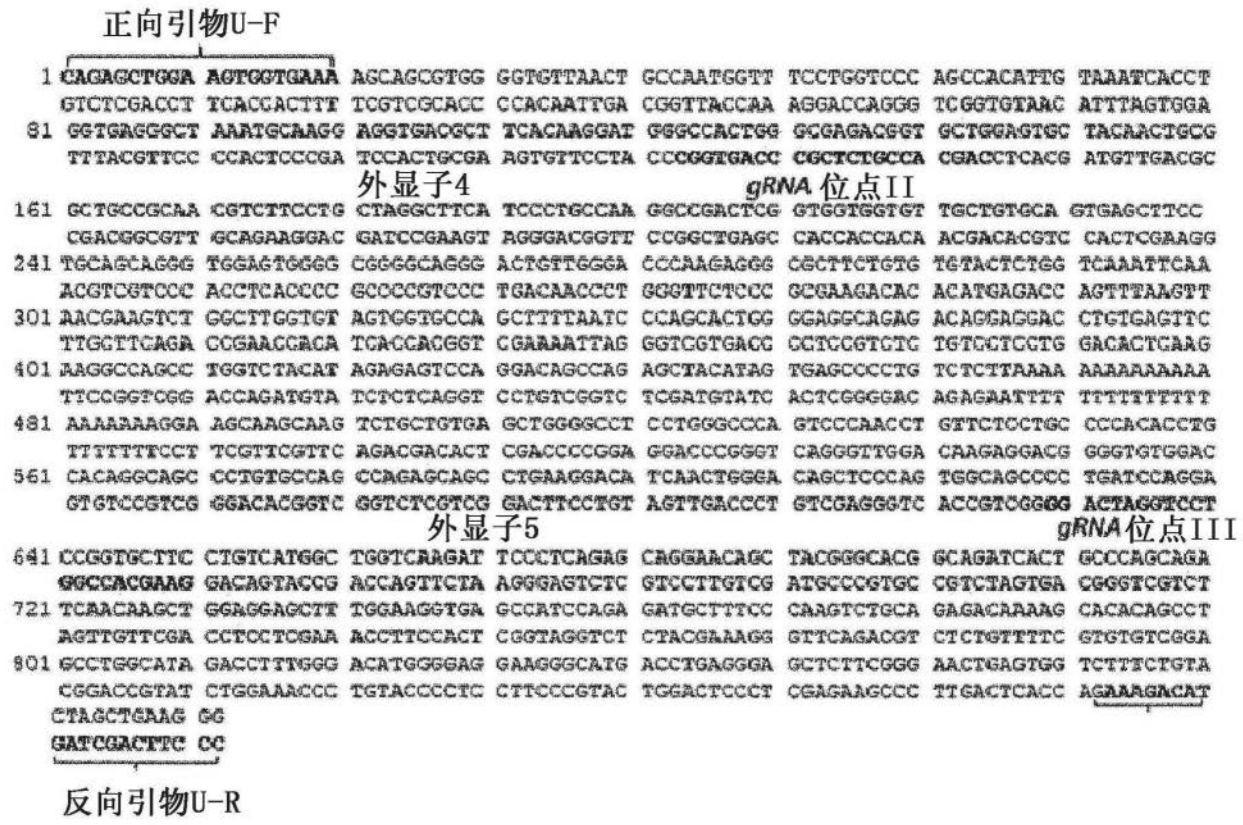


图5

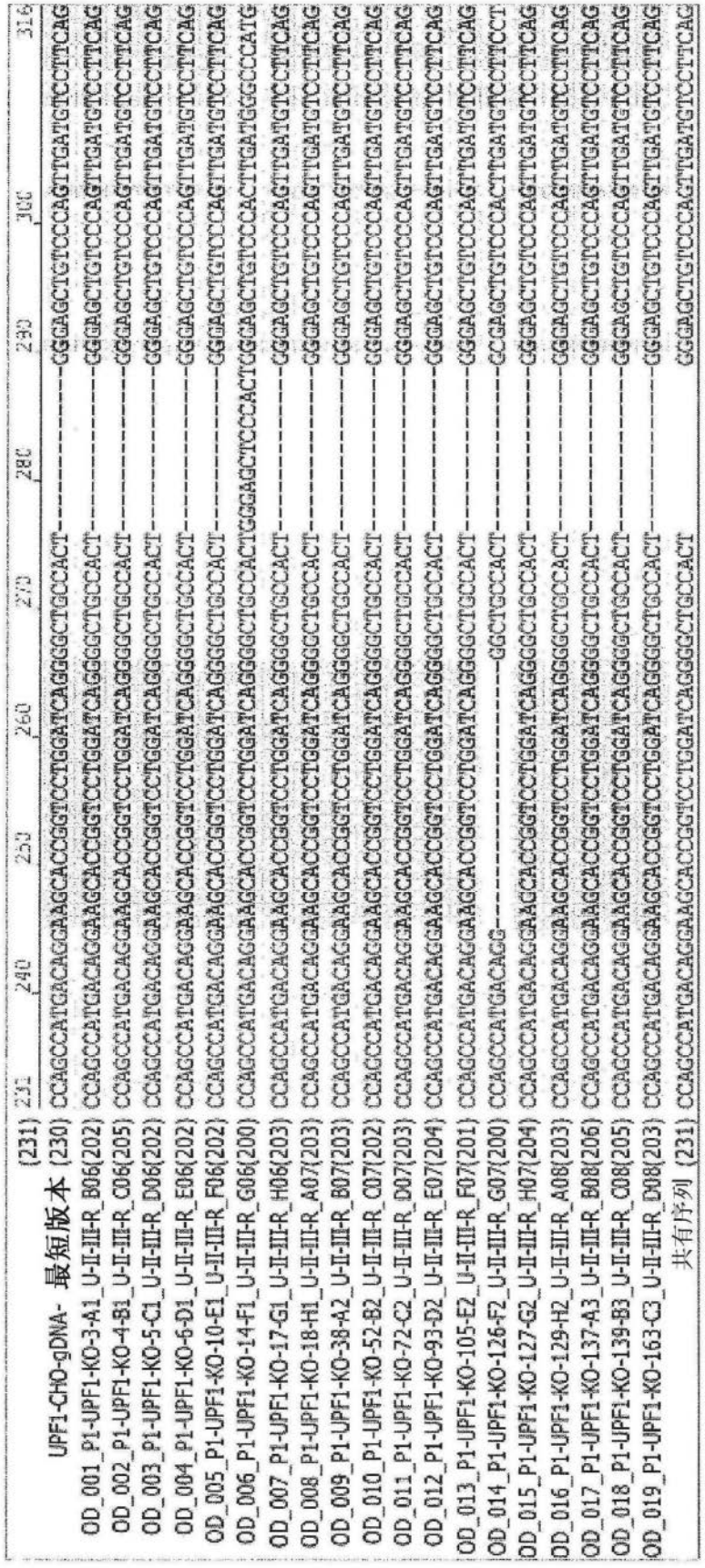

UPF1-CHO-gDNA- 最短版本 (231)
OD_001_P1-UPF1-KO-3-A1_U-II-III-R_B06(202) (230)
OD_002_P1-UPF1-KO-4-B1_U-II-III-R_C06(205) (231)
OD_003_P1-UPF1-KO-5-C1_U-II-III-R_D06(202) (232)
OD_004_P1-UPF1-KO-6-D1_U-II-III-R_E06(202) (233)
OD_005_P1-UPF1-KO-10-E1_U-II-III-R_F06(202) (234)
OD_006_P1-UPF1-KO-14-F1_U-II-III-R_G06(200) (235)
OD_007_P1-UPF1-KO-17-G1_U-II-III-R_H06(203) (236)
OD_008_P1-UPF1-KO-18-H1_U-II-III-R_A07(203) (237)
OD_009_P1-UPF1-KO-38-A2_U-II-III-R_B07(203) (238)
OD_010_P1-UPF1-KO-52-B2_U-II-III-R_C07(202) (239)
OD_011_P1-UPF1-KO-72-C2_U-II-III-R_D07(203) (240)
OD_012_P1-UPF1-KO-93-D2_U-II-III-R_E07(204) (241)
