

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202292793 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.02.15

(51) Int. Cl. C07K 14/55 (2006.01)  
A61K 38/03 (2006.01)  
A61K 38/20 (2006.01)  
A61K 47/60 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.04.20

(54) КОНЬЮГАТЫ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА, СМЕЩЕННЫЕ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ С ДИМЕРОМ  $\beta\gamma_c$  РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2, И КОНЬЮГИРОВАННЫЕ С НЕПЕПТИДНЫМ ВОДОРАСТВОРИМЫМ ПОЛИМЕРОМ

(31) 63/013,583

(72) Изобретатель:

(32) 2020.04.22

Абрахамс Кристина, Боуман Эдвард,  
Ли Сяофань, Линь Суннянь, Солис  
Уилли, Стаффорд Райан, Уиллингхэм  
Ааррон, Ям Элис, Ян Цзюньхао, Инь  
Ган (US)

(33) US

(86) PCT/US2021/028054

(87) WO 2021/216478 2021.10.28

(71) Заявитель:

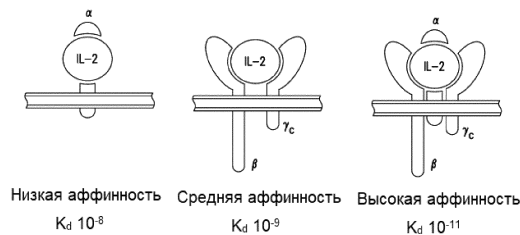
(74) Представитель:

МЕРК ШАРП ЭНД ДОУМ ЭЛЭЛСИ  
(US)

Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В.,  
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,  
Костюшенкова М.Ю. (RU)

(57) Предложены конъюгаты интерлейкина-2 (IL-2), содержащие по меньшей мере одну или более аминокислотных замен, которые смещают связывание к димеру рецептора IL-2 $\beta\gamma_c$  вместо связывания с тримером рецептора IL-2 $\alpha\beta\gamma_c$ , и не встречающуюся в природе аминокислоту на N-конце или рядом с ним, конъюгированную с водорастворимым полимером. Конъюгаты IL-2 полезны для лечения и профилактики пролиферации клеток и рака у пациента.

IL-2 рецептор находится в трех состояниях



A1

202292793

202292793

A1

# КОНЬЮГАТЫ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА, СМЕЩЕННЫЕ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ С ДИМЕРОМ $\beta\gamma_c$ РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2, И КОНЬЮГИРОВАННЫЕ С НЕПЕПТИДНЫМ ВОДОРАСТВОРИМЫМ ПОЛИМЕРОМ

## Описание

### Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к конъюгатам интерлейкина-2 (IL-2), содержащим по меньшей мере одну или более аминокислотных замен, которые смещают связывание к димеру  $\beta\gamma_c$  рецептора IL-2, вместо связывания с тримером  $\alpha\beta\gamma_c$  рецептора IL-2, и не встречающуюся в природе аминокислоту на N-конце или вблизи него, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером. Конъюгаты IL-2 применимы для лечения и профилактики клеточной пролиферации и рака у пациента.

### Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Интерлейкин-2 (IL-2) был идентифицирован в 1965 году как фактор, продуцируемый в культурах лейкоцитов, который при переносе индуцировал образование лейкоцитарных бластов. Фактор этой активности, второй цитокин, идентифицированный более четырех десятилетий назад, первоначально назывался фактором роста Т-клеток (TCGF). TCGF в 1979 г. был назван IL-2, а в 1983 г. была клонирована кДНК IL-2. Первое одобрение IL-2 для лечения рака (метастатической меланомы) было получено только через 8 лет.

Белок IL-2 представляет собой цитокин с четырьмя альфа-спиралями, и он имеет размер 15,5 кДа. IL-2 продуцируется рядом типов клеток, включая NK-Т-клетки, CD8-Т-клетки, тучные клетки и дендритные клетки, но основными продуцентами IL-2 являются антигенстимулированные хелперные (CD4) Т-клетки.

Эффекты IL-2 опосредованы сложной системой рецепторов, состоящей из трех белковых субъединиц: IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122) и общей гамма-цепи ( $\gamma_c$ /CD132) (см. Фиг. 1). CD25 связывает IL-2 с низкой аффинностью (без передачи сигнала). CD122 и CD132 образуют димерный рецептор с промежуточной аффинностью (Kd,  $10^{-9}$  M), который экспрессируется на CD8 Т-клетках и NK-клетках. CD25, CD122 и CD132 образуют систему высокоаффинных тримерных рецепторов (Kd,  $10^{-11}$  M), которая с высокой аффинностью связывает IL-2 и экспрессируется на регуляторных Т-клетках (T<sub>reg</sub>), активированных Т-клетках и эндотелиальных клетках. Из-за этой дифференциальной аффинности клетки, экспрессирующие IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ , будут предпочтительно связывать IL-2. Высокая доза IL-2 активирует димер  $\beta\gamma_c$ , что приводит к активации иммунного ответа. Высокая доза IL-2 также активирует тример  $\alpha\beta\gamma_c$  на T<sub>reg</sub>, что подавляет активацию иммунного ответа и может привести к толерантности к опухолевым антигенам.

Связывание IL-2 либо с IL-2R $\beta\gamma_c$ , либо с IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$  индуцирует множественные сигнальные пути и транскрипцию генов-мишеней. Эти пути включают путь Jak/Stat, путь MAPK и путь PI3K. Посредством этих путей этот сильнодействующий цитокин индуцирует активацию, пролиферацию и продукцию цитокинов, дифференцировку Т-клеток CD4 и CD8, а также активацию NK-клеток для усиления их цитолитических функций. Кроме того, IL-2 способствует индукции регуляторных Т-клеток (T<sub>reg</sub>), которые ингибируют иммунный ответ. Обнаруженный в 1999 г. компонент T<sub>reg</sub> в биологии IL-2 продемонстрировал влияние IL-2 как на стимуляцию, так и на подавление воспалительного иммунного ответа против чужеродных захватчиков, таких как патогены или рак; и добавили ряд нюансов для понимания того, как высокие дозы IL-2 способствуют противоопухолевому иммунитету, влияя на функцию CD8 Т-клеток и NK-клеток.

### *IL-2 в иммунотерапии рака*

IL-2 был первым цитокином и иммунотерапией, которые успешно применялись для лечения рака. В 1992 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило альдеслейкин, негликозилированный рекомбинантный аналог IL-2 человека (дес-аланил-1, серин-125 IL-2 человека) для лечения почечно-клеточной карциномы (RCC) и метастатической меланомы. В этих условиях высокие дозы альдеслейкина привели приблизительно к 10% полным ответам, однако с токсичностью, ограничивающей дозу. Из-за короткого периода полужизни IL-2 (около одного часа у человека) лечение пациентов с IL-2 требует введения приблизительно 3 мг путем внутривенной инфузии в течение 15-минутного периода каждые 8 часов в виде 14 доз в течение 5 дней; и после 5-дневного перерыва курс повторяют. Дополнительные 1-2 курса лечения могут быть проведены через 6-12 недель.

У многих пациентов, получавших лечение по схеме с высокими дозами IL-2, развивается синдром сосудистой утечки (VLS), начинающийся через 3-4 дня после начала терапии; этот эффект часто ограничивал дозу на 5-10 день лечения, что приводило к госпитализации в отделение интенсивной терапии. Этот синдром характеризуется увеличением проницаемости сосудов и экстравазацией жидкости и белков из капилляров в ткани, что приводит к интерстициальному отеку, снижению перфузии органов и повреждению органов. Количественная оценка наиболее заметных нежелательных явлений 3-й и 4-й степени, связанных с IL-2, включает гипотензию и нарушение функции почек. Поскольку введение альдеслейкина в утвержденных рекомендуемых дозах может вызывать серьезные побочные эффекты, включая VLS и нарушение функции нейтрофилов, FDA требует, чтобы альдеслейкин продавался с «предупреждением в черной рамке». Более того, коммерческий состав альдеслейкина включает в себя присутствие додецилсульфата натрия, вещества, которое, по-видимому, необходимо для поддержания оптимальной активности за счет обеспечения конформационной стабильности. См. Arakawa et al., 1994, *Int. J. Peptide Protein Res.* 43:583-587.

Поскольку применению IL-2 в клинике препятствовали короткий период его полужизни и дозозависимая токсичность, исследования были сосредоточены на смягчении этих проблем. Исследования клеточных и молекулярных механизмов, приводящих к VLS, показали, что взаимодействие IL-2 с CD25, цепью IL-2R $\alpha$ , является причиной VLS. Данные, подтверждающие эту гипотезу, показывают, что либо мутанты IL-2 с увеличенным периодом полужизни, которые не взаимодействуют с IL-2R $\alpha$ , либо антитела, которые блокируют взаимодействие связывания IL-2 с IL-2R $\alpha$  и обеспечивают более длительный период полужизни, обеспечивают эффективность лечения на мышинных моделях рака, не вызывая сосудистой утечки. Чтобы подтвердить этот эффект с использованием генетических делеций, использовали химеры костного мозга мышей, несущих делецию CD25, либо в иммунной системе, либо только в неиммунных тканях, и при этом обнаружили, что эффект IL-2 требовал только присутствия CD25 в неиммунных тканях. Эти исследования продемонстрировали возможность создания методами геной инженерии молекулы IL-2 с увеличенным периодом полужизни, у которой отсутствуют свойства, приводящие к токсичности, при сохранении противоопухолевой активности IL-2 дикого типа.

После десятилетий попыток создания молекул IL-2 появились положительные клинические данные. Прогресс в получении IL-2 с увеличенным периодом полужизни, со смещением активности связывания и возможностью использования в низких дозах, по-видимому, был достигнут компанией Nektar Therapeutics, предложившей пегилированную пролекарственную форму альдеслейкина, названного бемпегалдеслейкин (NKTR-214; см. патент США № 9861705). Бемпегалдеслейкин имеет около шести из 11 присутствующих остатков лизина, конъюгированных с гидролизуемыми би-молекулами полиэтиленгликоля (PEG; ПЭГ) с

молекулярной массой 10 кДа, с образованием неактивного пролекарства. После гидролиза четырех из шести фрагментов ПЭГ бемпегальдеслейкин приобретает активность, при этом один или два из оставшихся ПЭГ предположительно располагаются таким образом, что они смещают связывание молекулы от IL-2R $\alpha$ . Пегилирование также придает бемпегальдеслейкину значительно увеличенный период полужизни по сравнению с нативным IL-2 дикого типа (дни по сравнению с минутами) при длительном воздействии.

Помимо лечения пролиферативных заболеваний и нарушений, IL-2 также был предложен для лечения инфекции вируса гепатита С (HCV), инфекции вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), острого миелоидного лейкоза, неходжкинской лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы, ювенильного ревматоидного артрита, атопического дерматита, рака молочной железы и рака мочевого пузыря.

Учитывая токсичность альдеслейкина и его относительно короткий период полужизни, существует потребность в аналогах IL-2 со сниженной токсичностью и увеличенным периодом полужизни. Требуемые улучшения включают стабильность, селективность, например, в отношении различных форм рецептора IL-2, режимы дозирования и ограничение побочных эффектов. Мутены и конъюгаты IL-2 могут обеспечить создание улучшенных терапевтических средств для лечения злокачественной меланомы, почечно-клеточного рака и других состояний, восприимчивых к терапии IL-2.

### **Сущность настоящего изобретения**

Настоящее изобретение относится к полипептидам интерлейкина 2 (IL-2), имеющим по меньшей мере одну или более аминокислотных замен, которые смещают связывание к димеру  $\beta\gamma_c$  рецептора IL-2 (IL-2R $\beta\gamma_c$ ) вместо связывания с тримером  $\alpha\beta\gamma_c$  рецептора IL-2, и не встречающуюся в природе аминокислоту на N-конце полипептида IL-2 или рядом с ним, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, при этом аминокислотная последовательность, по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности дикого типа или нативного IL-2 человека. Эти конъюгаты IL-2 обладают аффинностью связывания с IL-2R $\beta\gamma_c$ , которая по существу аналогична аффинности нативного IL-2, и имеют сниженную или не обнаруживаемую аффинность связывания с IL-2R $\alpha$  по сравнению с нативным IL-2, определяемую с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Таким образом, эти конъюгаты IL-2 обладают пониженной токсичностью по сравнению с коммерчески доступными полипептидами IL-2, а также временем полужизни в плазме, которое по меньшей мере в пять раз больше, чем у коммерчески доступных полипептидов IL-2.

Настоящее изобретение относится к конъюгату интерлейкина 2 (IL-2), содержащему полипептид IL-2, который содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, и он дополнительно содержит: (i) одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность полипептида IL-2 к тримеру  $\alpha\beta\gamma_c$  рецептора IL-2 человека (IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ ) по сравнению с IL-2 человека дикого типа; и (ii) замену аминокислоты на N-конце полипептида IL-2 или рядом с ним на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку из не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером, на N-конце полипептида IL-2 или вблизи него; при этом полипептид IL-2 имеет по существу сходную аффинность связывания с димером  $\beta\gamma_c$  рецептора IL-2 человека (IL-2R $\beta\gamma_c$ ) по сравнению с IL-2 человека дикого типа.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотная последовательность полипептида IL-2 по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична

аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, при условии, что полипептид IL-2 содержит по меньшей мере аминокислоты E15, H16, L19, D20, D84, N88, V91, Q126, T123 и I129, где положения аминокислот соответствуют положениям, указанным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотная последовательность полипептида IL-2 по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, при условии, что полипептид IL-2 содержит по меньшей мере аминокислоты E15, H16, L19, D20, D84, N88, V91, Q126, T123 и I129, где положения аминокислот соответствуют положениям, указанным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотная последовательность полипептида IL-2 по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, при условии, что полипептид IL-2 содержит по меньшей мере аминокислоты E15, H16, L19, D20, D84, N88, V91, Q126, T123 и I129, где положения аминокислот соответствуют положениям, указанным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотная последовательность полипептида IL-2 по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2 при условии, что полипептид IL-2 содержит по меньшей мере аминокислоты E15, H16, L19, D20, D84, N88, V91, Q126, T123 и I129, где положения аминокислот соответствуют положениям, указанным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотная последовательность полипептида IL-2 по меньшей мере на 98% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, при условии, что полипептид IL-2 содержит по меньшей мере аминокислоты E15, H16, L19, D20, D84, N88, V91, Q126, T123 и I129, где положения аминокислот соответствуют положениям, указанным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат полипептида IL-2 имеет сниженное или не поддающееся обнаружению связывание с альфа-мономером рецептора IL-2 человека (IL-2R $\alpha$ ) по сравнению с нативным IL-2, определенное с помощью анализа SPR.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения одна или более аминокислотных замен независимо выбраны из группы, состоящей из K34, T36, R37, T40, F41, K42, F43, Y44, E60, K63, P64, E67, L71, M103, C104, и Y106, где положения аминокислотных замен соответствуют положению аминокислот в аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 53. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения одна или более аминокислотных замен в полипептиде IL-2 находятся в положениях R37 и F41. В другом варианте аминокислотные замены в полипептиде IL-2 представляют собой R37A и F41K. В другом варианте осуществления настоящего изобретения полипептид IL-2 дополнительно содержит замену остатка цистеина в положении 124 аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из A и S, где положение аминокислоты соответствует положению аминокислоты в положении 124 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53. В другом варианте осуществления настоящего изобретения полипептид IL-2 дополнительно содержит остаток аланина или остаток метионина на N-конце. В другом варианте осуществления настоящего изобретения полипептид IL-2 дополнительно содержит C-концевую метку HIS6.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота заменяет аминокислоту, соответствующую положению в первых 10 аминокислотах аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 2, или она вставлена в указанную

последовательность. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота заменяет аминокислоту, соответствующей положению в последовательности от P1 до Q10 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2, или она вставлена в указанную последовательность между P1 и Q10. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота заменяет аминокислоту в положениях P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8 или T9, или она связана с N-концевой аминокислотой амидной связью. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота вставлена после аминокислоты в положении P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8 или T9. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота расположена в положении аминокислоты, соответствующем положению 4 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота содержит функциональную группу, а непептидный водорастворимый полимер связан с реакционноспособной группой, которая способна реагировать с функциональной группой с образованием ковалентной связи. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота выбрана из группы, состоящей из п-азидометил-L-фенилаланина, п-азидо-L-фенилаланина, п-ацетил-L-фенилаланина, N6-азидоэтокси-L-лизина, N6-пропаргилэтокси-L-лизина (PraK), BCN-L-лизина, норборненилизина, TCO-лизина, метилтетразинлизина, аллилоксикарбониллизина, 2-амино-8-оксононановой кислоты, 2-амино-8-оксооктановой кислоты, O-метил-L-тирозина, L-3-(2-нафтил)аланина, 3-метилфенилаланина, O-4-аллил-L-тирозина, 4-пропил-L-тирозина, три-O-ацетил-GlcNAc-серина, L-дофа, фторированного фенилаланина, изопропил-L-фенилаланина, п-бензоил-L-фенилаланина, L-фосфосерина, фосфоносерина, фосфотироина, п-йодофенилаланина, п-бромфенилаланина, п-амино-L-фенилаланина, изопропил-L-фенилаланина, p-пропаргилоксифенилаланина, 2-амино-3-((2-((3-(бензилокси)-3-оксопропил)амино)этил)селанил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(фенилселанил)пропановой кислоты, селеноцистеина, м-ацетилфенилаланина, 2-амино-8-оксононановой кислоты и п-пропаргилоксифенилаланина. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой п-азидометил-L-фенилаланин.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу от 1 кДа до 100 кДа. В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу равную около 30 кДа. В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ), поли(пропиленгликоль) (ППГ), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, поли(оксипропиленгликоль), поли(олефиновый спирт), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(α-гидроксикислота), поли(виниловый спирт), полифосфазен, полиоксазолины (POZ), поли(N-акрилоилморфолин) или их комбинацию. В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер представляет собой линейный или разветвленный ПЭГ.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер, связанный с реакционноспособной группой, имеет формулу:

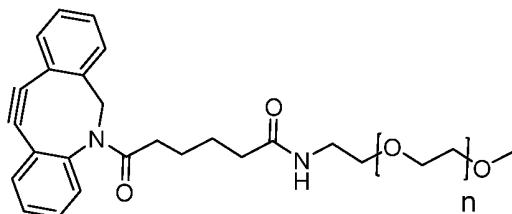


где RG представляет собой реакционноспособную группу, которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой не встречающейся в природе аминокислоты; линкер представляет собой ковалентную связь или замещенный или незамещенный C<sub>1-20</sub> алкил; POLY представляет

собой непептидный водорастворимый полимер; и x представляет собой спирт или метильную группу на конце POLY.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения реакционноспособная группа непептидного водорастворимого полимера содержит алкин, а функциональная группа не встречающейся в природе аминокислоты содержит азид, или реакционноспособная группа непептидного водорастворимого полимера содержит азид и функциональная группа не встречающейся в природе аминокислоты содержит алкин.