OD_013_P1-UPF1-KO-105-E2_U-II-III-R_F07(201) (242)
OD_014_P1-UPF1-KO-126-F2_U-II-III-R_G07(200) (243)
OD_015_P1-UPF1-KO-127-G2_U-II-III-R_H07(204) (244)
OD_016_P1-UPF1-KO-129-H2_U-II-III-R_A08(203) (245)
OD_017_P1-UPF1-KO-137-A3_U-II-III-R_B08(206) (246)
OD_018_P1-UPF1-KO-139-B3_U-II-III-R_C08(205) (247)
OD_019_P1-UPF1-KO-163-C3_U-II-III-R_D08(203) (248)
共有序列 (249)

图6

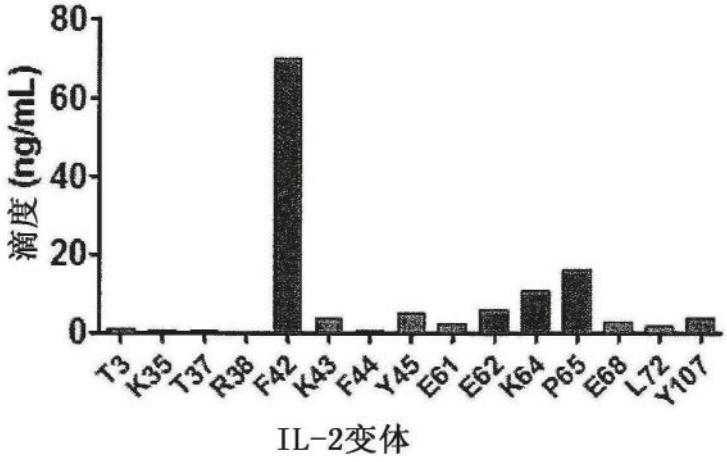

滴度 (ng/mL)
80
60
40
20
0
T3
K35
T37
R38
F42
K43
F44
Y45
E61
E62
K64
P65
E68
L72
Y107
IL-2变体

图7A

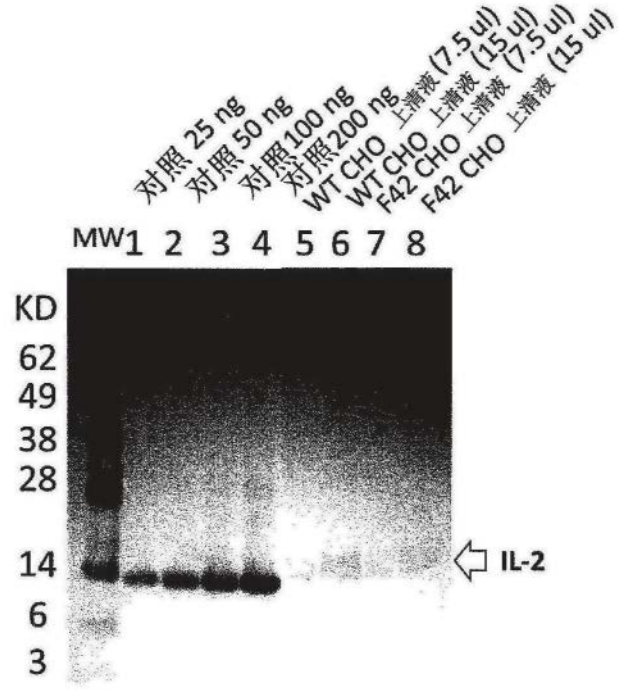

对照 25 ng
对照 50 ng
对照100 ng
对照200 ng
WT CHO 上清液 (7.5 ul)
WT CHO 上清液 (15 ul)
F42 CHO 上清液 (7.5 ul)
F42 CHO 上清液 (15 ul)
MW
1 2 3 4 5 6 7 8
KD
62
49
38
28
14
6
3
IL-2