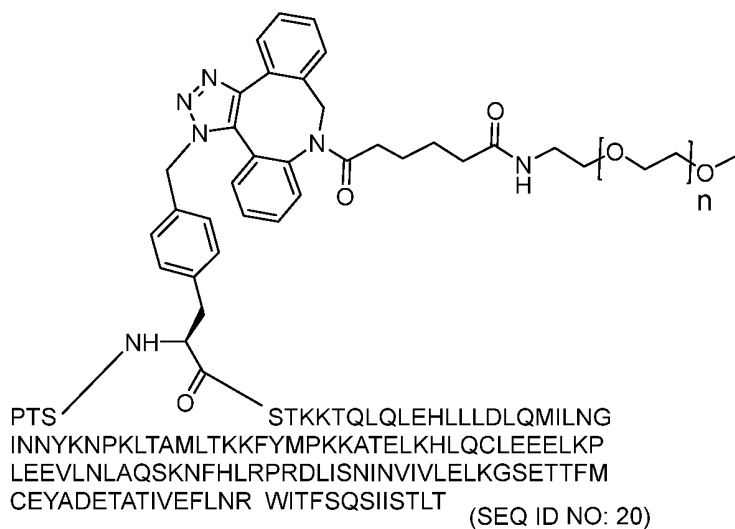
В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер, конъюгированный с реакционноспособной группой, имеет формулу:



где n равняется около 681.

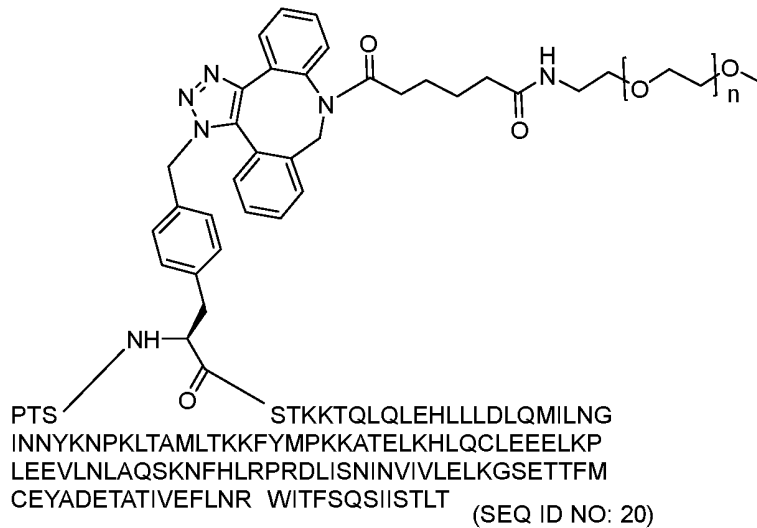
В другом варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат IL-2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат интерлейкина 2 (IL-2) включает структуру следующей формулы:



где n равняется около 681,

или его региоизомер, имеющий формулу



где n равняется около 681.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей конъюгат IL-2 по любому из предыдущих вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума, где способ предусматривает: введение терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 по любому варианту осуществления настоящего изобретения, раскрытого здесь, или его композиции индивидууму, нуждающемуся в этом, для лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинированной терапии для лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума, где комбинированная терапия предусматривает: введение терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 по любому варианту осуществления настоящего изобретения, раскрытого здесь, или его композиции индивидууму, нуждающемуся в этом, и введение индивидууму терапевтически эффективного количества терапевтического агента для лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума. В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтический агент представляет собой антитело к PD1 или антитело к PDL1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат IL-2 или композицию вводят перед введением терапевтического агента. В другом варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат IL-2 или композицию вводят после введения терапевтического агента. В другом варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат IL-2 или композицию вводят одновременно с терапевтическим агентом.

Настоящее изобретение также относится к применению конъюгата IL-2 по любому из вариантов выполнения конъюгата IL-2, раскрытого здесь, или его композиции для лечения пролиферативного заболевания или рака. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено применение конъюгата IL-2 по любому из вариантов выполнения конъюгата IL-2, раскрытого здесь, или его композиции и терапевтического агента для лечения пролиферативного заболевания или рака. В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтический агент представляет собой антитело к PD1 или антитело к PDL1.



Настоящее изобретение также относится к применению конъюгата IL-2 по любому из вариантов выполнения конъюгата IL-2, раскрытого здесь, или его композиции для изготовления лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания или рака.

Настоящее изобретение также относится к конъюгату IL-2, содержащему полипептид IL-2, где полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, и полипептид IL-2 дополнительно содержит: (i) одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из K34, T36, R37, T40, F41, K42, F43, Y44, E60, E61, K63, P64, E67, L71, M103, C104 и Y106; и (ii) замену аминокислоты на N-конце полипептида IL-2 или рядом с ним на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку из не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером на N-конце полипептида IL-2 или рядом с ним, где положения аминокислот соответствуют положениям, указанным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, и которая дополнительно содержит: (i) одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы состоящий из K34, T36, R37, T40, F41, K42, F43, Y44, E60, E61, K63, P64, E67, L71, M103, C104 и Y106; и (ii) замену аминокислоты на N-конце полипептида IL-2 или рядом с ним на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку из не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером на N-конце полипептида IL-2 или рядом с ним, где положения аминокислот соответствуют положениям, указанным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, и которая дополнительно содержит: (i) одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из K34, T36, R37, T40, F41, K42, F43, Y44, E60, E61, K63, P64, E67, L71, M103, C104 и Y106; и (ii) замену аминокислоты на N-конце полипептида IL-2 или рядом с ним на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку из не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером на N-конце полипептида IL-2 или рядом с ним, где положения аминокислот соответствуют положениям, указанным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения полипептид IL-2 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, и которая дополнительно содержит: (i) одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из K34, T36, R37, T40, F41, K42, F43, Y44, E60, E61, K63, P64, E67, L71, M103, C104 и Y106; и (ii) замену аминокислоты на N-конце полипептида IL-2 или рядом с ним на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку из не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером на N-конце полипептида IL-2 или рядом с ним, где положения аминокислот соответствуют положениям, указанным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения одна или более аминокислотных замен в полипептиде IL-2 находятся в положениях R37 и F41. В другом варианте осуществления настоящего

изобретения аминокислотные замены в полипептиде IL-2 представляют собой R37A и F41K. В другом варианте осуществления настоящего изобретения полипептид IL-2 дополнительно содержит замену остатка цистеина в положении 124 аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из A и S, где положение аминокислоты соответствует положению аминокислоты в положении 124 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53. В другом варианте осуществления настоящего изобретения полипептид IL-2 дополнительно содержит остаток аланина на N-конце.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота заменяет аминокислоту, соответствующую положению в первых 10 аминокислотах аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 2, или она вставлена в указанную последовательность. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота заменяет аминокислоту, соответствующую положению в последовательности от P1 до Q10 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2, или она вставлена в указанную последовательность между P1 и Q10. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота заменяет аминокислоту в положениях P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8 или T9, или она связана с N-концевой аминокислотой амидной связью. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота расположена в положении аминокислоты, соответствующем положению 4 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота содержит функциональную группу, а непептидный водорастворимый полимер связан с реакционноспособной группой, которая способна реагировать с функциональной группой с образованием ковалентной связи. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота выбрана из группы, состоящей из п-азидометил-L-фенилаланина, п-азидо-L-фенилаланина, п-ацетил-L-фенилаланина, N6-азидоэтокси-L-лизина, N6-пропаргилэтокси-L-лизина (PraK), BCN-L-лизина, норборненилизина, TCO-лизина, метилтетразинлизина, аллилоксикарбониллизина, 2-амино-8-оксононановой кислоты, 2-амино-8-оксооктановой кислоты, O-метил-L-тирозина, L-3-(2-нафтил)аланина, 3-метилфенилаланина, O-4-аллил-L-тирозина, 4-пропил-L-тирозина, три-O-ацетил-GlcNAc-серина, L-дофа, фторированного фенилаланина, изопропил-L-фенилаланина, п-бензоил-L-фенилаланина, L-фосфосерина, фосфоносерина, фосфонотиروزина, п-йодофенилаланина, п-бромфенилаланина, п-амино-L-фенилаланина, изопропил-L-фенилаланина, p-пропаргилоксифенилаланина, 2-амино-3-((2-((3-(бензилокси)-3-оксопропил)амино)этил)селанил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(фенилселанил)пропановой кислоты, селеноцистеина, м-ацетилфенилаланина, 2-амино-8-оксононановой кислоты и п-пропаргилоксифенилаланина. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой п-азидометил-L-фенилаланин.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу от 1 кДа до 100 кДа. В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу равную около 30 кДа. В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ), поли(пропиленгликоль) (ППГ), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, поли(оксипропиленгликоль), поли(олефиновый спирт), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(α-гидроксикислота), поли(виниловый спирт), полифосфазен, полиоксазолины (POZ), поли(N-

акрилоилморфолин) или их комбинацию. В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер представляет собой линейный или разветвленный ПЭГ.

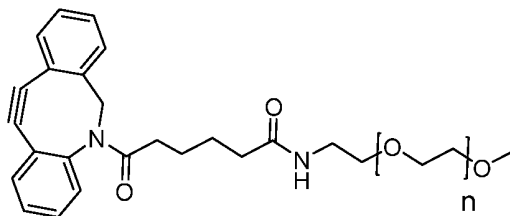
В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер, связанный с реакционноспособной группой, имеет формулу:



где RG представляет собой реакционноспособную группу, которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой не встречающейся в природе аминокислоты; линкер представляет собой ковалентную связь или замещенный или незамещенный C<sub>1-20</sub> алкил; POLY представляет собой непептидный водорастворимый полимер; и x представляет собой спирт или метильную группу на конце POLY.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения реакционноспособная группа непептидного водорастворимого полимера содержит алкин, а функциональная группа не встречающейся в природе аминокислоты содержит азид, или реакционноспособная группа непептидного водорастворимого полимера содержит азид и функциональная группа не встречающейся в природе аминокислоты содержит алкин.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер, конъюгированный с реакционноспособной группой, имеет формулу:



где n равняется около 681.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат IL-2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей: конъюгат IL-2 по любому из вариантов осуществления конъюгата IL-2, описанного здесь, и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума, где способ предусматривает: введение терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 по любому из вариантов осуществления конъюгата IL-2, описанного здесь, или его композиции индивидууму, нуждающемуся в этом, для лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к комбинированной терапии для лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума, где комбинированная терапия предусматривает: введение терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 по любому из вариантов осуществления конъюгата IL-2, описанного здесь, или его композиции индивидууму, нуждающемуся в этом, и введение индивидууму терапевтически эффективного количества терапевтического агента для лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума. В другом варианте осуществления настоящего

изобретения терапевтический агент представляет собой антитело к PD1 или антитело к PDL1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат IL-2 или композицию вводят перед введением терапевтического агента. В другом варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат IL-2 или композицию вводят после введения терапевтического агента. В другом варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат IL-2 или композицию вводят одновременно с терапевтическим агентом.

Настоящее изобретение также относится к применению конъюгата IL-2 по любому из вариантов выполнения конъюгата IL-2, раскрытого здесь, или его композиции для лечения пролиферативного заболевания или рака.

Настоящее изобретение также относится к применению конъюгата IL-2 по любому из вариантов выполнения конъюгата IL-2, раскрытого здесь, или его композиции и терапевтического агента для лечения пролиферативного заболевания или рака. В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтический агент представляет собой антитело к PD1 или антитело к PDL1.

Настоящее изобретение также относится к применению конъюгата IL-2 по любому из вариантов выполнения конъюгата IL-2, раскрытого здесь, или его композиции для изготовления лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания или рака.

Настоящее изобретение также относится к конъюгату IL-2, содержащему аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей IL-2, конъюгат и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Настоящее изобретение также относится к фрагменту IL-2, содержащему аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52.

Настоящее изобретение также относится к конъюгату интерлейкина 2 (IL-2), содержащему полипептид IL-2, который содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, и который дополнительно содержит: замену аминокислоты на N-конце полипептида IL-2 или вблизи него на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером, на N-конце полипептида IL-2 или рядом с ним, при условии, что полипептид IL-2 содержит по меньшей мере аминокислоты E15, H16, L19, D20, K34, T36, R37, T40, F41, K42, F43, Y44, E60, E61, K63, P64, E67, L71, D84, N88, V91, M103, C104, Y106, Q126, T123 и I129, где положения аминокислот соответствуют положениям, указанным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения полипептид IL-2 дополнительно содержит замену остатка цистеина в положении I24 аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из A и S.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения полипептид IL-2 дополнительно содержит остаток аланина на N-конце.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота заменяет аминокислоту, соответствующую положению в первых 10 аминокислотах аминокислотной последовательности, как указано в SEQ ID NO: 2, или она вставлена в указанную последовательность. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота заменяет аминокислоту, соответствующей положению в последовательности от P1 до Q10 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2, или она вставлена в указанную последовательность между P1 и Q10. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота заменяет аминокислоту в положениях P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8 или T9, или она связана с N-концевой аминокислотой амидной связью. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота расположена в положении аминокислоты, соответствующем положению 4 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота содержит функциональную группу, а водорастворимый полимер связан с реакционноспособной группой, которая способна реагировать с функциональной группой с образованием ковалентной связи.

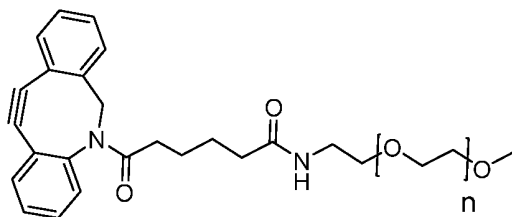
В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота выбрана из группы, состоящей из п-азидометил-L-фенилаланина, п-азидо-L-фенилаланина, п-ацетил-L-фенилаланина, N6-азидоэтоксид-L-лизина, N6-пропаргилэтоксид-L-лизина (PraK), BCN-L-лизина, норборненлизина, TCO-лизина, метилтетразинлизина, аллилоксикарбониллизина, 2-амино-8-оксононановой кислоты, 2-амино-8-оксооктановой кислоты, O-метил-L-тирозина, L-3-(2-нафтил)аланина, 3-метилфенилаланина, O-4-аллил-L-тирозина, 4-пропил-L-тирозина, три-O-ацетил-GlcNAc-серина, L-дофа, фторированного фенилаланина, изопропил-L-фенилаланина, п-бензоил-L-фенилаланина, L-фосфосерина, фосфоносерина, фосфотирозина, п-йодофенилаланина, п-бромфенилаланина, п-амино-L-фенилаланина, изопропил-L-фенилаланина, p-пропаргилоксифенилаланина, 2-амино-3-((2-((3-(бензилокси)-3-оксопропил)амино)этил)селанил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(фенилселанил)пропановой кислоты, селеноцистеина, м-ацетилфенилаланина, 2-амино-8-оксононановой кислоты и п-пропаргилоксифенилаланина. В другом варианте осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой п-азидометил-L-фенилаланин.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу от 1 кДа до 100 кДа. В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу равную около 30 кДа. В другом варианте осуществления настоящего изобретения представлен непептидный водорастворимый полимер по п. 65, где непептидный водорастворимый полимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ), поли(пропиленгликоль) (ППГ), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, поли(оксиэтилированный полиол), поли(олефиновый спирт), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(α-гидроксикислота), поли(виниловый спирт), полифосфазен, полиоксазолины (POZ), поли(N-акрилоилморфолин) или их комбинацию. В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер представляет собой линейный или разветвленный ПЭГ.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения реакционноспособная группа непептидного водорастворимого полимера содержит алкин, а функциональная группа не встречающейся в

природе аминокислоты содержит азид, или реакционноспособная группа непептидного водорастворимого полимера содержит азид и функциональная группа не встречающейся в природе аминокислоты содержит алкин.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер, содержащий алкин, имеет формулу:



где n равняется около 681.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат IL-2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

Настоящее изобретение также относится к любому варианту осуществления, раскрытому здесь, где не встречающаяся в природе аминокислота конкретно не идентифицирована как замещающая остаток серина в положении четыре, поскольку он соответствует положению четыре в SEQ ID NO:2, и предложены варианты осуществления, в которых замена или вставка не встречающейся в природе аминокислоты находится в пределах N-концевой области, например: (i) с заменой аминокислоты в пределах первых 30 аминокислот N-конца полипептида IL-2 на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или со вставкой не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером, в пределах первых 30 аминокислот N-конца полипептида IL-2; или (ii) с заменой аминокислоты в пределах первых 20 аминокислот N-конца полипептида IL-2 на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или со вставкой не встречающейся в природе аминокислоты конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером, в пределах первых 20 аминокислот N-конца полипептида IL-2

Таким образом, настоящее изобретение относится к (а) конъюгату, содержащему полипептид IL-2, который содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, и он дополнительно содержит: (i) одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность полипептида IL-2 к IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$  человека по сравнению с IL-2 человека дикого типа; и (ii) замену аминокислоты на N-конце полипептида IL-2 на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку из не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером, на N-конце полипептида IL-2; при этом полипептид IL-2 имеет по существу сходную аффинность связывания с IL-2R $\beta\gamma_c$  человека по сравнению с IL-2 человека дикого типа.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится (а) к конъюгату IL-2, содержащему полипептид IL-2, который содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, и которая дополнительно содержит: (i) одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность полипептида IL-2 к IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$  человека по сравнению с IL-2 человека дикого типа; и (ii) замену аминокислоты в пределах первых 30 аминокислот на N-конце полипептида IL-2 на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым

полимером, или вставку не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером в пределах первых 30 аминокислот на N-конце полипептида IL-2; при этом полипептид IL-2 имеет по существу сходную аффинность связывания с IL-2R $\beta\gamma_c$  человека по сравнению с IL-2 человека дикого типа; и (b) к конъюгату IL-2, содержащему полипептид IL-2, который содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, и которая дополнительно содержит: (i) одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность полипептида IL-2 к IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$  человека по сравнению с IL-2 человека дикого типа; и (ii) замену аминокислоты в пределах первых 20 аминокислот на N-конце полипептида IL-2 на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером в пределах первых 20 аминокислот на N-конце полипептида IL-2; при этом полипептид IL-2 имеет по существу сходную аффинность связывания с IL-2R $\beta\gamma_c$  человека по сравнению с IL-2 человека дикого типа.

### **Краткое описание фигур**

На **Фиг. 1** показано взаимодействие IL-2 с рецепторами IL-2: низкоаффинными ( $\alpha$ ), с промежуточной аффинностью ( $\beta\gamma_c$ ) и высокоаффинными ( $\alpha\beta\gamma_c$ ). IL-2 связывает  $\alpha$ -мономер с низкой аффинностью (отсутствие передачи сигнала). IL-2 связывает димер  $\beta\gamma_c$  с промежуточной аффинностью. Димер  $\beta\gamma_c$  экспрессируется на CD8<sup>+</sup> Т-клетках и НК-клетках. IL-2 связывает тример  $\alpha\beta\gamma_c$  с высокой аффинностью. Тример  $\alpha\beta\gamma_c$  экспрессируется на T<sub>reg</sub> и активированных Т-клетках. Высокие дозы IL-2 активируют димер  $\beta\gamma_c$ , активирующий иммунный ответ. Однако высокие дозы также активируют тример  $\alpha\beta\gamma_c$  на T<sub>reg</sub>, что подавляет активацию иммунного ответа и может привести к толерантности к опухолевым антигенам.

На **Фиг. 2A** показано равновесное связывание вариантов Ald-6HIS с заменами K34D, T36D, R37G, T40D, F41L, K42G и Y44V с иммобилизованным меченым биотином IL-2R $\alpha$  или меченым биотином IL-2R $\beta$ .

На **Фиг. 2B** показано равновесное связывание вариантов Ald-6HIS с заменами E60T, E61S, K63G, P64A, E67G и L71I с иммобилизованным меченым биотином IL-2R $\alpha$  или меченым биотином IL-2R $\beta$ .

На **Фиг. 2C** показано равновесное связывание вариантов Ald-6HIS с заменами E60T/E61S, E60T/P64A, E61S/P64A, E61S/Y106A, E60T/E61S/P64A, E61S/P64A/Y106A и E61S с иммобилизованным меченым биотином IL-2R $\alpha$  или меченым биотином IL-2R $\beta$ .

На **Фиг. 3** показаны: (i) результаты анализа репортерных клеток CTLL2 STAT5 мыши, экспрессирующих IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ , в которых сравнивалась активация пути STAT5 альдеслейкином, CON2 и CON1; (ii) результаты анализа репортерных клеток Kit225-STAT5 человека, экспрессирующих IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ , в которых сравнивалась активация пути STAT5 альдеслейкином, CON2 и CON1; (iii) результаты анализа клеток NK92 человека, экспрессирующих IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ , в которых сравнивалась пролиферативная активность альдеслейкина, CON2 и CON1; и (iv) результаты анализа клеток DERL-7 человека, экспрессирующих IL-2R $\beta\gamma_c$ , где сравнивалась активность пролиферации альдеслейкина, CON2 и CON1. Показаны репрезентативные данные трех независимых экспериментов.

На **Фиг. 4A** показано сравнение способности CON1 и CON2 активировать путь STAT5 в первичных клетках T<sub>reg</sub> человека (экспрессирующих IL2R $\alpha\beta\gamma_c$ ) и в клетках CD8<sup>+</sup> CTL (экспрессирующих IL2R $\beta\gamma_c$ ) в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), выделенных от человека-донора №1.

На **Фиг. 4В** показано сравнение способности CON1 и CON2 активировать путь STAT5 в первичных T<sub>reg</sub> клетках человека (экспрессирующих IL2R $\gamma$  $\alpha$  $\beta$  $\epsilon$ ) и в клетках CD8<sup>+</sup> CTL (экспрессирующих IL2R $\beta$  $\gamma$  $\epsilon$ ) в РВМС, выделенных от человека-донора №2.

На **Фиг. 5А** показаны результаты анализа с использованием клеток Kit225, экспрессирующих IL-2R $\alpha$  $\beta$  $\gamma$  $\epsilon$ , и репортера STAT5-люциферазы.

На **Фиг. 5В** показаны результаты анализа с использованием клеток Kit225 с нокаутом по CD25, экспрессирующих только IL-2R $\beta$  $\gamma$  $\epsilon$ .

На **Фиг. 6** показаны результаты, полученные при внутривенном введении однократной дозы CON1 10 мг/кг в течение семи дней у мышей со значительным увеличением % CD8<sup>+</sup>, T<sub>eff</sub> памяти и NK-клеток из селезенки и РВ, что привело к увеличению соотношения CD8<sup>+</sup>/T<sub>reg</sub>. Для каждой клеточной популяции результаты показаны в виде % CD45<sup>+</sup> иммунных клеток из селезенки и периферической крови (РВ) (четыре животных на группу лечения). Меньшее количество клеток в РВ приводит к более высоким ошибкам (показаны интервалы). Два животных из группы РВ, получавшей носитель РВ, одно животное из группы селезенки, получавшей носитель, и одно животное из группы селезенки, получавшей CON2, были исключены из анализа данных из-за недостаточного количества выделенных клеток.

На **Фиг. 7** показано, что варианты IL-2 с ПЭГ 30 кДа имеют расширенный профиль фармакокинетики по сравнению с диким типом. Показан профиль зависимости средней концентрации в плазме от времени для CON1, CON2 и альдеслейкина у мышей C57BL/6 после внутривенного болюсного введения дозы 0,8 мг/кг. Концентрации в плазме определяли с помощью ELISA с использованием антитела против IL-2 человека. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение (SD).

На **Фиг. 8А** показаны кривые роста опухоли в ответ на указанные дозы CON1 или CON2, вводимые внутривенно в режиме q7dx2 животным, несущим сингенные опухоли меланомы мыши B16F10. Стрелки указывают на лечение. Статистический анализ размеров опухоли проводили на 9-й день с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием множественного сравнения Даннета. Вероятность менее 5% (p менее 0,05) считалась значимой. P-значения: \* = p менее 0,5, \*\* p менее 0,01, \*\*\*\* p менее 0,0001.

На **Фиг. 8В** показано процентное изменение массы тела у животных, несущих сингенные опухоли меланомы мышей B16F10, в ответ на лечение указанной дозой CON1 или CON2. Процентное изменение массы тела рассчитывали относительно массы животного в первый день лечения. Данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение среднего (SEM) (n = 8 на группу). Стрелки указывают на лечение.

На **Фиг. 9А** показаны кривые роста опухоли в ответ на внутривенное введение 5 мг/кг CON1, вводимого в режиме q7dx2 животным, несущим сингенные опухоли меланомы мышей B16F10. Стрелки указывают на лечение. Статистический анализ размеров опухоли проводили на 10-й день с использованием однофакторного дисперсионного анализа с тестом множественного сравнения Даннета. Вероятность менее 5% (p менее 0,05) считалась значимой. \* = p менее 0,5.

На **Фиг. 9В** показано процентное изменение массы тела у животных, несущих сингенную опухоль меланомы мышей B16F10, в ответ на лечение CON1. Процентное изменение массы тела рассчитывали относительно массы животного в первый день лечения. Стрелки указывают на лечение. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SEM (n = 8 на группу).

На **Фиг. 10А-Ж** показаны изменения иммунных клеток и опухолевый ответ после однократного внутривенного введения 5 мг/кг CON1 или CON2 животным с опухолями B16F10. Суспензии отдельных клеток из опухолей B16F10, собранных на 3, 7 и 10 день после обработки, готовили с использованием набора Miltenyi Biotec Inc. (номер по каталогу 130-096-730).



На **Фиг. 10А** показаны изменения в инфильтрирующих опухоль CD8 Т-клетках (клон 53-6.7) после однократного внутривенного введения дозы 5 мг/кг CON1 или CON2, измеренные с помощью проточной цитометрии и стандартизированные в процентах от общего количества живых клеток. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SEM (n = 5 на группу).

На **Фиг. 10В** показаны изменения в инфильтрирующих опухоль CD8 Т-клетках, экспрессирующих гранзим В (GnzB+, клон GB11), после однократного внутривенного введения дозы 5 мг/кг CON1 или CON2, измеренные с помощью проточной цитометрии и стандартизированные в процентах от общего количества живых клеток. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SEM (n = 5 на группу).

На **Фиг. 10С** показаны изменения в инфильтрирующих опухоль CD4 Т-клетках (клон GK1.5) после однократного внутривенного введения дозы 5 мг/кг CON1 или CON2, измеренные с помощью проточной цитометрии и стандартизированные в процентах от общего количества живых клеток. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SEM (n = 5 на группу).

На **Фиг. 10D** показаны изменения в инфильтрирующих опухоль Foxp3+ (клон FJK-16s) CD4-регуляторных Т-клетках (T<sub>reg</sub>) после однократного внутривенного введения 5 мг/кг CON1 или CON2, измеренные с помощью проточной цитометрии и стандартизированные в процентах от общего количества живых клеток. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SEM (n = 5 на группу).

На **Фиг. 10Е** показаны изменения общего количества NK-клеток, инфильтрирующих опухоль, NKp46+ (клон 29A1.4) после однократного внутривенного введения дозы 5 мг/кг CON1 или CON2, измеренные с помощью проточной цитометрии и стандартизированные в процентах от общего количества живых клеток. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SEM (n = 5 на группу).

На **Фиг. 10F** показаны изменения в инфильтрирующих опухоль NKT-клетках NKp46+ Thy1. 2+ (клон 53-2.1) после однократного внутривенного введения 5 мг/кг CON1 или CON2, измеренные с помощью проточной цитометрии и стандартизированные в процентах от общего количества живых клеток. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SEM (n = 5 на группу).

На **Фиг. 10G** показаны изменения в инфильтрирующих опухоль клетках NKT, экспрессирующих GnzB+, после однократного внутривенного введения дозы 5 мг/кг CON1 или CON2, измеренные с помощью проточной цитометрии и стандартизированные в процентах от общего количества живых клеток. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SEM (n = 5 на группу).

На **Фиг. 10H** показаны изменения терапевтических соотношений CD8 и T<sub>reg</sub> в опухолях B16F10 после однократного внутривенного введения 5 мг/кг CON1 или CON2. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SEM (n = 5 на группу).

На **Фиг. 10I** показаны изменения терапевтических соотношений NKT и T<sub>reg</sub> в опухолях B16F10 после однократного внутривенного введения 5 мг/кг CON1 или CON2. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SEM (n = 5 на группу).

На **Фиг. 10J** показаны кривые роста опухоли B16F10 в ответ на однократное внутривенное введение дозы 5 мг/кг CON1 или CON2. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SEM (n = 5 на группу).

На **Фиг. 11** показано, что CON2 и CON1 обладают быстрой и сильной активностью pSTAT5 *in vivo* в крови наивных мышей по сравнению с 5PEG аналогом NKTR-214 при внутривенном введении мышам в дозе 5 мг/кг для CON2 и CON1 и в дозе 1 мг/кг для 5PEG. После инъекции кровь собирали через 1 час, и через 1, 3, 5, 7 и 10 дней после инъекции. Собранную цельную кровь немедленно фиксировали и пермеабилizировали для окрашивания маркеров линии и фосфо-STAT5. Клетки CD4, CD8<sup>+</sup> и NK от пяти мышей для каждой группы

были отобраны для мониторинга pSTAT5 с помощью проточной цитометрии в каждый момент времени для каждого соединения.

На **Фиг. 12А-12J** показаны основные результаты фармакокинетического (ФК) и фармакодинамического (ФД) исследования CON1 и CON2 при повторных дозах у нечеловекообразных приматов (NHP). Экспериментально не подвергавшихся лечению самцов яванских макаков случайным образом распределяли по двум группам ( $n = 2$  на группу). Животным вводили внутривенно болюсные дозы 0,3 и 1 мг/кг CON1 (партия № ADC-004D) или 0,1 и 0,3 мг/кг CON2 (партия № ADC-0048) в дни 1 и 8, и контролировали в течение двух недель после последней дозы. После введения лекарственного средства (обозначены вертикальными пунктирными линиями) образцы крови собирали в несколько моментов времени для гематологического анализа (полный и дифференциальный подсчет клеток крови) и для характеристики различных популяций лимфоцитов методами проточной цитометрии.

На **Фиг. 12А** и **12В** показаны связанные с CON1 или CON2 изменения эозинофилов у NHP при указанных дозах. Данные по отдельным животным нанесены на график в указанные моменты времени; сплошная и пунктирная кривые отражают собой среднее значение для двух животных, когда это возможно, или для одного животного в каждой группе.

На **Фиг. 12С** и **12D** показаны связанные с CON1 или CON2 изменения общего количества лимфоцитов у NHP при указанных дозах. Данные по отдельным животным нанесены на график в указанные моменты времени; сплошная и пунктирная кривые отражают собой среднее значение для двух животных, когда это возможно, или для одного животного в каждой группе.

На **Фиг. 12Е** и **Фиг. 12F** показаны связанные с CON1 или CON2 изменения в FAC на основе профилирования цитотоксических Т-клеток (CTL) у NHP при указанных дозах. Данные по отдельным животным нанесены на график в указанные моменты времени; сплошная и пунктирная кривые отражают собой среднее значение для двух животных, когда это возможно, или для одного животного в каждой группе.

На **Фиг. 12G** и **12H** показаны связанные с CON1 и CON2 изменения в FAC на основе профилирования регуляторных Т-клеток ( $T_{reg}$ -клеток) у NHP при указанных дозах после введения CON1 или CON2. Данные по отдельным животным нанесены на график в указанные моменты времени; сплошная и пунктирная кривые отражают собой среднее значение для двух животных, когда это возможно, или для одного животного в каждой группе.

На **Фиг. 12I** и **12J** показаны связанные с CON1 или CON2 изменения в FAC на основе профилирования естественных клеток-киллеров (NK-клеток) у NHP при указанных дозах. Данные по отдельным животным нанесены на график в указанные моменты времени; сплошная и пунктирная кривые отражают собой среднее значение для двух животных, когда это возможно, или для одного животного в каждой группе.

На **Фиг. 13А** и **Фиг. 13В** показаны связанные с CON1 или CON2 изменения с соотношениями  $CD8^+$  и  $T_{reg}$  у NHP, при дозировании, показанном на Фиг. 12Е - Фиг. 12Н. Индивидуальные данные для животных в указанные моменты времени показаны в виде гистограмм. Пунктирная линия на каждом графике представляет собой уровни перед введением дозы для каждого животного.

На **Фиг. 14А** показано взаимодействие IL-2 (альдеслейкина) с тримером IL-2R $\alpha\beta\gamma$ .

На **Фиг. 14В** на панели А показаны остатки R37/F41 нативного IL-2 на границе раздела с IL-2R $\alpha$  и показано их взаимодействие с остатками IL-2R $\alpha$ . На панели В показан мутант IL-2 с заменами R37A/F41K на поверхности раздела с IL-2R $\alpha$ , демонстрирующий конфликт замен F41K с остатками IL-2R $\alpha$  и потерю электростатического взаимодействия из-за замены R37A.

На **Фиг. 15А** показана последовательность зрелого нативного IL-2 человека.

На **Фиг. 15В** показана последовательность зрелого альдеслейкина с положениями аминокислот, определенными в соответствии с нумерацией по схеме А.

На **Фиг. 15С** показана последовательность зрелого альдеслейкина с положениями аминокислот, определенными в соответствии с нумерацией по схеме В.

На **Фиг. 15D** показана последовательность зрелого CON1 с положениями аминокислот, определенными в соответствии с нумерацией по схеме А.

На **Фиг. 15Е** показана последовательность зрелого CON1 с положениями аминокислот, определенными в соответствии с нумерацией по схеме В.

На **Фиг. 16А** показана эффективность альдеслейкина в дозе 1 мг/кг в отношении уменьшения объема опухоли в виде монотерапии или комбинированной терапии с mDX400 на мышинной модели СТ26.

На **Фиг. 16В** показана эффективность CON1 в дозе 5 мг/кг в отношении уменьшения объема опухоли в виде монотерапии или комбинированной терапии с mDX400 на мышинной модели СТ26.

На **Фиг. 16С** показана эффективность CON1 в дозе 10 мг/кг в отношении уменьшения объема опухоли в виде монотерапии или комбинированной терапии с mDX400 на мышинной модели СТ26.

На **Фиг. 17А** показаны объемы опухолей отдельных животных для каждой группы лечения, показанной на Фиг. 16А.

На **Фиг. 17В** показаны объемы опухолей отдельных животных для каждой группы лечения, показанной на Фиг. 16В.

На **Фиг. 18А** показаны изменения массы тела отдельных животных в каждой группе лечения, показанной на Фиг. 16А.

На **Фиг. 18В** показаны изменения массы тела отдельных животных в каждой группе лечения, показанной на Фиг. 16В.

### **Подробное описание настоящего изобретения**

#### **Определения**

Используемый в настоящем документе термин «интерлейкин-2» или «IL-2» относится к любому IL-2 дикого типа или нативному IL-2 из любого источника позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. Этот термин охватывает непроцессированный IL-2, а также любую зрелую форму IL-2, в которой отсутствует N-концевая лидерная сигнальная последовательность. Этот термин также охватывает встречающиеся в природе варианты IL-2, например варианты сплайсинга или аллельные варианты. Аминокислотная последовательность зрелого IL-2 человека показана в SEQ ID NO: 1. Непроцессированный IL-2 человека дополнительно содержит N-концевой сигнальный пептид из 20 аминокислот, который отсутствует в молекуле зрелого IL-2 человека. Зрелый IL-2 человека имеет три цистеиновых остатка, а именно C58, C105 и C125, из которых C58 и C105 внутримолекулярно связаны дисульфидной связью (Tsuji et al., 1987, J. Biochem. 26: 129-134). Было установлено, что рекомбинантный зрелый IL-2 человека с делецией N-концевого остатка аланина (desAla1 или desA1) и заменой серина на цистеин в положении 125 (замена C125S), экспрессируемый в E. coli, является биологически активным после рефолдинг in vitro (Wang et al., 1984, Science, 224: 1431-1433; Yun et al., 1988, Kor. J. Biochem. 22: 120-126). Это соединение имеет непатентованное название альдеслейкин.

В данной области техники существуют две схемы нумерации положений аминокислот в молекулах desA1 IL-2, как показано на **Фиг. 15А-15Д**. В соответствии со схемой нумерации А аминокислоты в молекулах

desA1 IL-2 нумеруются, начиная с номера 1 для предпоследней аминокислоты на N-конце (Фиг. 15B, 15C и 15D). В соответствии со схемой нумерации В аминокислоты в молекулах desA1 IL-2 нумеруются в соответствии с аминокислотной последовательностью нативного зрелого IL-2, начиная с номера 2 для предпоследней аминокислоты на N-конце (Фиг. 15E).