图7B

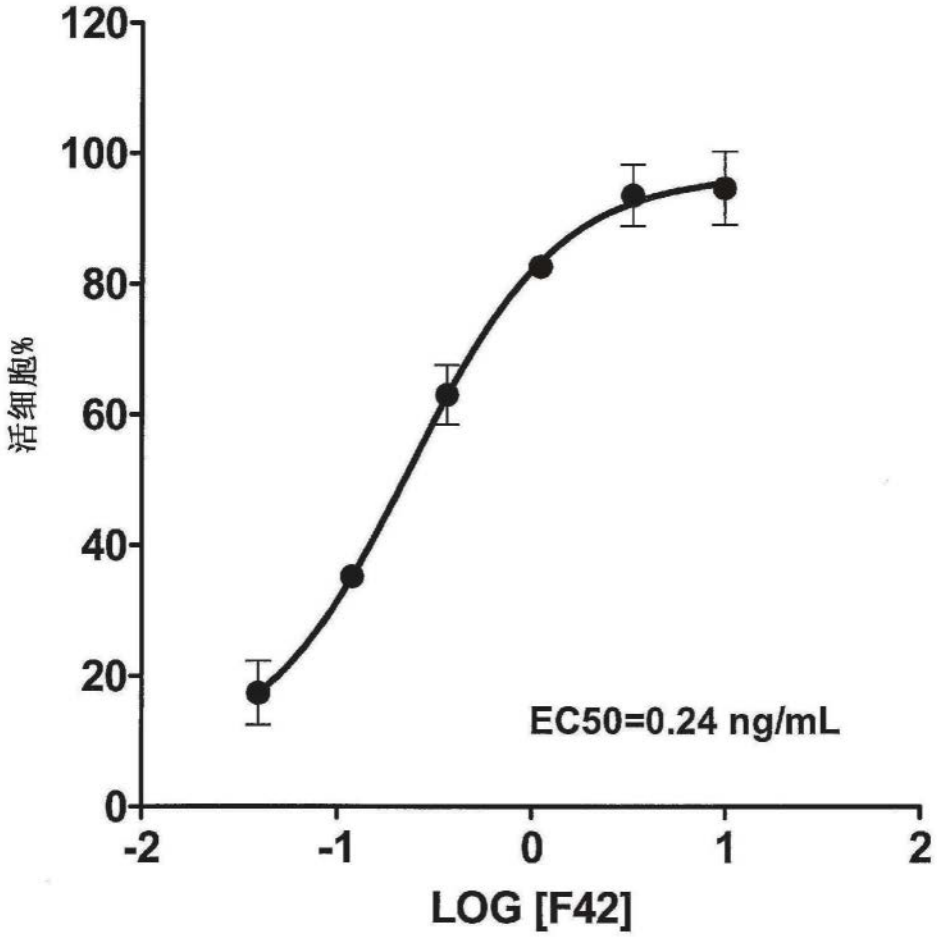


图8

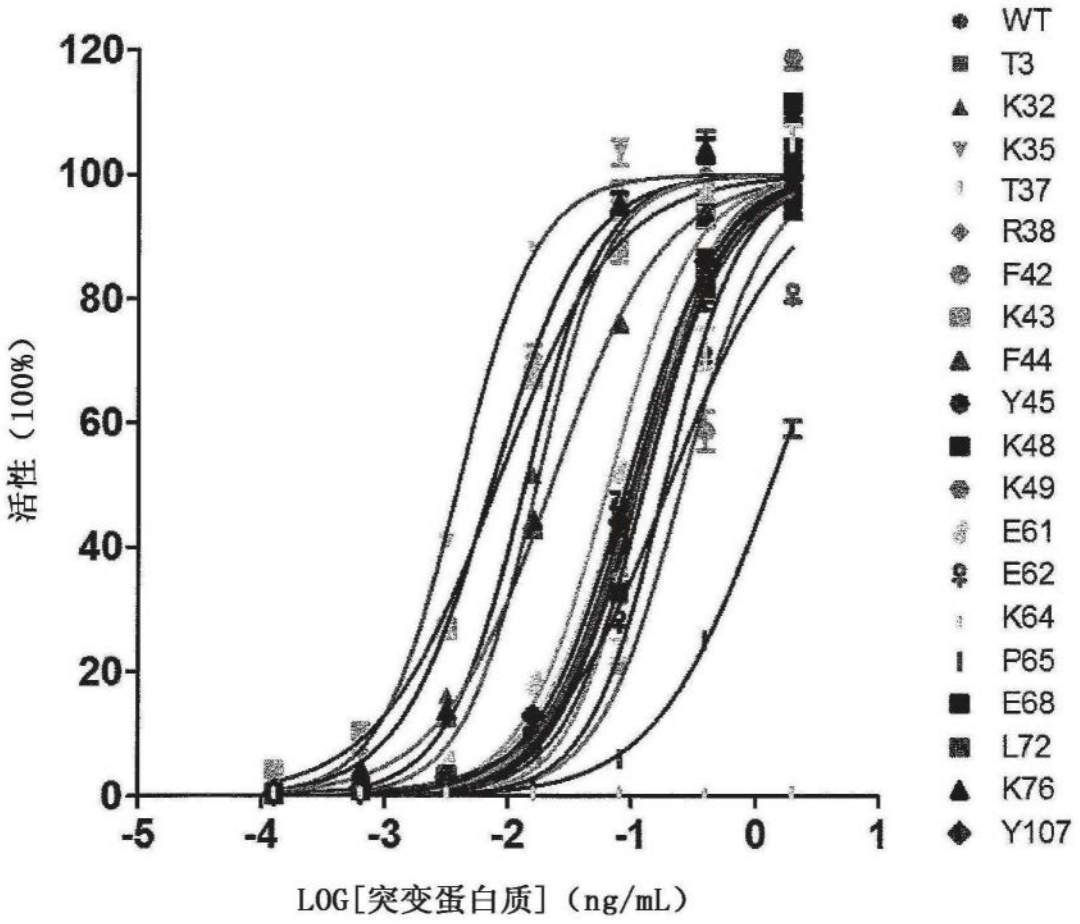

120
100
80
60
40
20
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
活性（100%）
LOG[突变蛋白质]（ng/mL）
WT
T3
K32
K35
T37
R38
F42
K43
F44
Y45
K48
K49
E61
E62
K64
P65
E68
L72
K76
Y107