Используемые здесь положения аминокислот могут быть обозначены следующим образом: за аминокислотой сразу следует номер положения; например, Trp26 или W26. В случае замены замещающая аминокислота следует за номером положения; например, Trp26Cys или W26C. Trp26Cys или W26C в этом неограничивающем примере означает, что аминокислота триптофан (Trp или W) в положении 26 заменена на цистеин (Cys или C).

Используемый здесь термин «мутантный IL-2» или «мутантный полипептид IL-2» или «мутант IL-2» в данном контексте относится к полипептиду IL-2, либо к нативному IL-2 человека, либо к desAla1, C125S IL-2 (например, к альдеслейкину), любой из которых имеет по меньшей мере одну замену аминокислоты на природную аминокислоту, которая влияет на взаимодействие IL-2 с CD25 или ингибирует его. Мутантные полипептиды IL-2 могут дополнительно включать замену C125S или A. Мутант IL-2 может быть полноразмерным, т.е. он имеет N-концевой остаток из аланина, или быть укороченным, т.е. не иметь N-концевого аланина. Если не указано иное, мутантный IL-2 может упоминаться здесь как мутантная пептидная последовательность IL-2, мутантный полипептид IL-2, мутантный белок IL-2 или мутантный аналог IL-2.

Используемый здесь термин «фрагмент IL-2» относится к мутантному IL-2 или к desAla1, C125S IL-2 (например, альдеслейкину), каждый из которых обладает активностью IL-2 человека, и содержащий по меньшей мере одну не встречающуюся в природе аминокислоту, имеющую функциональную группу, например, электрофильную группу или нуклеофильную группу, пригодную для взаимодействия с реакционноспособной группой непептидного водорастворимого полимера. Как будет более подробно объяснено ниже, специалист в данной области может определить, обладает ли какая-либо данная молекула IL-2 активностью IL-2.

Используемый здесь термин «конъюгат IL-2» относится к фрагменту IL-2, конъюгированному с непептидным водорастворимым полимером. Фрагмент IL-2 может быть непосредственно связан с реакционноспособной группой или внутри непептидного водорастворимого полимера через ковалентную связь, или фрагмент IL-2 может быть опосредованно связан с непептидным водорастворимым полимером через функциональную группу линкера, связанного с непептидным водорастворимым полимером.

Используемые здесь термины «ПЭГ», «PEG», «полиэтиленгликоль» и «поли(этиленгликоль)» являются взаимозаменяемыми, и они охватывают любой непептидный водорастворимый поли(этиленоксид). Как правило, ПЭГ для использования в соответствии с изобретением имеют следующую формулу «(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>», где (n) равняется от 2 до 4000. Используемый здесь термин ПЭГ также включает «-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-» и «-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-» в зависимости от того, были ли замещены концевые атомы кислорода, например, во время синтетического превращения. В отношении описания и формулы изобретения следует понимать, что термин «ПЭГ» включает структуры, имеющие различные концевые или «концевые кэпирующие» группы и т.д. Термин «ПЭГ» также означает полимер, который содержит большую часть, то есть более 50%, повторяющихся субъединиц -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. Что касается конкретных форм, то ПЭГ может иметь любые различные молекулярные массы, а также структуры или геометрии, такие как «разветвленные», «линейные», «многолучевые», «многофункциональные» и т.п., которые будут описаны более подробно ниже.

Используемый здесь термин «водорастворимый» в отношении «непептидного водорастворимого полимера» представляет собой любой непептидный полимер, который является растворимым в воде при

комнатной температуре. Как правило, водорастворимый полимер будет пропускать по меньшей мере около 75%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, света через его раствор после его фильтрация. На основе массы полимера, водорастворимый полимер будет по меньшей мере на 35% (по массе), более предпочтительно - по меньшей мере на 50% (по массе), еще более предпочтительно - на около 70% (по массе), и еще более предпочтительно - на около 85% (по массе) растворим в воде. Однако наиболее предпочтительно, чтобы водорастворимый полимер был на около 95% (по массе) растворим в воде, или полностью растворим в воде.

Молекулярная масса непептидного водорастворимого полимера, такого как ПЭГ, может быть выражена либо как среднечисловая молекулярная масса, либо как средневесовая молекулярная масса. Если не указано иное, все ссылки на молекулярную массу здесь относятся к средневесовой молекулярной массе. Оба определения молекулярной массы, среднечисловую и средневесовую, можно измерить с использованием гель-проникающей хроматографии или других методов жидкостной хроматографии.

Могут быть использованы и другие методы измерения значений молекулярной массы, такие как использование анализа конечных групп или измерение коллигативных свойств (например, снижение температуры замерзания, повышение точки кипения или осмотическое давление) для определения среднечисловой молекулярной массы, или использование методов светорассеяния, ультрацентрифугирования или вискозиметрии для определения средневесовой молекулярной массы. Полимеры по изобретению обычно являются полидисперсными (т.е. среднечисловая молекулярная масса и средневесовая молекулярная масса полимеров не равны), обладающими низкими значениями показателя полидисперсности, предпочтительно менее около 1,2, более предпочтительно менее около 1,15, еще более предпочтительно менее около 1,10, еще более предпочтительно менее около 1,05 и наиболее предпочтительно - менее около 1,03.

Используемый здесь термин «активный», «реакционноспособный» или «активированный» при использовании в сочетании с конкретной функциональной группой или реакционноспособной группой относится к реакционноспособной функциональной или реакционноспособной группе, которая легко реагирует с электрофилом или нуклеофилом на другой молекуле. Это отличает их от других групп, которым для реакции требуются сильные катализаторы или крайне непрактичные условия реакции (т.е. «нерактивные» или «инертные» группы). Используемая здесь «реакционноспособная группа» взаимодействует с функциональной группой с образованием ковалентной связи между ними.

Используемый здесь термин «функциональный группа» или «реакционноспособная группа», а также любой их синоним, охватывают как их защищенные формы, так и незащищенные формы.

Используемый здесь термин «линкер» относится к части молекулы, которая способна образовывать по меньшей мере две ковалентные связи между реакционноспособной группой и непептидным водорастворимым полимером.

Используемый здесь термин «гидролитически стабильная» связь или связывание относится к химической связи, обычно ковалентной связи, которая по существу стабильна в воде, то есть не подвергается гидролизу в физиологических условиях в какой-либо заметной степени в течение длительного промежутка времени. Примеры гидролитически стабильных связей включают, но не ограничиваются ими, следующие связи: углерод-углеродные связи (например, в алифатических цепях), простые эфиры, амиды, уретаны, триазолы и т.п. Как правило, гидролитически стабильной связью является такая связь, у которой скорость гидролиза менее около 1-2% в день в физиологических условиях. Скорости гидролиза типовых химических связей можно найти в большинстве стандартных химических справочниках.

Используемый здесь термин «аминокислота» относится к двадцати распространенным природным аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты включают аланин (Ala; A), аргинин (Arg; R), аспарагин (Asn; N), аспарагиновую кислоту (Asp; D), цистеин (Cys; C); глутаминовую кислоту (Glu; E), глутамин (Gln; Q), глицин (Gly; G); гистидин (His; H), изолейцин (Ile; I), лейцин (Leu; L), лизин (Lys; K), метионин (Met; M), фенилаланин (Phe; F), пролин (Pro; P), серин (Ser; S), треонин (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) и валин (Val; V).

Аминокислоты, кодируемые естественным образом, представляют собой протеиногенные аминокислоты, известные специалистам в данной области. Они включают 20 обычных аминокислот (аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, цистеин, глутамин, глутаминовую кислоту, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин) и менее распространенные пирролизин и селеноцистеин. Аминокислоты, кодируемые естественным образом, включают посттрансляционные варианты 22 встречающихся в природе аминокислот, таких как пренилированные аминокислоты, изопренилированные аминокислоты, миристоилированные аминокислоты, пальмитоилированные аминокислоты, N-связанные гликозилированные аминокислоты, O-связанные гликозилированные аминокислоты, фосфорилированные аминокислоты и ацилированные аминокислоты.

Используемые здесь термины «не встречающаяся в природе аминокислота» или «NNAА», или «неприродная аминокислота» или «UAA» относятся к аминокислоте, которая не является протеиногенной аминокислотой, или ее посттрансляционно модифицированному варианту. В частности, этот термин относится к аминокислоте, которая не является одной из 20 обычных аминокислот, пирролизина или селеноцистеина или их посттрансляционно модифицированных вариантов. Примеры не встречающихся в природе аминокислот включают, но не ограничиваются ими, п-азидометил-L-фенилаланин, п-азидо-L-фенилаланин, п-ацетил-L-фенилаланин, N6-азидоэтоксид-L-лизин, N6-пропаргилэтоксид-L-лизин (PraK), BCN-L-лизин, норборнен лизин, TCO-лизин, метилтетразинлизин, аллилоксикарбониллизин, 2-амино-8-оксононановую кислоту, 2-амино-8-оксооктановую кислоту, O-метил-L-тирозин, L-3-(2-нафтил)аланин, 3-метил-фенилаланин, O-4-аллил-L-тирозин, 4-пропил-L-тирозин, три-O-ацетил-GlcNAc-серин, L-дофа, фторированный фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин, п-бензоил-L-фенилаланин, L-фосфосерин, фосфоносерин, фосфонотирозин, п-йодофенилаланин, п-бромфенилаланин, п-амино-L-фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин, п-пропаргилоксифенилаланин, 2-амино-3-((2-((3-(бензилокси)-3-оксопропил)амино)этил)селанил)пропановую кислоту, 2-амино-3-(фенилселанил)пропановую кислоту, селеноцистеин, м-ацетилфенилаланин, 2-амино-8-оксононановую кислоту и п-пропаргилоксифенилаланин.

Используемый здесь термин «ортогональный» относится к молекуле (например, ортогональной тРНК (O-тРНК) и/или ортогональной аминоацил-тРНК-синтетазе (O-RS)), которая функционирует с эндогенными компонентами клетки сО сниженной эффективностью по сравнению с соответствующей молекулой, которая является эндогенной для клетки или системы трансляции, или которая не может функционировать с эндогенными компонентами клетки. В отношении тРНК и аминоацил-тРНК-синтаз термин «ортогональный» относится к неспособности или пониженной эффективности ортогональной тРНК для работы с эндогенной тРНК-синтетазой которая составляет, например, менее 20%, менее 10%, менее 5% или менее 1% эффективности по сравнению с эффективностью эндогенной тРНК для работы с эндогенной тРНК-синтетазой, или по сравнению с ортогональной аминоацил-тРНК-синтетазой для работы с эндогенной тРНК, или по сравнению с эндогенной тРНК-синтетазой для работы с эндогенной тРНК. Ортогональной молекуле в клетке не хватает функциональной эндогенной комплементарной молекулы. Например, ортогональная тРНК в клетке аминоацилируется любой эндогенной RS клетки со сниженной или даже нулевой эффективностью

по сравнению с аминокислотами эндогенной тРНК эндогенной RS. В другом примере ортогональная RS аминокислотирует любую эндогенную тРНК в интересующей клетке с пониженной или даже нулевой эффективностью по сравнению с аминокислотами эндогенной тРНК эндогенной RS. В клетку можно ввести вторую ортогональную молекулу, которая функционирует с первой ортогональной молекулой. Например, пара ортогональных тРНК/РС включает введенные комплементарные компоненты, которые совместно функционируют в клетке с эффективностью, например, с эффективностью 50%, с эффективностью 60%, с эффективностью 70%, с эффективностью 75%, с эффективностью 80%, с эффективностью 90%, с эффективностью 95% или с эффективностью 99% или более, по сравнению с эффективностью соответствующей эндогенной пары тРНК/РС.

Используемый здесь термин «комплементарный» относится к компонентам ортогональной пары, O-тРНК и O-RS, которые могут функционировать вместе, например, когда O-RS аминокислотирует O-тРНК.

Используемый здесь термин «система трансляции» относится к совокупности компонентов, которые обеспечивают включение встречающейся в природе аминокислоты в растущую полипептидную цепь (в белок). Компоненты системы трансляции могут включать, например, рибосомы, тРНК, синтетазы, мРНК, аминокислоты и т.п. Компоненты ортогональной системы трансляции включают, например, O-RS, O-тРНК, не встречающиеся в природе аминокислоты и т.п.), которые можно добавлять в систему трансляции *in vitro* или *in vivo*, например, в бесклеточную систему, в эукариотическую клетку, например, в дрожжевую клетку, клетку млекопитающего, клетку растения, клетку водоросли, клетку гриба, клетку насекомого и/или т.п.

Используемый здесь термин «комбинированная терапия» относится к лечению индивидуума, такого как человек или животное, предусматривающему введение индивидууму первого терапевтического агента и второго терапевтического агента последовательно или одновременно. Как правило, первый и второй терапевтические агенты вводят индивидууму отдельно, а не в виде смеси; однако могут быть варианты осуществления, в которых первый и второй терапевтические агенты смешивают перед введением.

Используемый здесь термин «комбинированный продукт» определяется в соответствии с 21 CFR3.2(e) и включает:

1. Продукт, состоящий из двух или более регулируемых компонентов, т.е. лекарство/устройство, биологический препарат/устройство, лекарство/биологическое средство или лекарство/устройство/биологический препарат, которые физически, химически или иным образом объединены или смешаны и произведены как единое целое;

2. Два или более отдельных продукта, упакованные вместе в одну упаковку или представленные как единое целое и состоящие из лекарственных средств и устройств, устройств и биологических продуктов или биологических и лекарственных продуктов;

3. Лекарственное средство, устройство или биологический продукт, упакованные отдельно, которые в соответствии с планом исследования или предлагаемой маркировкой предназначены для использования только с одобренным индивидуально определенным лекарственным средством, устройством или биологическим продуктом, когда они оба необходимы для обеспечения предполагаемого применения, показания или результата, и когда после одобрения предлагаемого продукта потребуется изменить маркировку одобренного продукта, например, чтобы отразить изменение предполагаемого применения, лекарственной формы, силы действия, пути введения или значительного изменения дозы; или

4. Любое исследуемое лекарственное средство, устройство или биологический продукт, упакованные отдельно, которые в соответствии с предлагаемой маркировкой предназначены для использования только с другим индивидуально указанным исследуемым лекарственным средством, устройством или биологическим

продуктом, если и то и другое необходимо для обеспечения предполагаемого применения, показания или результата.

Например, конъюгат PL-2 по настоящему изобретению и медицинское устройство для введения терапевтического средства представляют собой комбинированный продукт.

Используемые здесь термины «медицинское устройство для доставки» или «устройство» или «устройство для доставки лекарств» используются взаимозаменяемо и имеют определение, изложенное в Разделе 201(h) Закона о пищевых продуктах, лекарствах и косметических средствах, который определяет устройство как инструмент, аппарат, приспособление, машина, приспособление, имплантат, реагент *in vitro* или другое подобное или родственное изделие, включая составную часть или аксессуар, которые: (i) признаны официальным Национальным формуляром или Фармакопией США, или любым дополнением к ним, (ii) которые предназначены для использования при диагностике заболеваний или других состояний, или для лечения, смягчения последствий, лечения или предотвращения заболеваний у человека или других животных, или (iii) которые предназначены для воздействия на структуру или любую функцию тела человека или других животных, и которое не достигает своих основных целей путем химического воздействия внутри или на тело человека или других животных, и которое не достигает своих основных целей путем химического воздействия внутри или на тело человека или других животных и не зависит от метаболизма для достижения своих основных целей. Термин «устройство» не охватывает функции программного обеспечения, которые исключены в соответствии с разделом 520(o). Примеры устройств включают медицинские ручки-инъекторы и автоинъекторы.

Термины «лечить» или «лечение» любого заболевания или расстройства, используемые здесь в некоторых вариантах осуществления изобретения, относятся к облегчению заболевания или расстройства, существующего у субъекта. В другом варианте «лечение» или «лечение» включает улучшение по меньшей мере одного физического параметра, который может быть неощущаемым субъектом. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения «лечить» или «лечение» включает модулирование заболевания или расстройства либо физически (например, стабилизация различного симптома), либо физиологически (например, стабилизация физического параметра), либо и то и другое. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения «лечить» или «лечение» включает отсрочку или предотвращение начала заболевания или расстройства.

Используемый здесь термин «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» относится к количеству белка или композиции, которое при введении субъекту является эффективным для лечения заболевания или расстройства. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективное количество или эффективное количество относится к количеству белка или композиции, которое при введении субъекту является эффективным для предотвращения или облегчения заболевания, прогрессирования заболевания или приводит к облегчению симптомов.

Используемый здесь термин «по существу сходный» или «по существу такой же», используемый здесь, обозначает достаточно высокую степень сходства между двумя или более числовыми значениями, например, аффинностью связывания с рецептором, величины  $EC_{50}$  и т.д., так что специалист в данной области может счесть разницу между двумя или более значениями с малой или нулевой биологической и/или статистической значимостью в контексте биологической характеристики, определяемой указанным значением. В некоторых вариантах осуществления два или более по существу сходных значения могут отличаться друг от друга в пределах от 5% до 100%.



Используемый здесь термин «на N-конце или рядом с ним» в отношении IL-2 относится к аминокислоте на N-конце IL-2 или к положению в пределах первых 10 аминокислот, составляющих IL-2.

Используемый здесь термин «N-концевая область» по отношению к IL-2 относится к аминокислоте на N-конце IL-2 или к положению в пределах первых 20 или 30 аминокислот, составляющих IL-2.

### **Конъюгаты интерлейкина**

Настоящее изобретение относится к полипептидам интерлейкина 2 (IL-2), имеющим по меньшей мере одну или более аминокислотных замен, которые смещают связывание к димеру рецептора IL-2 $\beta\gamma_c$  (IL-2R $\beta\gamma_c$ ) вместо связывания с тримером рецептора IL-2 $\alpha\beta\gamma_c$  (IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ ), не встречающую в природе аминокислоту на N-конце полипептида IL-2 или вблизи него, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером на N-конце полипептида IL-2 или вблизи него, и при этом имеющим аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80-95% идентична аминокислотной последовательности IL-2 дикого типа или нативного IL-2 человека. Эти конъюгаты IL-2 не имеют обнаруживаемого связывания с IL-2R $\alpha$ , при этом сохраняя связывание с IL-2R $\beta\gamma_c$  на уровне, сходном с уровнем связывания нативного IL-2, определенного с помощью анализа SPR. Кроме того, эти полипептидные конъюгаты IL-2 обладают пониженной токсичностью по сравнению с коммерчески доступными полипептидами IL-2, и они имеют период полужизни в плазме по меньшей мере в пять раз больше, чем у коммерчески доступных полипептидов IL-2.