图9

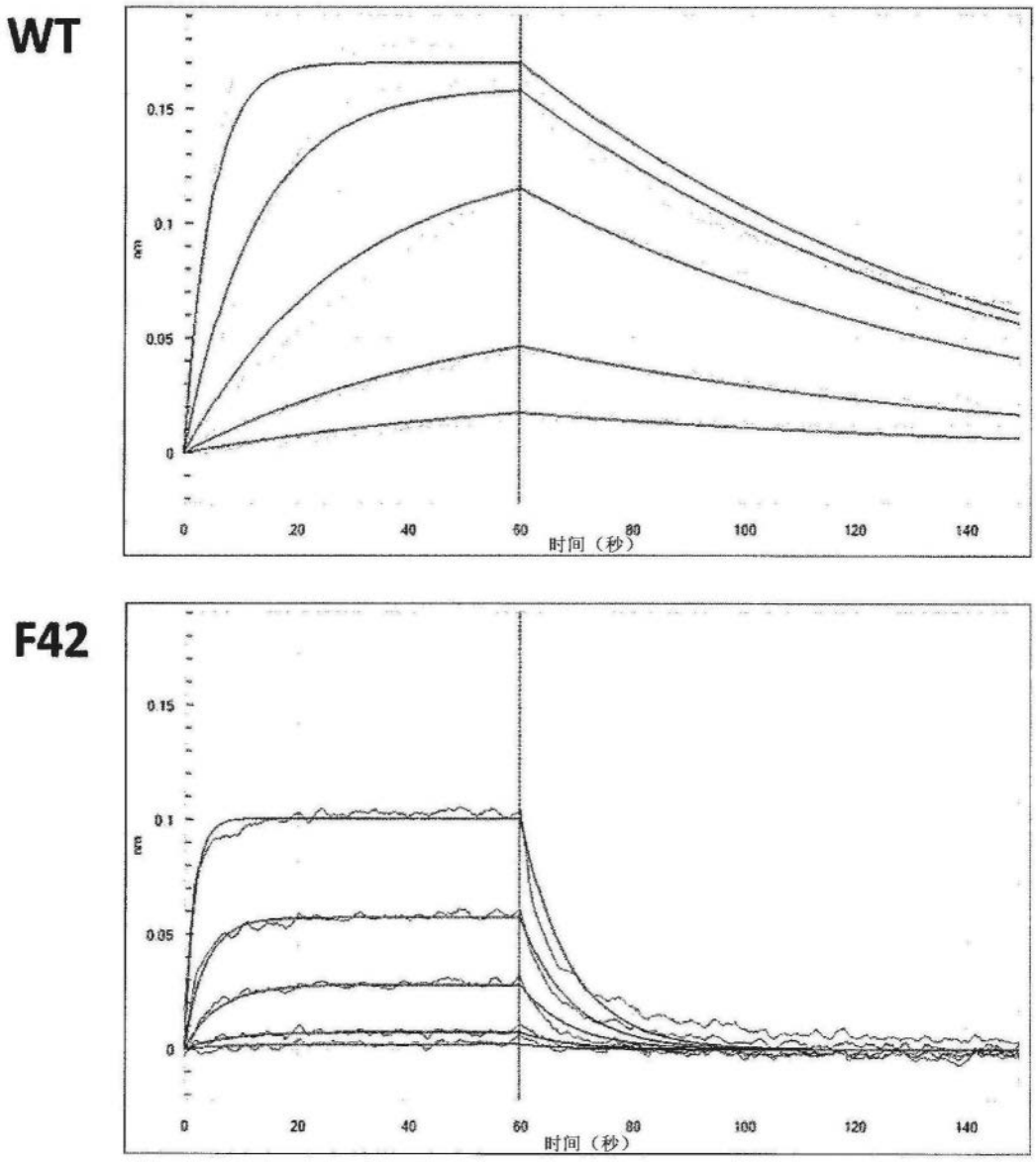


图10A

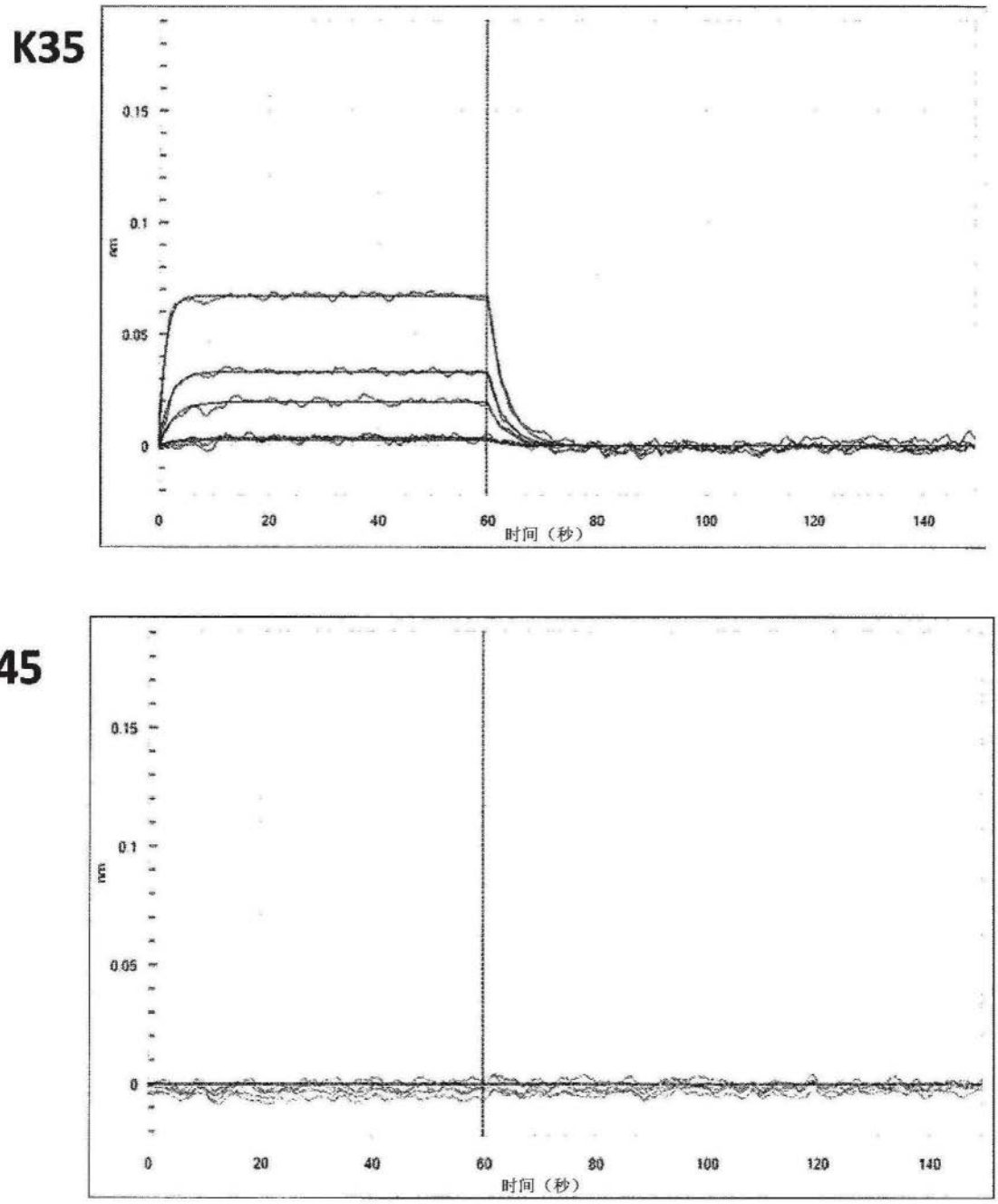

K35
0.15
0.1
0.05
0
nm
0
20
40
60
80
100
120
140
时间（秒）
Y45
0.15
0.1
0.05
0
nm
0
20
40
60
80
100
120
140
时间（秒）

图10B

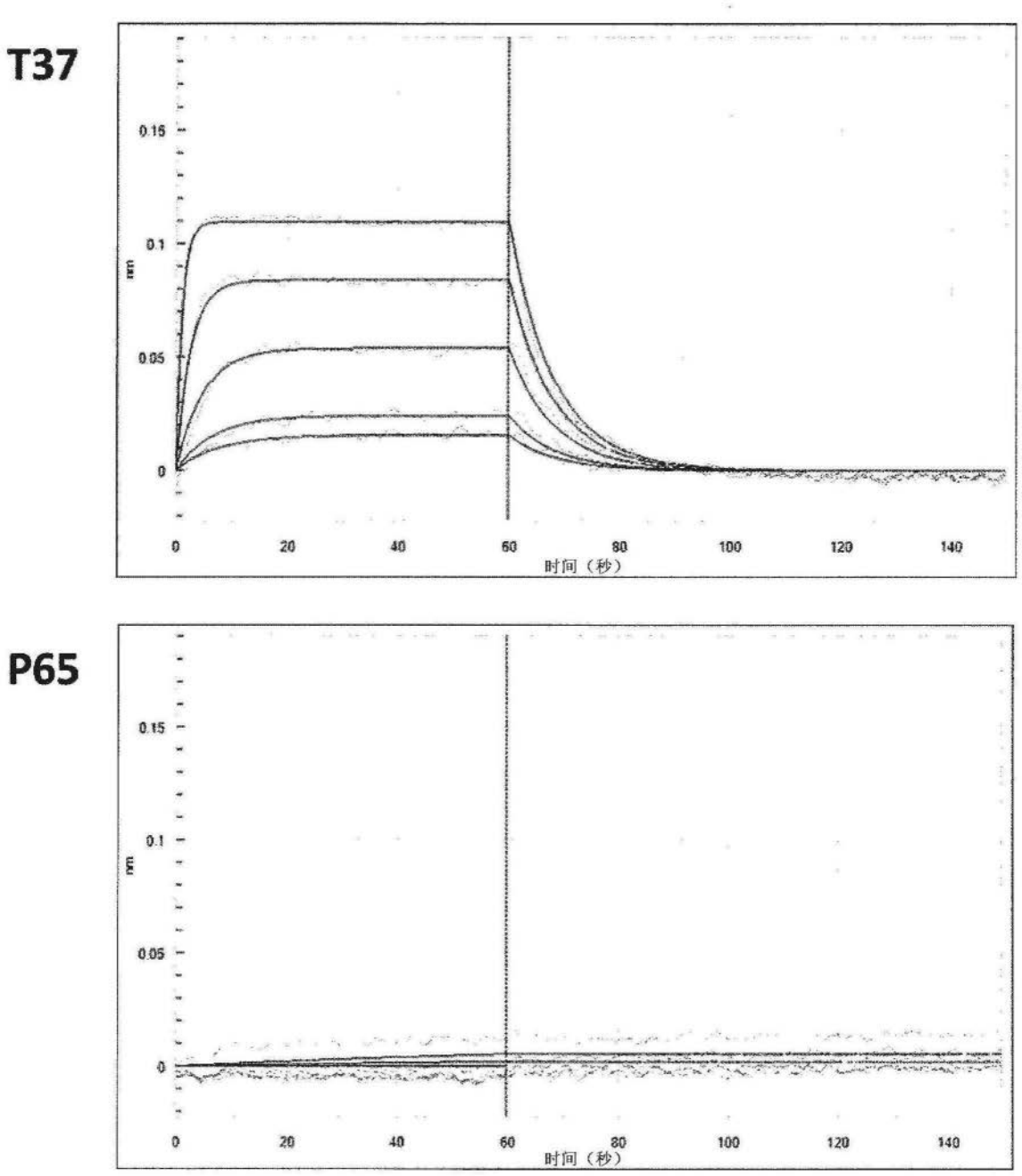

T37
0.15
0.1
0.05
0
nm
0
20
40
60
80
100
120
140
时间（秒）
P65
0.15
0.1
0.05
0
nm
0
20
40
60
80
100
120
140
时间（秒）