Настоящее изобретение относится к фрагментам IL-2, содержащим NNAA, которые описаны здесь, пригодные для конъюгирования с любым непептидным водорастворимым полимером, описанным здесь, с получением конъюгата IL-2, который описан здесь. Типичные фрагменты IL-2 включают следующие варианты выполнения, где в каждом варианте NNAA имеет или содержит функциональную группу, способную образовывать ковалентную связь с реакционноспособной группой внутри непептидного водорастворимого полимера или с реакционноспособной группой, связанной с непептидным водорастворимым полимером.

Настоящее изобретение относится к фрагменту IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

XXXXXXXXXXQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPXLXXMLXXXFXMPKKATELKHLCLEXXL  
XXLEXVLNXAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEXADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT (SEQ  
ID NO: 42),

где X1 представляет собой A, другую аминокислоту, NNAA или отсутствует; X2 представляет собой P, другую аминокислоту или NNAA; X3 представляет собой T, другую аминокислоту или NNAA; X4 представляет собой S, другую аминокислоту или NNAA; X5 представляет собой S, другую аминокислоту или NNAA; X6 представляет собой S, другую аминокислоту или NNAA; X7 представляет собой T, другую аминокислоту или NNAA; X8 представляет собой K, другую аминокислоту или NNAA; X9 представляет собой K, другую аминокислоту или NNAA; X10 представляет собой T, другую аминокислоту или NNAA; X35 представляет собой K или другую аминокислоту; X37 представляет собой T или другую аминокислоту; X38 представляет собой R или другую аминокислоту; X41 представляет собой T или другую аминокислоту; X42 представляет собой F или другую аминокислоту; X43 представляет собой K или другую аминокислоту; X45 представляет собой Y или другую аминокислоту; X61 представляет собой E или другую аминокислоту; X62 представляет собой E или другую аминокислоту; X64 представляет собой K или другую аминокислоту; X65

представляет собой Р или другую аминокислоту; X68 представляет собой Е или другую аминокислоту; X72 представляет собой L или другую аминокислоту; X107 представляет собой Y или другую аминокислоту; X125 представляет собой С или другую аминокислоту; при условии, что (i) X1-X10 содержат только одну NNAA и (ii) по меньшей мере одна из аминокислот в положениях 35, 37, 38, 41, 42, 43, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72 и 107 не является аминокислотой в соответствующем положении в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. В конкретных вариантах осуществления аминокислота X125 представляет собой любую аминокислоту, отличную от С, которая в дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения может быть аминокислотой А или S.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 42, по меньшей мере две аминокислоты, выбранные из положений 35, 37, 38, 41, 42, 43, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72 и 107, не являются аминокислотами в соответствующих положениях аминокислот в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 42, по меньшей мере две из аминокислот, выбранных из положений 35, 37, 38, 41, 42, 43, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72 и 107, не являются аминокислотами в их соответствующих положениях в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и аминокислота X125 представляет собой любую аминокислоту, отличную от С, которая в другом варианте осуществления настоящего изобретения может представлять собой аминокислоту А или S. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в вышеуказанной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42 NNAA конъюгирована с непептидным водорастворимым полимером. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения NNAA представляет собой пара-азидометилфенилаланин. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В еще одном варианте настоящее изобретение относится к фрагменту IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

XXXXXXXXXXQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPXLXXMLXXXFXMPKKATELKHLCLEXLX  
XLEXVLNXAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEXADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT (SEQ  
ID NO: 43)

в которой X1 представляет собой Р, другую аминокислоту или NNAA; X3 представляет собой Т, другую аминокислоту или NNAA; X4 представляет собой S, другую аминокислоту или NNAA; X5 представляет собой S, другую аминокислоту или NNAA; X6 представляет собой S, другую аминокислоту или NNAA; X7 представляет собой Т, другую аминокислоту или NNAA; X8 представляет собой К, другую аминокислоту или NNAA; X9 представляет собой К, другую аминокислоту или NNAA; X9 представляет собой Т, другую аминокислоту или NNAA; X34 представляет собой К или другую аминокислоту; X36 представляет собой Т или другую аминокислоту; X37 представляет собой R или другую аминокислоту; X40 представляет собой Т или другую аминокислоту; X41 представляет собой F или другую аминокислоту; X42 представляет собой К или другую аминокислоту; X44 представляет собой Y или другую аминокислоту; X60 представляет собой Е или другую аминокислоту; X61 представляет собой Е или другую аминокислоту; X63 представляет собой К или другую аминокислоту; X64 представляет собой Р или другую аминокислоту; X67 представляет собой Е или другую аминокислоту; X71 представляет собой L или другую аминокислоту; X106 представляет собой Y или другую аминокислоту; и X124 представляет собой С или другую аминокислоту; при условии, что (i) X1-X9 содержат только одну NNAA, и (ii) по меньшей мере одна из аминокислот в

положениях 34, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 67, 71 и 106 не является аминокислотой в соответствующем положении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислота X124 представляет собой любую аминокислоту, отличную от С, которая в дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения может быть аминокислотой А или S.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 43, по меньшей мере две аминокислоты, выбранные из положений 34, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 67, 71 и 106, не являются аминокислотами в соответствующих положениях аминокислот в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 43, по меньшей мере две аминокислоты, выбранные из положений 34, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 67, 71 и 106, не являются аминокислотами в их соответствующих положениях в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и аминокислота X124 представляет собой любую аминокислоту, отличную от С, которая в другом варианте осуществления настоящего изобретения может представлять собой аминокислоту А или S. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в указанной выше аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43 NNAА конъюгирована с непептидным водорастворимым полимером. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения NNAА представляет собой пара-азидометилфенилаланин. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер представляет собой ПЭГ.

В еще одном варианте настоящее изобретение относится к фрагменту IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

PTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPXLXXMLXXXFXMPKKATELKHLCLEXXLXX  
LEXVLNXAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEXADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 44)

в которой X4 представляет собой NNAА, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером; X34 представляет собой К или другую аминокислоту; X36 представляет собой Т или другую аминокислоту; X37 представляет собой R или другую аминокислоту; X40 представляет собой Т или другую аминокислоту; X41 представляет собой F или другую аминокислоту; X42 представляет собой К или другую аминокислоту; X44 представляет собой Y или другую аминокислоту; X60 представляет собой E или другую аминокислоту; X61 представляет собой E или другую аминокислоту; X63 представляет собой К или другую аминокислоту; X64 представляет собой P или другую аминокислоту; X67 представляет собой E или другую аминокислоту; X71 представляет собой L или другую аминокислоту; X106 представляет собой Y или другую аминокислоту; и X124 представляет собой С или другую аминокислоту; при условии, что по меньшей мере одна из аминокислот в положениях 34, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 67, 71 и 106 не является аминокислотой в соответствующем положении в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислота X124 представляет собой любую аминокислоту, отличную от С, которая в другом варианте осуществления настоящего изобретения может представлять собой аминокислоту А или S.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 44, по меньшей мере две аминокислоты, выбранные из положений 34, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 67, 71 и 106, не являются аминокислотами в соответствующих положениях аминокислот в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В

дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 42, по меньшей мере две аминокислоты, выбранные из положений 34, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 67, 71 и 106, не являются аминокислотами в их соответствующих положениях в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и аминокислота X124 представляет собой любую аминокислоту, отличную от С, которая в дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения может представлять собой аминокислоту А или S. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения NNAА представляет собой пара-азидометилфенилаланин. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер представляет собой ПЭГ.

В еще одном варианте настоящее изобретение относится к фрагменту IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTXMLTXKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPL  
EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 45)

в которой X4 представляет собой NNAА; X37 представляет собой любую аминокислоту, кроме R; X41 представляет собой любую аминокислоту, кроме F; и X124 представляет собой любую аминокислоту, кроме С.

В еще одном варианте настоящее изобретение относится к фрагменту IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

APTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTXMLTXKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKP  
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 46)

в которой X5 представляет собой NNAА; X38 представляет собой любую аминокислоту, кроме R; X42 представляет собой любую аминокислоту, кроме F; и X125 представляет собой любую аминокислоту, кроме С.

В еще одном варианте настоящее изобретение относится к фрагменту IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPL  
EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 47)

в которой X4 представляет собой NNAА, и X124 представляет собой А или S.

В еще одном варианте настоящее изобретение относится к фрагменту IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

APTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKP  
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 48)

в которой X5 представляет собой NNAА, и X125 представляет собой А или S.

В еще одном варианте настоящее изобретение относится к фрагменту IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKA TELKHLQCLEEELKPL  
EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 49)

в которой X4 представляет собой NNAА, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером.

В еще одном варианте настоящее изобретение относится к фрагменту IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

APTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKP  
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 50)

в которой X5 представляет собой NNAА.

В еще одном варианте настоящее изобретение относится к фрагменту IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

PTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKPL  
EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 51)

в которой X4 представляет собой пара-азидометилфенилаланин.

В еще одном варианте настоящее изобретение относится к фрагменту IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

APTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKP  
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 52)

в которой X5 представляет собой пара-азидометилфенилаланин.

Настоящее изобретение относится к конъюгатам IL-2, содержащим NNAА, как описано здесь, конъюгированную с любым непептидным водорастворимым полимером, описанным здесь. Примеры конъюгатов IL-2 включают следующие варианты выполнения.

Настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

XXXXXXXXXXQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPXLXXMLXXXFXMPKKA TELKHLQCLEXXL  
XXLEXVLNXAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEXADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT (SEQ  
ID NO: 3)

в которой X1 представляет собой А, другую аминокислоту, NNAА или отсутствует; X2 представляет собой Р, другую аминокислоту или NNAА; X3 представляет собой Т, другую аминокислоту или NNAА; X4 представляет собой S, другую аминокислоту или NNAА; X5 представляет собой S, другую аминокислоту или NNAА; X6 представляет собой S, другую аминокислоту или NNAА; X7 представляет собой Т, другую аминокислоту или NNAА; X8 представляет собой К, другую аминокислоту или NNAА; X9 представляет собой К, другую аминокислоту или NNAА; X10 представляет собой Т, другую аминокислоту или NNAА; X35 представляет собой К или другую аминокислоту; X37 представляет собой Т или другую аминокислоту; X38 представляет собой R или другую аминокислоту; X41 представляет собой Т или другую аминокислоту; X42 представляет собой F или другую аминокислоту; X43 представляет собой К или другую аминокислоту; X45 представляет собой Y или другую аминокислоту; X61 представляет собой E или другую аминокислоту; X62 представляет собой E или другую аминокислоту; X64 представляет собой К или другую аминокислоту; X65 представляет собой Р или другую аминокислоту; X68 представляет собой E или другую аминокислоту; X72 представляет собой L или другую аминокислоту; X107 представляет собой Y или другую аминокислоту; X125 представляет собой С или другую аминокислоту; при условии, что (i) в X1-X10 содержится только одна

NNAA, и NNAA конъюгирована с непептидным водорастворимым полимером и (ii) по меньшей мере одна из аминокислот в положениях 35, 37, 38, 41, 42, 43, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72 и 107 не является аминокислотой в соответствующем положении в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. В конкретных вариантах осуществления аминокислота X124 представляет собой любую аминокислоту, отличную от С, которая в другом варианте осуществления настоящего изобретения может представлять собой аминокислоту А или S.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, по меньшей мере две аминокислоты, выбранные из положений 35, 37, 38, 41, 42, 43, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72 и 107, не являются аминокислотами в соответствующих положениях аминокислот в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, по меньшей мере две аминокислоты, выбранные из положений 35, 37, 38, 41, 42, 43, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72 и 107, не являются аминокислотами в их соответствующих положениях в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и аминокислота X125 представляет собой любую аминокислоту, отличную от С, которая в дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения может представлять собой аминокислоту А или S. В конкретных вариантах осуществления NNAA представляет собой пара-азидометилфенилаланин. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер представляет собой ПЭГ.

В еще одном варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

XXXXXXXXXXQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPXLXXMLXXXFXMPKKATELKHLQCLEXLXLX  
XLEXVLNXAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEXADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT (SEQ  
ID NO: 4)

в которой X1 представляет собой Р, другую аминокислоту или NNAA; X2 представляет собой Т, другую аминокислоту или NNAA; X3 представляет собой S, другую аминокислоту или NNAA; X4 представляет собой S, другую аминокислоту или NNAA; X4 представляет собой S, другую аминокислоту или NNAA; X6 представляет собой Т, другую аминокислоту или NNAA; X7 представляет собой К, другую аминокислоту или NNAA; X8 представляет собой К, другую аминокислоту или NNAA; X9 представляет собой Т, другую аминокислоту или NNAA; X34 представляет собой К или другую аминокислоту; X36 представляет собой Т или другую аминокислоту; X37 представляет собой R или другую аминокислоту; X40 представляет собой Т или другую аминокислоту; X41 представляет собой F или другую аминокислоту; X42 представляет собой К или другую аминокислоту; X44 представляет собой Y или другую аминокислоту; X60 представляет собой E или другую аминокислоту; X61 представляет собой E или другую аминокислоту; X63 представляет собой К или другую аминокислоту; X64 представляет собой P или другую аминокислоту; X67 представляет собой E или другую аминокислоту; X71 представляет собой L или другую аминокислоту; X106 представляет собой Y или другую аминокислоту; и X124 представляет собой С или другую аминокислоту; при условии, что (i) в X1-X9 содержится только одна NNAA, и NNAA конъюгирована с непептидным водорастворимым полимером, и (ii) по меньшей мере одна из аминокислот в положениях 34, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 67, 71 и 106 не является аминокислотой в соответствующем положении в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В конкретных вариантах осуществления аминокислота X124 представляет собой любую аминокислоту, отличную от С, которая в другом варианте осуществления настоящего изобретения может представлять собой аминокислоту А или S.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, по меньшей мере две аминокислоты, выбранные из положений 34, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 67, 71 и 106, не являются аминокислотами в соответствующих положениях аминокислот в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, по меньшей мере две аминокислоты, выбранные из положений 34, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 67, 71 и 106, не являются аминокислотами в их соответствующих положениях в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и аминокислота X125 представляет собой любую аминокислоту, отличную от С, которая в дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения может представлять собой аминокислоту А или S. В конкретных вариантах осуществления NNAА представляет собой пара-азидометилфенилаланин. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер представляет собой ПЭГ.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

PTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPXLXXMLXXXFXMPKKATELKHLCLEXXLXX  
LEXVLNXAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEXADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 5)

в которой X4 представляет собой NNAА, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером; X34 представляет собой К или другую аминокислоту; X36 представляет собой Т или другую аминокислоту; X37 представляет собой R или другую аминокислоту; X40 представляет собой Т или другую аминокислоту; X41 представляет собой F или другую аминокислоту; X42 представляет собой К или другую аминокислоту; X44 представляет собой Y или другую аминокислоту; X60 представляет собой Е или другую аминокислоту; X61 представляет собой Е или другую аминокислоту; X63 представляет собой К или другую аминокислоту; X64 представляет собой Р или другую аминокислоту; X67 представляет собой Е или другую аминокислоту; X71 представляет собой L или другую аминокислоту; X106 представляет собой Y или другую аминокислоту; и X124 представляет собой С или другую аминокислоту; при условии, что по меньшей мере одна из аминокислот в положениях 34, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 67, 71 и 106 не является аминокислотой в соответствующем положении в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В конкретных вариантах осуществления аминокислота X124 представляет собой любую аминокислоту, отличную от С, которая в другом варианте осуществления настоящего изобретения может представлять собой аминокислоту А или S.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, по меньшей мере две аминокислоты, выбранные из положений 34, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 67, 71 и 106, не являются аминокислотами в соответствующих положениях аминокислот в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, по меньшей мере две аминокислоты, выбранные из положений 34, 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 67, 71 и 106, не являются аминокислотами в их соответствующих положениях в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и аминокислота X125 представляет собой любую аминокислоту, отличную от С, которая в дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения может быть аминокислотой А или S. В конкретных вариантах осуществления NNAА представляет собой пара-

азидометилфенилаланин. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер представляет собой ПЭГ.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTXMLTXKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPL  
EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 6)

в которой X4 представляет собой NNAА, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером; X37 представляет собой любую аминокислоту, кроме R; X41 представляет собой любую аминокислоту, кроме F; и X124 представляет собой любую аминокислоту, кроме С.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

APTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTXMLTXKFYMPKKATELKHLCLEEEELKP  
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 7)

в которой X5 представляет собой NNAА, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером; X38 представляет собой любую аминокислоту, кроме R; X42 представляет собой любую аминокислоту, кроме F; и X125 представляет собой любую аминокислоту, кроме С.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPL  
EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 8)

в которой X4 представляет собой NNAА, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, и X124 представляет собой А или S.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

APTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLCLEEEELKP  
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 9)

в которой X5 представляет собой NNAА, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, и X125 представляет собой А или S.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPL  
EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 10)

в которой X4 представляет собой NNAА, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности



APTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLCLEEEELKP  
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 11)

в которой X5 представляет собой NNAА, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

PTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPL  
EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 12)

в которой X4 представляет собой пара-азидометилфенилаланин, конъюгированный с непептидным водорастворимым полимером.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

APTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLCLEEEELKP  
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 13)

в которой X5 представляет собой пара-азидометилфенилаланин, конъюгированный с непептидным водорастворимым полимером.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

PTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPL  
EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 14)

в которой X4 представляет собой пара-азидометилфенилаланин, конъюгированный с ПЭГ.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

APTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLCLEEEELKP  
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 15)

в которой X5 представляет собой ПЭГ, конъюгированный с пара-азидометилфенилаланином.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

PTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLCLEEEELKPL  
EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 16)

в которой X4 представляет собой пара-азидометилфенилаланин, конъюгированный с ПЭГ, кэпированным по концам метильной группой (mPEG).

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности

APTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKP  
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 17)

в которой X5 представляет собой пара-азидометилфенилаланин, конъюгированный с mPEG.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или  
состоящему из аминокислотной последовательности

PTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKPL  
EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 18)

в которой X4 представляет собой пара-азидометилфенилаланин, конъюгированный с ПЭГ,  
кэпированным по концам метильной группой (mPEG), где mPEG имеет молекулярную массу 30 кДа.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или  
состоящему из аминокислотной последовательности

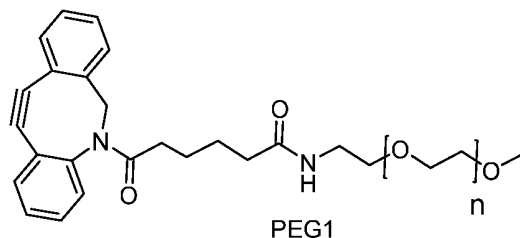
APTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKP  
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 19)

в которой X5 представляет собой пара-азидометилфенилаланин, конъюгированный с mPEG с  
молекулярной массой 30 кДа.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или  
состоящему из аминокислотной последовательности

PTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKPL  
EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 20)

в которой X4 представляет собой пара-азидометилфенилаланин, конъюгированный с DBCO\_30  
кДа\_ПЭГ (PEG1) триазольной связью, где PEG1 имеет формулу



где n равняется около 681.