图10C

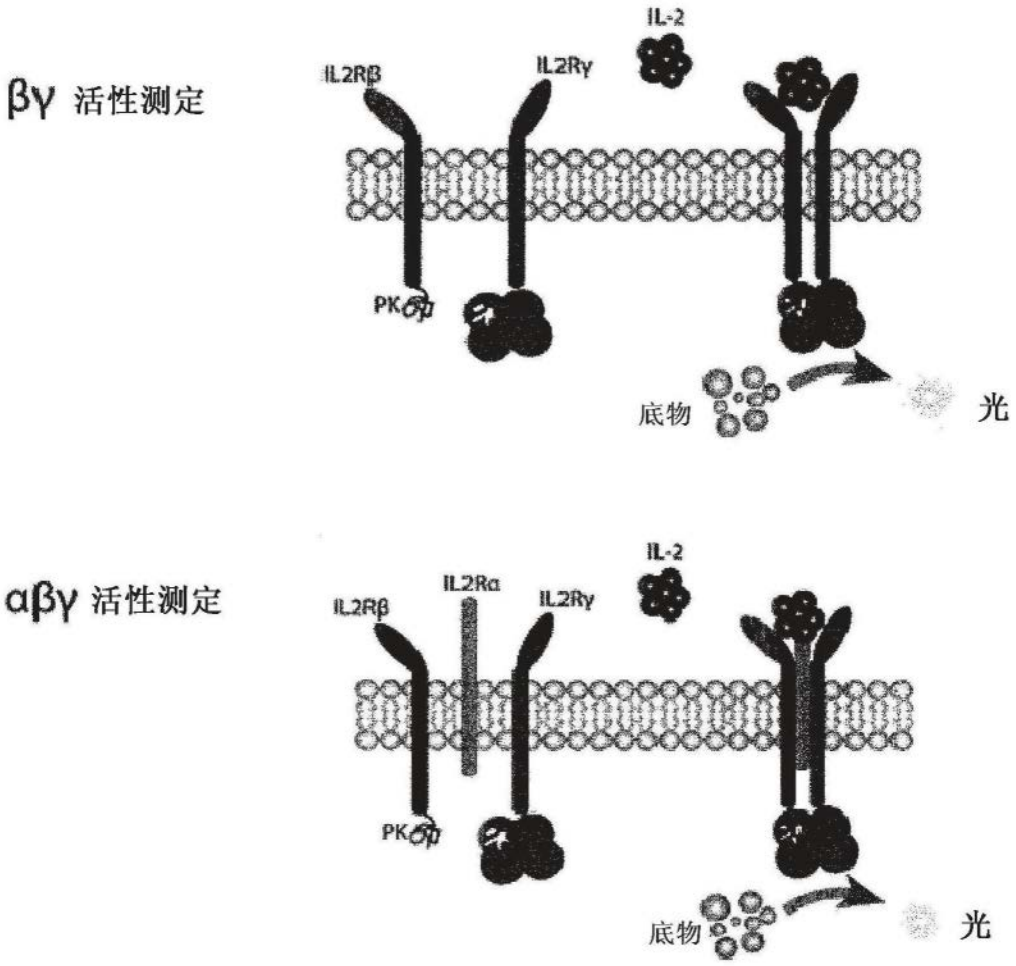

βγ 活性测定
IL-2
IL2Rβ
IL2Rγ
PK
底物
光
αβγ 活性测定
IL-2
IL2Rα
IL2Rβ
IL2Rγ
PK
底物
光

图11

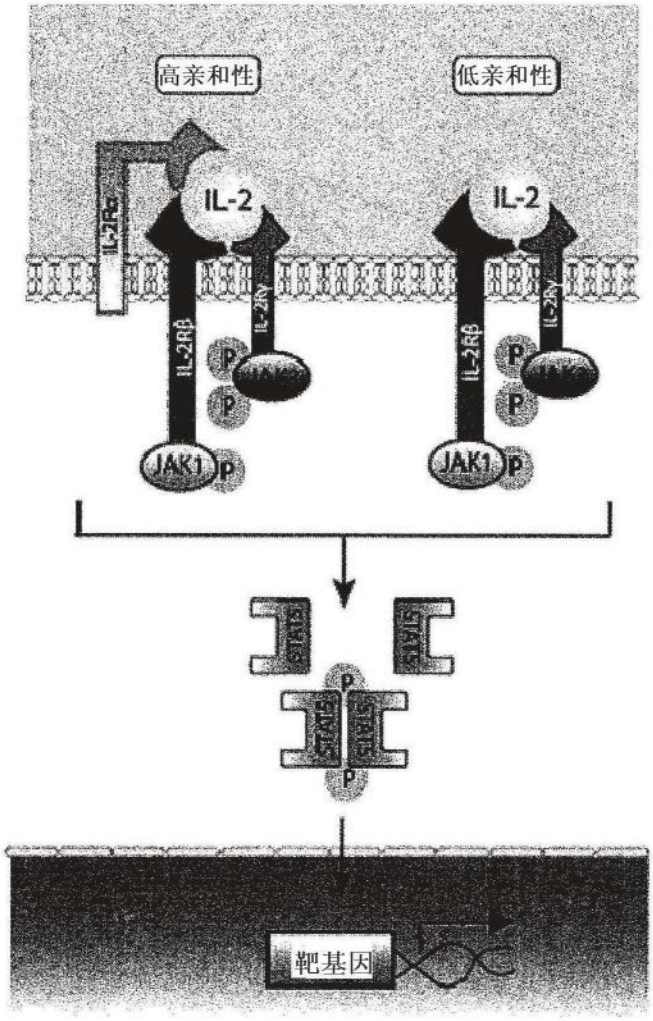

高亲和性
低亲和性
IL-2
IL-2
IL-2Rα
IL-2Rβ
IL-2Rγ
IL-2Rβ
IL-2Rγ
P
P
P
P
JAK1
P
JAK1
P
STAT5
STAT5
P
STAT5
STAT5
P
靶基因