В другом варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему или  
состоящему из аминокислотной последовательности

APTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKA TELKHLQCLEEEELKP  
LEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID  
NO: 21)

в которой X5 представляет собой пара-азидометилфенилаланин, конъюгированный с PEG1  
триазольной связью.

В публикации Stauber et al. , Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 103:2788-2793 (2006) раскрыто, что природа  
интерфейса IL-2/IL-2R $\alpha$  включает гидрофобный центр, в котором преобладают остатки IL-2R $\alpha$ , такие как L2 $^a$ ,

M25<sup>a</sup>, L42<sup>a</sup> и Y43<sup>a</sup>, и остатки IL-2, такие как F42<sup>IL-2</sup>, F44<sup>IL-2</sup>, Y45<sup>IL-2</sup>, P65<sup>IL-2</sup> и L72<sup>IL-2</sup>, а также полярную периферию с пятью ионными парами (K38<sup>a</sup>/E61<sup>IL-2</sup>, R36<sup>a</sup>/E62<sup>IL-2</sup>, E1<sup>a</sup>/K35<sup>IL-2</sup>, D6<sup>a</sup>/R38<sup>IL-2</sup> и E29<sup>a</sup>/K43<sup>IL-2</sup>).

В этой публикации также утверждается, что для связывания IL-2 с IL-2R $\beta$ , остатки D20<sup>IL2</sup> и H16<sup>IL2</sup> по-видимому являются наиболее важными остатками; D20<sup>IL2</sup> связывается водородными связями с H133 <sup>$\beta$</sup>  и Y134 <sup>$\beta$</sup> , тогда как H16<sup>IL2</sup> входит в щель, образованную Y134 <sup>$\beta$</sup> , Q188 <sup>$\beta$</sup>  и метильными группами T74 <sup>$\beta$</sup>  и T73 <sup>$\beta$</sup> . Основные ван-дер-ваальсовы контакты в интерфейсе также осуществляются с помощью R41 <sup>$\beta$</sup> , V75 <sup>$\beta$</sup> , H133 <sup>$\beta$</sup> , L19<sup>IL2</sup>, D84<sup>IL2</sup>, N88<sup>IL2</sup> и V91<sup>IL2</sup>.

В этой публикации далее утверждается, что в соответствии с биохимическими данными, для связывания IL-2 с IL-2R $\gamma_c$ , IL-2 со скрытой площадью поверхности 72 Å<sup>2</sup> и одной водородной связью, Q126<sup>IL2</sup> является наиболее важным остатком IL-2, который контактирует с  $\gamma_c$ . Остатки E15<sup>IL2</sup>, T123<sup>IL2</sup> и I129<sup>IL2</sup> вносят вклад в другие важные взаимодействия с интерфейсом IL-2/ $\gamma_c$ .

Таким образом, настоящее изобретение относится к фрагментам IL-2 и конъюгатам IL-2, раскрытым здесь, в которых аминокислотная последовательность полипептида IL-2 за исключением замены NNAA и замены одной или более аминокислот, которые снижают аффинность полипептида IL-2 к тримеру  $\alpha\beta\gamma_c$  рецептора IL-2 человека (IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ ) по сравнению с IL-2 человека дикого типа, или исключают связывание с IL-2R $\alpha$ , и последовательность которого по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:1 для нативного IL-2, в SEQ ID NO:53 для desA1\_IL-2 или в SEQ ID NO:2 для альдеслейкина. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотная последовательность полипептида IL-2, содержащая фрагмент IL-2, или конъюгата, по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:1 для нативного IL-2, в SEQ ID NO: 53 для desA1\_IL-2 или в SEQ ID NO: 2 для альдеслейкина, при условии, что полипептид IL-2 содержит по меньшей мере аминокислоты E15, H16, L19, D20, D84, N88, V91, Q126, T123 и I129 (по схеме нумерации B).

Настоящее изобретение также относится к любому варианту осуществления, раскрытому здесь, в котором не встречающаяся в природе аминокислота конкретно не идентифицирована как замещающая остаток серина в положении четыре, поскольку он соответствует положению четыре в SEQ ID NO:2, где замена или вставка не встречающейся в природе аминокислоты находится в пределах N-концевой области, например, (i) замена аминокислоты в пределах первых 30 аминокислот на N-конце полипептида IL-2 на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставка не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером, в пределах первых 30 аминокислот на N-конце полипептида IL-2, или (ii) замена аминокислоты в пределах первых 20 аминокислот на N-конце полипептида IL-2 на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставка не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером, в пределах первых 20 аминокислот на N-конце полипептида IL-2.

Таким образом, настоящее изобретение относится к (a) конъюгату IL-2, содержащему полипептид IL-2, который содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, и которая дополнительно содержит: (i) одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность полипептида IL-2 к IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$  человека по сравнению с IL-2 человека дикого типа; и (ii) замену аминокислоты в N-концевой области полипептида IL-2 на не встречающуюся в природе аминокислоту,

конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку из не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером в N-концевой области полипептида IL-2; при этом полипептид IL-2 имеет по существу сходную аффинность связывания с IL-2R $\beta\gamma_c$  человека по сравнению с IL-2 человека дикого типа.

В конкретном варианте настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему полипептид IL-2, который содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, и которая дополнительно содержит: (i) одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность полипептида IL-2 к IL-2R $\beta\gamma_c$  человека по сравнению с IL-2 человека дикого типа; и (ii) замену аминокислоты в N-концевой области, включающей первые 30 аминокислот на N-конце полипептида IL-2, на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку из не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером, в N-концевой области, содержащей первые 30 аминокислот на N-конце полипептида IL-2; при этом полипептид IL-2 имеет по существу сходную аффинность связывания с IL-2R $\beta\gamma_c$  человека по сравнению с IL-2 человека дикого типа.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату IL-2, содержащему полипептид IL-2, который содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, и которая дополнительно содержит: (i) одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность полипептида IL-2 к IL-2R $\beta\gamma_c$  человека по сравнению с IL-2 человека дикого типа; и (ii) замену аминокислоты в N-концевой области, включающей первые 20 аминокислот на N-конце полипептида IL-2, на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку из не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером, в N-концевой области, содержащей первые 20 аминокислот на N-конце полипептида IL-2; при этом полипептид IL-2 имеет по существу сходную аффинность связывания с IL-2R $\beta\gamma_c$  человека по сравнению с IL-2 человека дикого типа.

#### **Непептидные водорастворимые полимеры**

Настоящее изобретение относится к конъюгатам, содержащим мутант IL-2, который содержит не встречающуюся в природе аминокислоту (фрагмент IL-2), присоединенную к непептидному водорастворимому полимеру. Что касается водорастворимого полимера, то в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер является непептидным, нетоксичным, не встречающимся в природе и биосовместимым полимером. Что касается биосовместимости, то вещество считается биосовместимым, если благоприятные эффекты, связанные с использованием вещества отдельно или с другим веществом (например, с активным агентом, таким как фрагмент IL-2) в отношении живых тканей (например, при введении пациенту) перевешивают любые вредные эффекты, оцененные клиницистом, например врачом. Что касается неиммуногенности, то вещество считается неиммуногенным, если предполагаемое применение вещества *in vivo* не вызывает нежелательного иммунного ответа (например, образования антител) или, если иммунный ответ возникает, то такой ответ не считается клинически значимыми или важными по оценке клинициста. Особенно предпочтительно, чтобы непептидный водорастворимый полимер был биосовместимым и неиммуногенным.

Кроме того, полимер обычно характеризуется наличием от двух до около 300 концов. Примеры таких полимеров включают, но не ограничиваются ими, поли(алкиленгликоли), такие как полиэтиленгликоль («ПЭГ», «PEG»), поли(пропиленгликоль) («ППГ», «PPG»), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля и т.п., поли(оксиэтилированный полиол), поли(олефиновый спирт), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли( $\alpha$ -гидроксикислота), поли(виниловый спирт), полифосфазен, полиоксазолины («POZ») (которые описаны в публикации WO 2008/106186), поли(N-акрилоилморфолин) и комбинации любых из вышеуказанных.

Непептидный водорастворимый полимер не ограничен конкретной структурой, и он может иметь линейную (например, с экзипированными концами, например, алкокси-ПЭГ или бифункциональный ПЭГ), разветвленную или многолучевую (например, раздвоенный ПЭГ или ПЭГ, присоединенный к полиольному ядру) или дендритную (или звездообразную) структуру, каждая из которых имеет одну или более разлагаемых связей или без них. Кроме того, внутренняя структура непептидного водорастворимого полимера может быть организована в виде любого количества различных повторяющихся структур, и она может быть выбрана из группы, состоящей из гомополимера, чередующегося сополимера, статистического сополимера, блок-сополимера, чередующегося триполимера, статистического триполимера и блок-триполимера.

Как правило, активированный ПЭГ и другие активированные непептидные водорастворимые полимеры (т.е. полимерные реагенты) активируются подходящей реакционноспособной группой, подходящей для связывания с функциональной группой не встречающейся в природе аминокислоты, представленной в фрагменте IL-2. Таким образом, полимерный реагент должен иметь реакционноспособную группу для взаимодействия с функциональной группой не встречающейся в природе аминокислоты в составе фрагмента IL-2. Репрезентативные полимерные реагенты и способы конъюгации этих полимеров с активным фрагментом известны в данной области техники и дополнительно описаны в Zalipsky, S., et al., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides", в монографии Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Plenum Press, New York (1992) и в публикации Zalipsky (1995) *Advanced Drug Reviews* 16:157-182. Примеры реакционноспособных групп, пригодных для связывания с функциональной группой не встречающейся в природе аминокислоты в фрагменте IL-2, включают гидроксил, малеимид, сложный эфир, ацеталь, кеталь, амин, карбокси, альдегид, гидрат альдегида, кетон, винилкетон, тион, тиол, винилсульфон, гидразин, алкин, азид и другие. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения реакционноспособная группа представляет собой алкин, например, напряженный алкин, как описано ниже, который способен образовывать ковалентную связь с азидом в функциональной группе не встречающейся в природе аминокислоты в фрагменте IL-2.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полимерный реагент, используемый для получения описанных здесь конъюгатов, получают без использования фосгена. Такой подход отличается, например, от раскрытия, изложенного в патенте США № 4902502, в котором конкретно описано получение хлорформиата и последующее его использование для образования PEG-активного сложного эфира, который затем подвергают взаимодействию с не встречающейся в природе аминокислотой фрагмента IL-2. Использование фосгена приводит к образованию хлороводорода, что может привести к расщеплению цепи в полимере, тем самым увеличивая количество примесей, которые невозможно удалить с помощью обычных методов. Таким образом, не ограничиваясь какой-либо теорией, можно сказать, что конъюгаты фрагментов IL-2, полученные из полимерных реагентов, образованных без использования фосгена, обеспечивают композиции более высокого качества, в которых по существу отсутствуют продукты разложения полимерной цепи. Кроме того, в одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения линкер между

непептидным водорастворимым полимером и функциональной группой не является карбаматсодержащим линкером.

Как правило, средневесовая молекулярная масса непептидного водорастворимого полимера в конъюгате составляет от около 100 дальтон (Да) до около 150000 Да. Однако типовые диапазоны включают средневесовые молекулярные массы в диапазоне от более 5000 Да до около 100000 Да, в диапазоне от около 6000 Да до около 90000 Да, в диапазоне от около 10000 Да до около 85000 Да, в диапазон от более 10000 Да до около 85000 Да, в диапазоне от около 20000 Да до около 85000 Да, в диапазоне от около 53000 Да до около 85000 Да, в диапазоне от около 25000 Да до около 120000 Да, в диапазоне от около 29000 до около 120000 Да, в диапазоне от около 35000 Да до около 120000 Да, и в диапазоне от около 40000 Да до около 120000 Да. Для любого заданного непептидного водорастворимого полимера предпочтительно, чтобы ПЭГ имел молекулярную массу, входящую в один или более из этих диапазонов.

Типовые молекулярные массы непептидного водорастворимого полимера включают значения, равные около 100 Да, около 200 Да, около 300 Да, около 400 Да, около 500 Да, около 600 Да, около 700 Да, около 750 Да, около 800 Да, около 900 Да, около 1000 Да, около 1500 Да, около 2000 Да, около 2200 Да, около 2500 Да, около 3000 Да, около 4000 Да, около 4400 Да, около 4500 Да, около 5000 Да, около 5500 Да, около 6000 Да, около 7000 Да, около 7500 Да, около 8000 Да, около 9000 Да, около 10000 Да, около 11000 Да, около 12000 Да, около 13000 Да, около 14000 Да, около 15000 Да, около 20000 Да, около 22500 Да, около 25000 Да, около 30000 Да, около 35000 Да, около 40000 Да, около 45000 Да, около 50000 Да, около 55000 Да, около 60000 Да, около 65000 Да, около 70000 Да и около 75000 Да. Разветвленные варианты непептидного водорастворимого полимера (например, может быть использован разветвленный непептидный водорастворимый полимер с молекулярной массой 40000 Да, состоящий из двух полимеров с молекулярной массой 20000 Да, или разветвленный непептидный водорастворимый полимер с молекулярной массой 20000 Да, состоящий из двух полимеров с молекулярной массой 10000 Да) могут иметь любую общую молекулярную массу из числа вышеперечисленных. В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения конъюгат не имеет фрагментов ПЭГ, присоединенных прямо или опосредованно, и он имеет средневесовую молекулярную массу менее около 6000 дальтон.

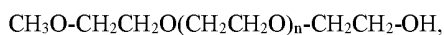
При использовании ПЭГ в качестве непептидных соединений, он обычно содержит ряд  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)$  мономеров (или  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$  мономеров, в зависимости от определения ПЭГ). Как используется по тексту настоящего описания, количество повторяющихся звеньев определяется нижним индексом «n» в « $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ ». Таким образом, значение (n) обычно попадает в один или более из следующих диапазонов: от 2 до около 3400, от около 100 до около 2300, от около 100 до около 2270, от около 136 до около 2050, от около 225 до около 1930, от около 450 до около 1930, от около 1200 до около 1930, от около 568 до около 2727, от около 660 до около 2730, от около 795 до около 2730, от около 795 до около 2730, от около 909 до около 2730, и от около 1200 до около 1900. Для любого заданного полимера, молекулярная масса которого известна, можно определить количество повторяющихся звеньев (т.е. «n») путем деления общей средневесовой молекулярной массы полимера на молекулярную массу повторяющегося мономера.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения полимер для использования в настоящем изобретении представляет собой полимер с кэпированными концами, то есть полимер, имеющий по меньшей мере один конец, кэпированный относительно инертной группой, такой как низшая  $\text{C}_{1-6}$  алкоксигруппа, хотя также может использоваться и гидроксильная группа. Когда полимер представляет собой ПЭГ, то может быть желательно, например, использовать метокси-ПЭГ (обычно называемый mPEG), который представляет собой линейную форму ПЭГ, где один конец полимера представляет собой метокси  $(-\text{OCH}_3)$  группу, в то время как

другой конец представляет собой гидроксильную или другую реакционноспособную группу, которая может быть необязательно химически модифицированной.

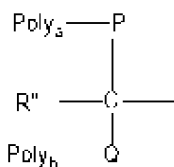
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения свободный или несвязанный ПЭГ представляет собой линейный полимер, оканчивающийся на каждом конце гидроксильными группами:  $\text{HO-CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ , где (n) обычно варьирует от нуля до около 4000. Вышеуказанный полимер, альфа-, омега-дигидроксиполи(этиленгликоль), может быть представлен в краткой форме как HO-PEG-OH, где понятно, что обозначение -PEG- может представлять следующую структурную единицу:  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , где (n) имеет определение, указанное выше.

Другим типом ПЭГ, применимым в одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения, является метокси-ПЭГ-ОН или, кратко mPEG, в котором один конец представляет собой относительно инертную метоксигруппу, а другой конец представляет собой гидроксильную группу. Формула mPEG приведена ниже:



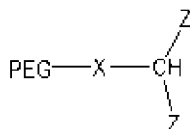
где (n) является таким, как указано выше.

В качестве полимера ПЭГ также можно использовать многолучевые или разветвленные молекулы ПЭГ, такие как описанные в патенте США № 5932462. Например, ПЭГ может иметь формулу:



где Poly<sub>a</sub> и Poly<sub>b</sub> представляют собой основные цепи ПЭГ (одинаковые или разные), такие как метоксиполи(этиленгликоль); R'' представляет собой нерекционноспособный фрагмент, такой как H, метил или основная цепь ПЭГ; и P и Q являются нерекционноспособными связями.

Кроме того, ПЭГ может включать двухлучевой (раздвоенный) ПЭГ. Пример двухлучевого ПЭГ представлен следующей формулой:



где X представляет собой линкер из одного или более атомов, а каждый Z представляет собой активированную концевую группу, связанную с СН цепочкой атомов определенной длины. В публикации международной заявки на выдачу патента WO 99/45964 раскрыты различные раздвоенные структуры ПЭГ, которые можно использовать в одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения. Цепочка атомов, связывающая функциональные группы Z с разветвляющим атомом углерода, служит связующей группой, и она может включать, например, алкильные цепи, простые эфирные цепи, сложноэфирные цепи, амидные цепи и их комбинации.

Полимер ПЭГ может содержать боковую молекулу ПЭГ, имеющую реакционноспособные группы, такие как карбоксильные, ковалентно присоединенные по длине ПЭГ, а не к концам цепи ПЭГ. Боковые реакционноспособные группы могут быть присоединены к ПЭГ непосредственно или через линкер, такой как группа алкилена.

Специалистам в данной области понятно, что приведенное выше обсуждение непептидного водорастворимого полимера ни в коем случае не является исчерпывающим, и оно носит исключительно иллюстративный характер, и при этом рассматриваются все полимерные материалы, обладающие описанными выше свойствами. Используемый здесь термин «полимерный реагент» обычно относится ко всей молекуле, которая может содержать сегмент водорастворимого полимера и функциональную группу.

Как правило, для любого конъюгата по изобретению будет достаточно от одного до трех непептидных водорастворимых полимеров, ковалентно связанных с одним или более фрагментами ПЛ-2, обладающими активностью ПЛ-2. Однако в некоторых случаях конъюгат может иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более непептидных водорастворимых полимеров, индивидуально присоединенных к фрагменту ПЛ-2. Непептидные водорастворимые полимеры обычно присоединены к боковым цепям сайт-специфических не встречающихся в природе аминокислот, что подробно описано ниже.