图12

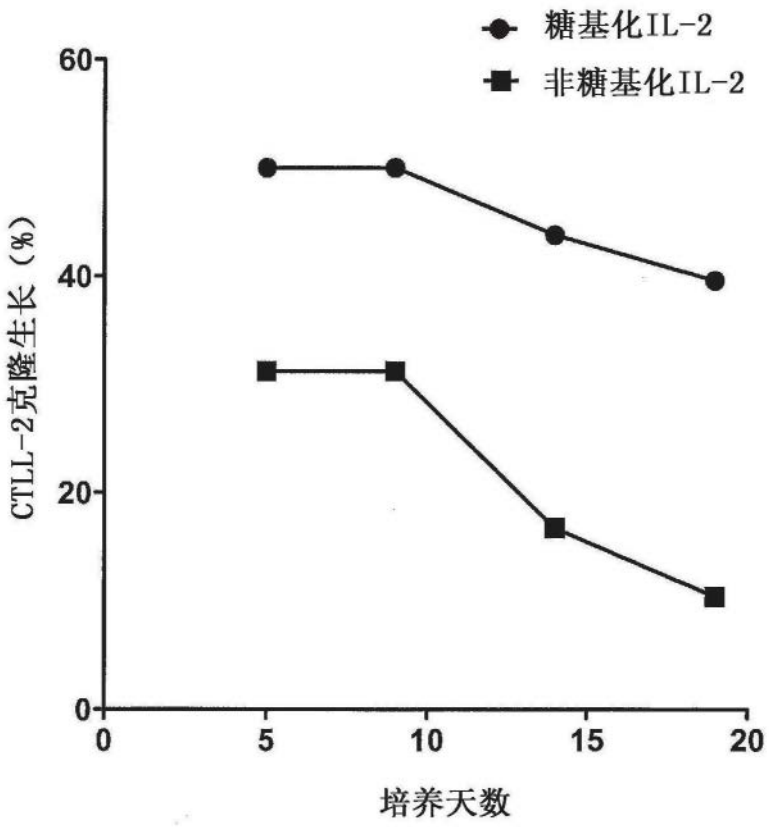


图13

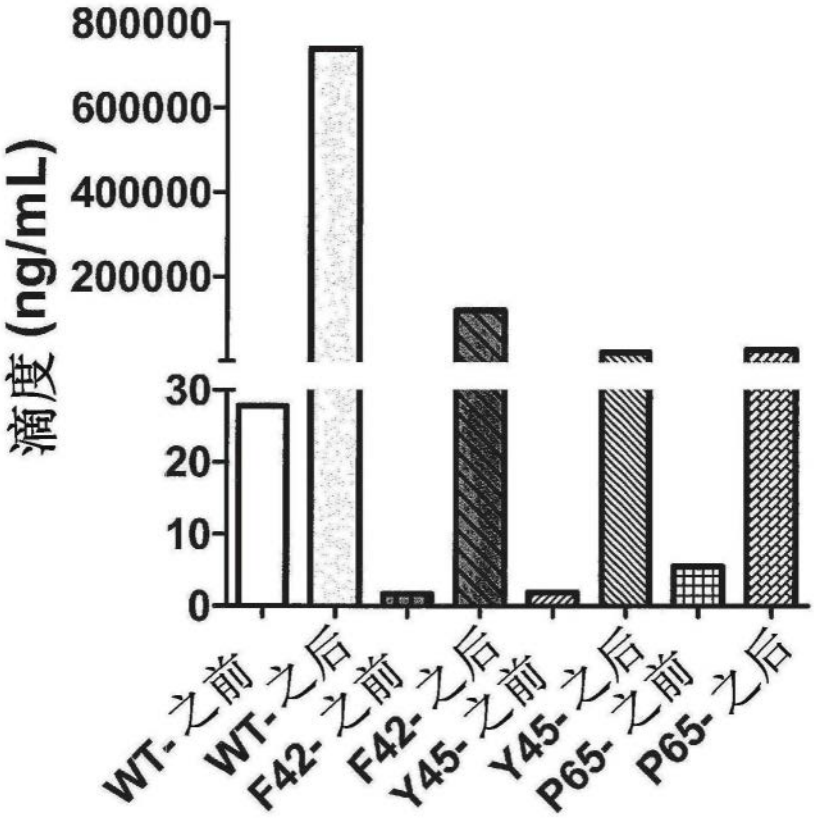

滴度 (ng/mL)
800000
600000
400000
200000
30
20
10
0
WT-之前
WT-之后
F42-之前
F42-之后
Y45-之前
Y45-之后
P65-之前
P65-之后