Что касается полимерных реагентов, то те, которые описаны здесь и в других источниках, могут быть приобретены из коммерческих источников или получены из коммерчески доступных исходных материалов. Кроме того, в литературе описаны способы получения полимерных реагентов.

Связь между не встречающейся в природе аминокислотой фрагмента ПЛ-2 и непептидным водорастворимым полимером может быть непосредственной, в которой нет вмешательства атомов находящихся в расположении между частью ПЛ-2 и непептидным водорастворимым полимером, или же опосредованной, где один или же более атомов находятся в расположении между частью ПЛ-2 и непептидным водорастворимым полимером. В отношении опосредованной связи «линкер» служит в качестве спейсера между функциональной группой и непептидным водорастворимым полимером. Один или более атомов, составляющих линкер, могут включать один или более атомов углерода, атомов азота, атомов серы, атомов кислорода, а также их комбинации. Линкер может содержать амидную группу, группу вторичного амина, карбаматную группу, тиоэфирную группу и/или дисульфидную группу. Неограничивающие примеры конкретных линкеров включают линкеры, выбранные из группы, состоящий из -O-, -S-, -S-, -C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, -C(S)-, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-, -C(O)-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-O-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -NH-CH<sub>2</sub>-, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-CH<sub>2</sub>-, -C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N-N-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -O-C(O)-NH-[CH<sub>2</sub>]<sub>h</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-, двухвалентной циклоалкильной группы, -O-, -S-, аминокислоты, -N(R<sup>6</sup>) - и комбинации двух или более из любого из вышеперечисленных, где R<sup>6</sup> представляет собой H или органический радикал, выбранный из группы, состоящей из алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила и замещенного арила, (h) равняется от нуля до шести и (j) равняется от нуля до 20. Другие специфические спейсерные фрагменты имеют следующие формулы: -C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-



${}_{6}\text{-NH-C(O)NH-C(O)-NH-(CH}_2\text{)}_{1-6}\text{-NH-C(O)-}$  и  $\text{-OC(O)-NH-(CH}_2\text{)}_{1-6}\text{-NH-C(O)-}$ , где значения нижнего индекса после каждого метилена указывают количество метиленовых групп, содержащихся в формуле, например,  $(\text{CH}_2)_{1-6}$  означает, что формула может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 метиленовых групп. Кроме того, любой из вышеуказанных линкеров может дополнительно включать олигомерную цепь этиленоксида, содержащую от 1 до 20 мономерных звеньев этиленоксида [т.е.,  $\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{1-20}$ ]. Таким образом, олигомерная цепь этиленоксида может располагаться до или после линкера и необязательно между любыми двумя атомами линкера, состоящего из двух или более атомов. Кроме того, олигомерная цепь не считается частью линкера, если олигомер является соседним к сегменту полимера, и он просто представляет собой удлинение полимерного сегмента. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 атомов углерода. Примеры линкеров включают, но не ограничиваются указанными ниже структурами:



где  $p$  представляет собой целое число от 1 до 10, а волнистые линии указывают связи с N в DBCO слева и с C в PEG справа. В конкретных вариантах осуществления  $p$  равняется 1, 3 или 5.

Может быть использован ПЭГ с любой молекулярной массой по желанию, включая, но не ограничиваясь этим, от около 100 Да до 100000 Да, или более желательно (включая, но не ограничиваясь этим) 0,1-50 кДа или 10-40 кДа. Также можно использовать ПЭГ с разветвленной цепью, который включает, помимо прочего, молекулы ПЭГ, каждая цепь которых имеет молекулярную массу (ММ) в диапазоне от 1 до 100 кДа (включая, но не ограничиваясь этим, 1-50 кДа или 5-20 кДа). Широкий спектр молекул ПЭГ описан, в частности, в каталоге Shearwater Polymers, Inc. и каталоге Nektar Therapeutics, которые включены в настоящее описание посредством ссылки.

Как правило, по меньшей мере один конец непептидного водорастворимого полимера, например, молекулы ПЭГ, доступен для реакции с не встречающейся в природе аминокислотой фрагмента IL-2. Например, непептидный водорастворимый полимер, несущий алкиновые или азидные реакционноспособные группы для взаимодействия с боковыми цепями не встречающихся в природе аминокислот, может быть использован для присоединения непептидного водорастворимого полимера к сайт-специфическим не встречающимся в природе аминокислотам в фрагменте IL-2, которые содержат соответствующую азидную или алкиновую группу, соответственно, как описано в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, когда сайт-специфическая не встречающаяся в природе аминокислота содержит азид, то непептидный водорастворимый полимер обычно будет содержать либо группу, реагирующую с алкином, для образования продукта [3+2] циклоприсоединения (триазола). В качестве альтернативы, если сайт-специфическая не встречающаяся в природе аминокислота содержит алкин, то непептидный водорастворимый полимер обычно будет содержать азидную реакционноспособную группу для осуществления образования продукта [3+2] циклоприсоединения Хьюсгена. Если сайт-специфическая не встречающаяся в природе аминокислота содержит в качестве функциональной группы карбонильную группу, то непептидный водорастворимый полимер обычно будет содержать активную нуклеофильно-реакционноспособную группу (включая, помимо прочего, гидразидную, гидразиновую, гидроксиламиновую или семикарбазидную функциональность) для осуществления образования соответствующих гидразонных, оксимных и семикарбазоновых связей, соответственно. В других альтернативах может быть использована обратная ориентация реакционноспособных и функциональных групп, описанных в настоящем документе,

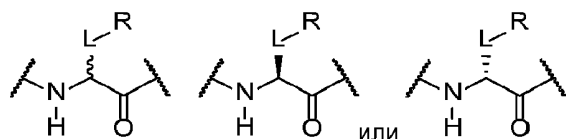
т.е. азид в сайт-специфической не встречающейся в природе аминокислоте может реагировать с непептидным водорастворимым полимером, содержащим алкин внутри своей структуры или связанный с ней.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения непептидный водорастворимый полимер представляет собой азид- или алкинсодержащий полимер, содержащий непептидную водорастворимую полимерную цепь со средней молекулярной массой от около 1000 Да до около 100000 Да.

### Не встречающиеся в природе аминокислоты

Не встречающаяся в природе аминокислота может представлять собой любую не встречающуюся в природе аминокислоту, которую специалист сочтет подходящей. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота содержит функциональную группу, пригодную для образования ковалентной связи с реакционноспособной группой, присутствующей в непептидном водорастворимом полимере или на линкере, связанном с непептидным водорастворимым полимером. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения функциональная группа выбрана из группы, состоящей из амина, карбокси, ацетила, гидразино, гидразидо, семикарбазидо, сульфанила, азидо и алкинила, при условии, что функциональная группа выбрана как способная образовывать ковалентную связь с реакционноспособной группой, находящейся внутри или связанную с непептидным водорастворимым полимером. Модифицированные аминокислоты также описаны, например, в публикациях WO 2013185115 и WO 2015006555, содержание каждой из которых во всей своей полноте включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аминокислотный остаток соответствует любой из следующих формул:



Специалистам в данной области известно, что белки обычно состоят из L-аминокислот. Однако способы и композиции с не встречающимися в природе аминокислотами, представленные в настоящем изобретении, предоставляют специалисту возможность использовать L, D или рацемические не встречающиеся в природе аминокислоты в специфичных для сайта положениях. В некоторых вариантах осуществления не встречающиеся в природе аминокислоты, описанные в настоящем документе, включают D-варианты природных аминокислот и рацемические варианты природных аминокислот.

В приведенных выше формулах волнистые линии обозначают связи, которые соединяются с остатками полипептидных цепей белков. Эти не встречающиеся в природе аминокислоты могут быть включены в полипептидные цепи точно так же, как природные аминокислоты включены в те же самые полипептидные цепи. В некоторых вариантах осуществления не встречающиеся в природе аминокислоты включены в полипептидную цепь посредством амидных связей, как указано в формулы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сайт-специфические не встречающиеся в природе аминокислоты содержат функциональные группы боковой цепи, которые эффективно и селективно взаимодействуют с реакционноспособными группами, и которые не встречаются в 20 обычных аминокислотах (включая, помимо прочего, азидо, кетон, альдегид и аминоксигруппы) с образованием устойчивых конъюгатов. Например, фрагмент IL-2, который содержит сайт-специфическую не встречающуюся в природе аминокислоту, содержащую функциональную азидогруппу, может

взаимодействовать с реакционноспособной группой непептидного водорастворимого полимера, содержащего алкиновый фрагмент, с образованием стабильного конъюгата, полученного в результате селективной реакции между азидной и алкиновой группами с образованием продукта [3+2] циклоприсоединения Хьюстена.

Примеры сайт-специфических не встречающихся в природе аминокислот, которые могут подходить для использования в настоящем изобретении, и которые применимы для реакций с непептидными водорастворимыми полимерами, включают, но не ограничиваются ими, аминокислоты с карбонильной, аминоокси, гидразиновой, гидразидной, семикарбазидной, азидной и алкиновой функциональными группами. В некоторых вариантах осуществления сайт-специфические не встречающиеся в природе аминокислоты содержат сахаридный фрагмент. Примеры таких аминокислот включают N-ацетил-L-глюкозаминил-L-серин, N-ацетил-L-галактозаминил-L-серин, N-ацетил-L-глюкозаминил-L-треонин, N-ацетил-L-глюкозаминил-L-аспарагин и O-маннозаминил-L-серин. Примеры таких аминокислот также включают примеры, в которых встречающаяся в природе N- или O-связь между аминокислотой и сахаридом заменена ковалентной связью, которая обычно не встречается в природе, включая но без ограничения, алкеновую, оксимовую, тиоэфирную, амидную и подобные связи. Примеры таких аминокислот также включают сахараиды, которые обычно не встречаются в природных белках, такие как 2-дезоксиглюкоза, 2-дезоксигалактоза и подобные сахараиды.

Конкретные примеры не встречающихся в природе аминокислот, которые могут быть подходящими для использования в настоящем изобретении включают, но не ограничиваются ими, п-азидометил-L-фенилаланин, п-азидо-L-фенилаланин, п-ацетил-L-фенилаланин, N<sub>6</sub>-азидоэтокси-L-лизин, N<sub>6</sub>-пропаргилэтокси-L-лизин (PraK), BCN-L-лизин, норборнелизин, TCO-лизин, метилтетразинлизин, аллилоксикарбониллизин, 2-амино-8-оксононановую кислоту, 2-амино-8-оксооктановую кислоту, O-метил-L-тирозин, L-3-(2-нафтил)аланин, 3-метилфенилаланин, O-4-аллил-L-тирозин, 4-пропил-L-тирозин, три-O-ацетил-GlcNAc-серин, L-дофа, фторированный фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин, п-бензоил-L-фенилаланин, L-фосфосерин, фосфоносерин, фосфотирозин, п-йодофенилаланин, п-бромфенилаланин, п-амино-L-фенилаланин, изопропил-L-фенилаланин, п-пропаргилоксифенилаланин, 2-амино-3-((3-(бензилокси)-3-оксопропил)амино)этил)селанил)пропановую кислоту, 2-амино-3-(фенилселанил)пропановую кислоту, селеноцистеин, м-ацетилфенилаланин, 2-амино-8-оксононановую кислоту и п-пропаргилоксифенилаланин, и подобные. Примеры структур различных не встречающихся в природе аминокислот, которые могут подходить для использования в настоящем изобретении, приведены, например, в публикации WO 2002085923, озаглавленной «In vivo incorporation of unnatural amino acids». См. также публикацию Kiick et al., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24, в отношении аналогов метионина.

Многие не встречающиеся в природе аминокислоты, пригодные для использования в настоящем изобретении, являются коммерчески доступными, например, от Sigma (США) или Aldrich (Милуоки, Висконсин, США). Те аминокислоты, которые не являются коммерчески доступными, можно необязательно синтезировать, как описано в настоящем документе, или как представлено в различных публикациях, или получить с использованием стандартных способов, известных специалистам в данной области. В отношении способов органического синтеза см., например, Organic Chemistry by Fessenden and Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York); и Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York). Дополнительные публикации, описывающие синтез не встречающихся в природе аминокислот, включают, например, публикацию WO 2002/085923, озаглавленную «Включение in vivo не встречающихся в природе аминокислот»; Matsoukas et al., (1995) J. Med. Chem., 38, 4660-4669; King, F.E. &

Kidd, D.A.A. (1949) A New Synthesis of Glutamine and of  $\gamma$ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. *J. Chem. Soc.*, 3315-3319; Friedman, O.M. & Chatterji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 3750-3752; Craig, J. C. et al. (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4 [[4-(diethyl amino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine). *J. Org. Chem.* 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, *Eur. J. Med. Chem.* 26, 201-5; Koskinen, A. M. P. & Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Pralines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. *J. Org. Chem.* 54, 1859-1866; Christie, B. D. & Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. *J. Org. Chem.* 1989:1859-1866; Barton et al., (1987) Synthesis of Novel  $\alpha$ -Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- $\alpha$ -Amino-Adipic Acids, L- $\alpha$ -aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. *Tetrahedron Lett.* 43:4297-4308; и Subasinghe et al., (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. *J. Med. Chem.* 35:4602-7. Также см. патентные заявки под названием «Белковые матрицы»: № 10/744899, поданную 22 декабря 2003 г., и № 60/435821, поданную 22 декабря 2002 г.

Уникальная реакционная способность азидных и алкиновых групп делает их чрезвычайно полезными для селективной модификации полипептидов и других биологических молекул. Органические азиды, особенно алифатические азиды, и алкины, как правило стабильны по отношению к обычным реакционноспособным химическим условиям. В частности, как азидная, так и алкиновая функциональные или реакционноспособные группы инертны по отношению к боковым цепям (т.е. группам R) 20 обычных аминокислот, встречающихся в природных полипептидах. При сближении обнаруживается «подпружиненная» природа азидной и алкиновой групп, и они избирательно и эффективно реагируют посредством реакции циклоприсоединения Хьюсгена [3+2] с образованием соответствующего триазола. См., например, Chin J., et al., *Science* 301:964-7 (2003); Wang, Q., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Chin, J. W., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002).

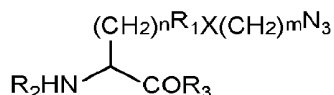
Поскольку реакция циклоприсоединения Хьюсгена включает селективную реакцию циклоприсоединения (см., например, Padwa, A., в *COMPREHENSIVE ORGANIC SYNTHESIS*, Vol. 4, (ed. Trost, B. M., 1991), p. 1069-1109; Huisgen, R. в *1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION CHEMISTRY*, (ed. Padwa, A., 1984), p. 1-176), а не нуклеофильную замену, то включение сайт-специфических не встречающихся в природе аминокислот, несущих азид- и алкин-содержащие боковые цепи, позволяет избирательно модифицировать полученные полипептиды в положении сайт-специфичной не встречающейся в природе аминокислоты. Реакцию циклоприсоединения с участием азид- или алкинсодержащего белка можно проводить при комнатной температуре в водных условиях путем добавления Cu(II) (включая, но не ограничиваясь этим, в виде каталитического количества CuSO<sub>4</sub>) в присутствии восстановителя для восстановления Cu(II) до Cu(I) в каталитическом количестве *in situ*. См., например, Wang, Q., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3192-3193 (2003); Tornoe, C. W., et al., *J. Org. Chem.* 67:3057-3064 (2002); Rostovtsev, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599 (2002). Примеры восстановителей включают, но не ограничиваются ими, аскорбат, металлическую медь, хинин, гидрохинон, витамин К, глутатион, цистеин, Fe<sup>2+</sup>Co<sup>2+</sup>, и приложение электрического потенциала.

В некоторых случаях, когда желательна реакция [3+2] циклоприсоединения Хьюсгена между азидом и алкином, то антигенсвязывающий полипептид должен содержать сайт-специфическую не встречающуюся в природе аминокислоту, содержащую алкиновый фрагмент, и водорастворимый полимер, присоединенный к аминокислоте, должен содержать азидный фрагмент. Альтернативно, также может быть выполнена

обратная реакция (т.е. с азидной частью аминокислоты и алкиновой частью непептидного водорастворимого полимера).

Азидная функциональная группа также может селективно реагировать с непептидным водорастворимым полимером, содержащим ариловый сложный эфир и надлежащим образом функционализированным арилфосфиновым фрагментом с образованием амидной связи. Арилфосфиновая группа восстанавливает азид *in situ*, и полученный амин затем эффективно реагирует с проксимальной сложноэфирной связью с образованием соответствующего амида. См., например, E. Saxon and C. Bertozzi, *Science* 287, 2007-2010 (2000). Аминокислота, содержащая азид, может быть либо алкилазидом (включая, помимо прочего, 2-амино-6-азидо-1-гексановую кислоту), либо арилазидом. (п-азидо-фенилаланин).

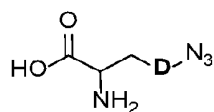
Примеры азидсодержащих аминокислот включают следующие:



где  $n$  равняется 0-10;  $\text{R}_1$  представляет собой алкил, арил, замещенный алкил, замещенный арил или отсутствует;  $\text{X}$  представляет собой O, N, S или отсутствует;  $m$  равняется 0-10;  $\text{R}_2$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу модификации amino-конца, и  $\text{R}_3$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу модификации карбоксиконца. В некоторых вариантах осуществления изобретения  $n$  равняется 1,  $\text{R}_1$  представляет собой фенил,  $\text{X}$  отсутствует,  $m$  равняется 0, и азидная группа расположена в пара-положении к алкильной боковой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения  $n$  равняется 0-4,  $\text{R}_1$  и  $\text{X}$  отсутствуют, и  $m$  равняется 0. В некоторых вариантах осуществления изобретения  $n$  равняется 1,  $\text{R}_1$  представляет собой фенил,  $\text{X}$  равняется 0,  $m$  равняется 2, и п-азидоэтоксифрагмент находится в пара-положении относительно алкильной боковой цепи.

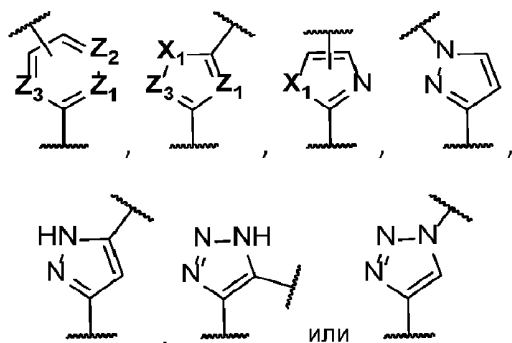
Азидсодержащие аминокислоты доступны из коммерческих источников. Например, 4-азидофенилаланин можно получить от Chem-Impex International, Inc. (Вуд Дейл, Иллинойс). Для тех азидсодержащих аминокислот, которые коммерчески недоступны, азидную группу можно получить относительно легко, используя стандартные методы, известные специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, замещение подходящей уходящей группы (включая без ограничения галогенид, мезилат, тозилат) или путем открытия соответствующим образом защищенного лактона. См., например, *Advanced Organic Chemistry by March* (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York).