图14

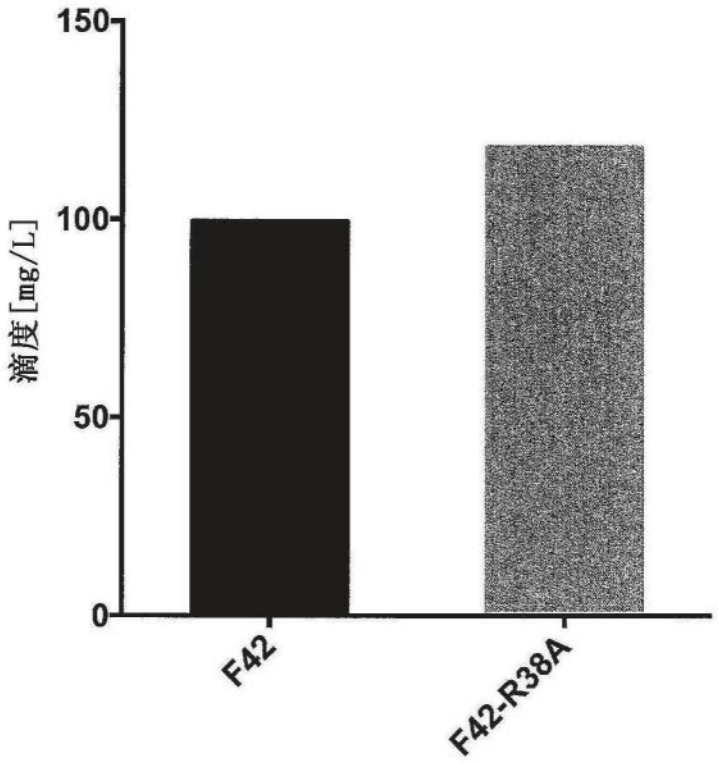

滴度[mg/L]
150
100
50
0
F42
F42-R38A

图15A

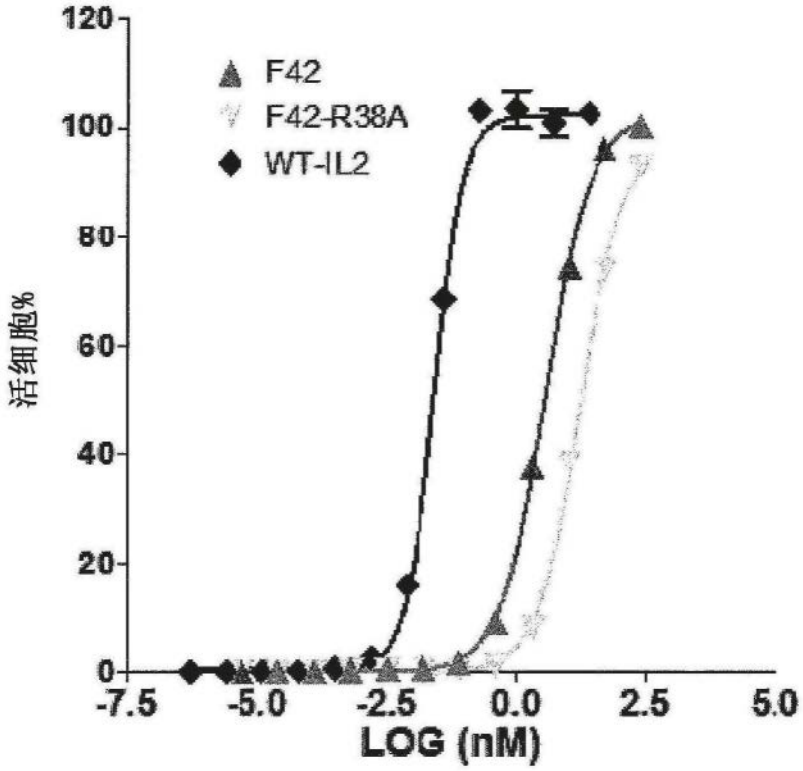

120
100
80
60
40
20
0
活细胞%
F42
F42-R38A
WT-IL2
-7.5
-5.0
-2.5
0.0
2.5
5.0
LOG (nM)

图15B

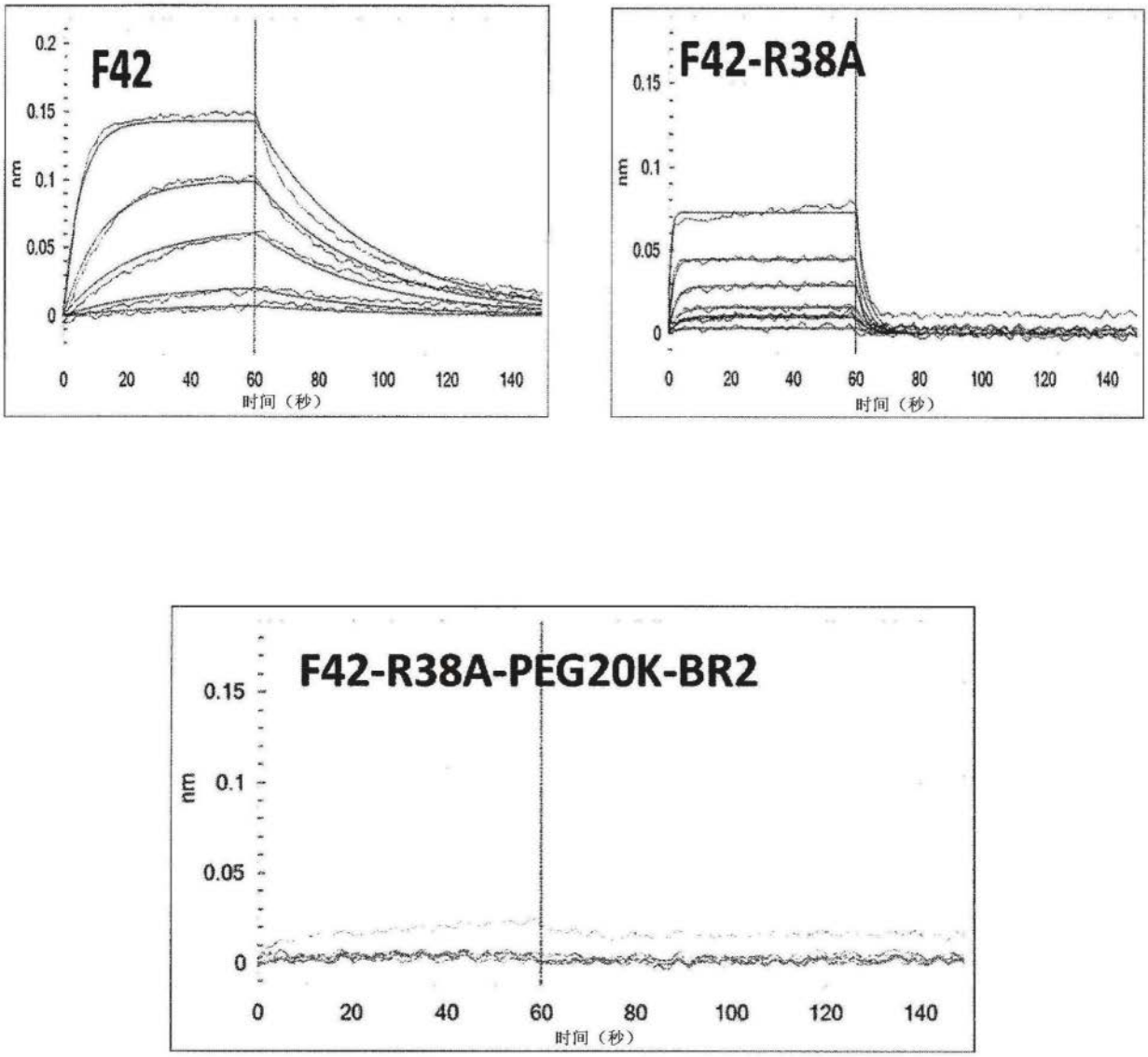

F42
F42-R38A
F42-R38A-PEG20K-BR2
nm
时间（秒）
0
20
40
60
80
100
120
140
0.05
0.1
0.15
0.2

图15C