В некоторых вариантах осуществления изобретения не встречающаяся в природе аминокислота соответствует соединению формулы I:



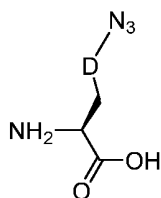
или его соли, где: D представляет собой -Ar-W<sub>3</sub>- или -W<sub>1</sub>-Y<sub>1</sub>-C(O)-Y<sub>2</sub>-W<sub>2</sub>-;

Ar представляет собой

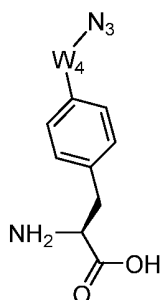


каждый из  $W_1$ ,  $W_2$  и  $W_3$  независимо представляет собой простую связь или низший алкилен; каждый  $X_1$  независимо представляет собой -NH-, -O- или -S-; каждый  $Y_1$  независимо представляет собой одинарную связь, -NH- или -O-; каждый  $Y_2$  независимо представляет собой одинарную связь, -NH-, -O- или N-связанный или C-связанный пирролидинилен; и один из  $Z_1$ ,  $Z_2$  и  $Z_3$  представляет собой -N-, а другие из  $Z_1$ ,  $Z_2$  и  $Z_3$  независимо представляют собой -CH-, и волнистая линия указывает на связь с соседним атомом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения не встречающаяся в природе аминокислота соответствует соединению формулы II:

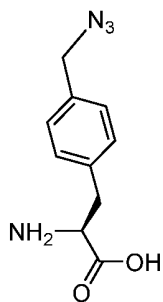


где D определен в контексте формулы I. В некоторых вариантах осуществления изобретения не встречающаяся в природе аминокислота соответствует соединению формулы IIb:



или его соли, где  $W_4$  представляет собой  $C_1$ - $C_{10}$  алкилен. В другом варианте осуществления настоящего изобретения  $W_4$  представляет собой  $C_1$ - $C_5$  алкилен. В другом варианте осуществления настоящего изобретения  $W_4$  представляет собой  $C_1$ - $C_3$  алкилен. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения  $W_4$  представляет собой  $C_1$  алкилен.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой п-азидометилфенилаланин (pAMF):



или его соли. Такие не встречающиеся в природе аминокислоты могут быть в форме соли или могут быть включены в не встречающийся в природе аминокислотный полипептид, полимер, полисахарид или полинуклеотид, и необязательно посттрансляционно модифицированы.

### Линкеры

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фрагменты ПЛ-2 могут быть связаны с непептидными водорастворимыми полимерами с помощью одного или более линкеров, способных взаимодействовать с аминокислотой фрагмента ПЛ-2 и с непептидной водорастворимой полимерной группой. Один или более линкеров могут представлять собой любые линкеры, известные специалистам в данной области.

Полезные линкеры включают описанные здесь линкеры. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер представляет собой любой двухвалентный или поливалентный линкер, известный специалистам в данной области. Полезные двухвалентные линкеры включают алкилен, замещенный алкилен, гетероалкилен, замещенный гетероалкилен, арилен, замещенный арилен, гетероарлиен и замещенный гетероарлиен. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер является  $C_{1-10}$  алкиленом или  $C_{1-10}$  гетероалкиленом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения  $C_{1-10}$  гетероалкилен представляет собой ПЭГ.

Обычно линкер гидролитически стабилен. Гидролитически стабильные связи представляют собой связи, которые практически стабильны в воде и не реагируют с водой при физиологических значениях pH, включая, но не ограничиваясь ими, физиологические условия в течение продолжительного периода времени, возможно даже неопределенно долго.

Линкер может иметь широкий диапазон молекулярных масс или молекулярных длин. Линкеры с большей или меньшей молекулярной массой могут быть использованы для обеспечения желаемого пространственного соответствия или конформации между фрагментом ПЛ-2 и связанным непептидным водорастворимым полимером. Линкеры, имеющие большую или короткую молекулярную длину, также могут быть использованы для обеспечения желаемой пространственной структуры или гибкости между фрагментом и связанным с ним непептидным водорастворимым полимером. Аналогичным образом, линкер, имеющий определенную форму или конформацию, может быть использован для придания конкретной формы или конформации полипептиду или связанному объекту либо до, либо после того, как полипептид достигнет своей мишени. Эта оптимизация пространственного соотношения между полипептидом и связанным объектом может придать новые, модулируемые или желаемые свойства молекуле.

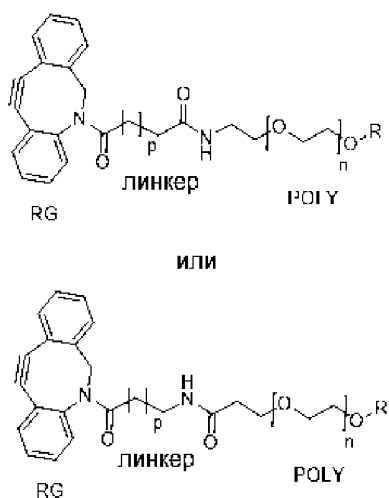
В некоторых вариантах осуществления изобретения непептидные водорастворимые полимеры могут быть связаны с линкерами, называемыми в настоящем документе линкерами непептидных водорастворимых полимеров, с одной или более линкерными группами, способными реагировать с функциональной группой фрагмента ПЛ-2. Один или более линкеров могут представлять собой любые линкеры, известные специалистам

в данной области, или линкеры, указанные выше. здесь. В конкретных вариантах осуществления непептидный водорастворимый полимер, конъюгированный с реакционноспособной группой, имеет формулу:

**(RG)-(линкер)-(POLY)-x**

где RG представляет собой реакционноспособную группу, которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой не встречающейся в природе аминокислоты; линкер представляет собой ковалентную связь или замещенный или незамещенный C<sub>1-20</sub> алкил; POLY представляет собой непептидный водорастворимый полимер; и x представляет собой спирт или метильную группу на конце POLY.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения POLY представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой от около 5 до около 100 килодальтон (кДа). В некоторых вариантах полиэтиленгликоль имеет молекулярную массу 10000, 20000 или 30000 кДа. Каждое этиленгликолевое звено полиэтиленгликоля имеет молекулярную массу около 44 Да. Таким образом, ПЭГ с молекулярной массой 30 кДа содержит около 681 этиленгликолевых звеньев. Типичная молекула (RG)-(линкер)-(POLY)-x имеет структуру, описываемую следующей формулой:



где p представляет собой целое число от 1 до 10; n представляет собой целое число от 1 до 5000; и R представляет собой концевую группу, выбранную из метила и H. В конкретных вариантах осуществления изобретения p представляет собой целое число от 1 до 6.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения POLY представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой от около 5 до около 100 килодальтон (кДа). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полиэтиленгликоль имеет молекулярную массу 10000, 20000 или 30000 кДа. Каждое этиленгликолевое звено полиэтиленгликоля имеет молекулярную массу около 44 Да. Таким образом, ПЭГ с молекулярной массой 30 кДа содержит около 681 этиленгликолевых звеньев.

Другие полезные фрагменты линкер-ПЭГ описаны в патентах США US 8680315 и US 8754190, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

**Примеры конъюгатов**

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлены конъюгаты в соответствии с формулой:

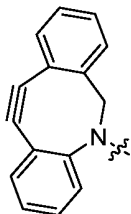
**(COMP)<sub>n</sub>-QQ-LL-POLY-x**



где **COMP** представляет собой не встречающуюся в природе аминокислоту фрагмента ПL-2, как описано выше; **QQ** представляет собой двухвалентный остаток конъюгирующей группы; **LL** является необязательным линкером; *n* представляет собой целое число от одного до пяти, **POLY** представляет собой непептидный водорастворимый полимер, как описано здесь, и *x* представляет собой метил или спирт. Как обсуждалось выше, фрагмент ПL-2 может быть связан с одним или более чем одним непептидным водорастворимым полимером, где каждый непептидный водорастворимый полимер связан с остатком **COMP** фрагмента ПL-2.

Конъюгирующие группы облегчают конъюгацию описанной здесь реакционноспособной группы с описанной здесь функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления конъюгирующая группа для обеспечения конъюгации обозначена здесь как **QQ**. Конъюгирующие группы могут реагировать посредством любого подходящего механизма реакции, известного специалистам в данной области. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения конъюгирующая группа реагирует посредством реакции [3+2] алкин-азидного циклоприсоединения, реакции лигирования Дильса-Альдера с обратной потребностью в электронах, тиол-электрофильной реакции или реакции карбонил-оксиамин, как подробно описано здесь. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа содержит алкин, нразветвленный алкин, тетразин, тиол, остаток пара-ацетилфенилаланина, оксиамин, маленимид или азид.

В некоторых вариантах осуществления конъюгирующая группа представлена следующей формулой:

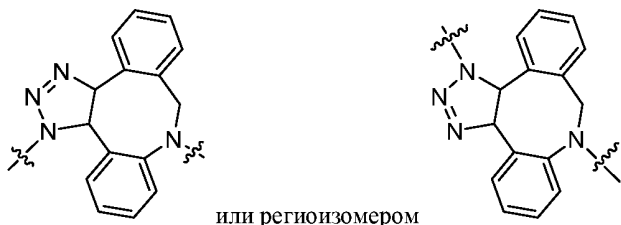


где волнистая линия указывает на связь с соседним атомом, например, углеродным остатком линкера, ПЭГ или линкера с ПЭГ.

Дополнительные конъюгирующие группы описаны, например, в публикации патента США № 2014/0356385, в публикации патента США № 2013/0189287, в публикации патента США № 2013/0251783, в патенте США № 8703936, в патенте США № 9145361, в патенте США № 9222940 и в патенте США № 8431558.

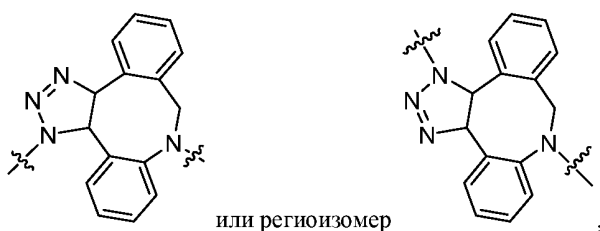
После конъюгации образуется двухвалентный остаток «**QQ**» конъюгирующей группы, который присоединяется к остатку второго соединения. Структура двухвалентного остатка определяется типом реакции конъюгации, используемой для образования конъюгата.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда конъюгат образуется посредством реакции [3+2] алкин-азидного циклоприсоединения, двухвалентный остаток конъюгирующей группы содержит триазольное кольцо или конденсированную циклическую группу, содержащую триазольное кольцо. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения, когда конъюгат образуется в результате промотируемой реакции [3+2] разветвленного алкин-азидного циклоприсоединения (SPAAC), двухвалентный остаток конъюгирующей группы представлен следующей формулой:



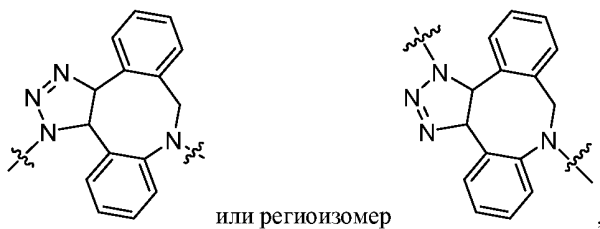
где волнистая линия указывает на связь с соседним атомом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения представлен конъюгат в соответствии с формулой, указанной выше, или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомер или таутомер; где **QQ** содержит триазольное кольцо. В одном варианте осуществления настоящего изобретения представлен конъюгат в соответствии с формулой, указанной выше, или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомер или таутомер; где **QQ** представляет собой триазольное кольцо или конденсированную циклическую группу, включающую триазольное кольцо. В одном варианте осуществления настоящего изобретения представлен конъюгат в соответствии с формулой, указанной выше, или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомер или таутомер; где **QQ** представляет собой:



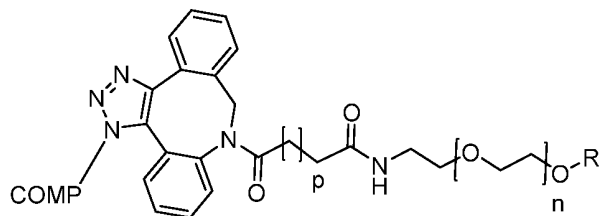
где волнистая линия указывает на связь с соседним атомом.

В одном аспекте настоящего изобретения представлен конъюгат IL-2, содержащий водорастворимый полимер, описанный здесь, а также необязательный линкер, описанный здесь, связанный с конъюгатом IL-2, где **COMP** представляет собой остаток конъюгата IL-2. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения представлен конъюгат IL-2 в соответствии с формулой, указанной выше, или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомер или таутомер, где **COMP** представляет собой остаток фрагмента IL-2; и **QQ** содержит триазольное кольцо или конденсированную циклическую группу, включающую триазольное кольцо. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения представлен конъюгат IL-2 в соответствии с формулой (Cl) или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомер или таутомер, где **COMP** представляет собой остаток фрагмента IL-2; и **QQ** представляет собой:

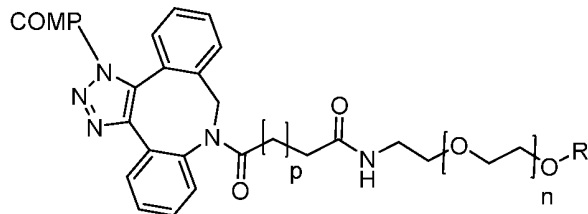


где волнистая линия указывает на связь с соседним атомом.

В одном из вариантов осуществления представлен конъюгат в соответствии со следующей формулой, где **COMP** означает не встречающийся в природе аминокислотный остаток фрагмента IL-2, *p* представляет собой целое число от 1 до 10; *n* представляет собой целое число от 1 до 5000; и *r* представляет собой концевую группу, выбранную из метила и H:

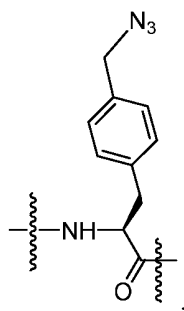


или региоизомер, имеющий формулу



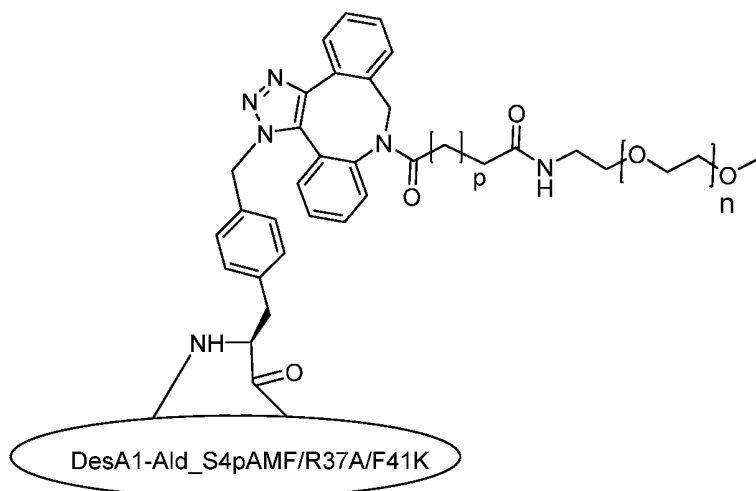
В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения представлены конъюгаты IL-2 в соответствии с любым из вариантов, где **COMP** означает остаток не встречающейся в природе аминокислоты в одном или более положениях фрагмента IL-2, выбранного из группы, состоящей из amino-конца, P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8 и T9, где положения аминокислот соответствуют схеме нумерации A. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения **COMP** указывает на остаток не встречающейся в природе аминокислоты в положении S4.

В конкретных вариантах осуществления вышеуказанных конъюгатов, остаток не встречающейся в природе аминокислоты во фрагменте IL-2, с азидной функциональной группой, представлен следующей формулой:

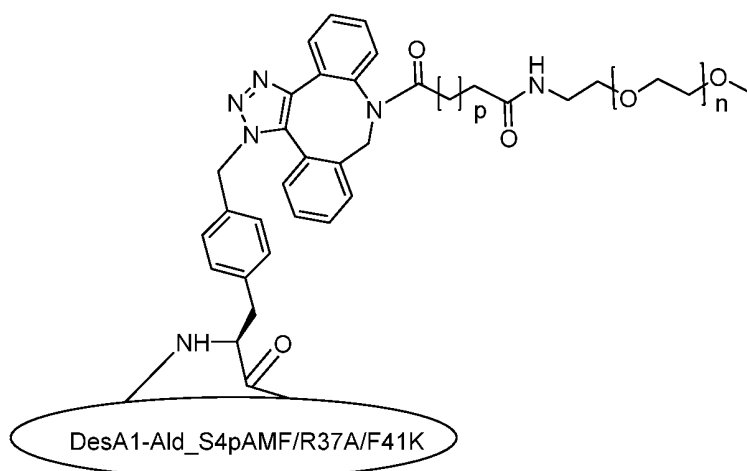


где волнистая линия указывает на связь с соседними аминокислотами аналога IL-2.

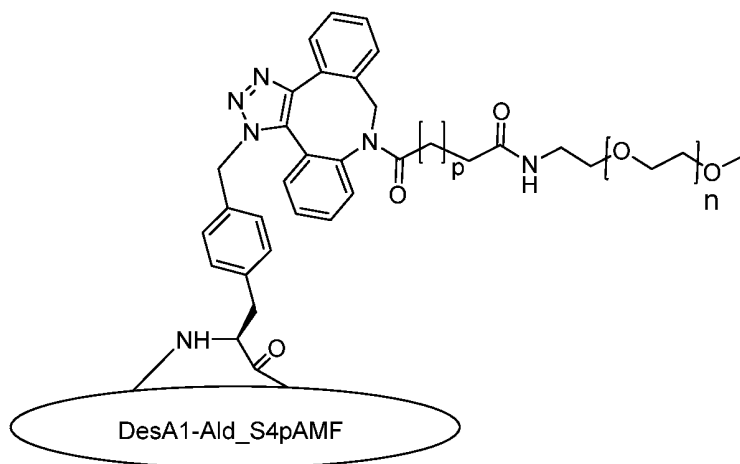
Примеры соединений включают конъюгаты, имеющие следующую формулу:



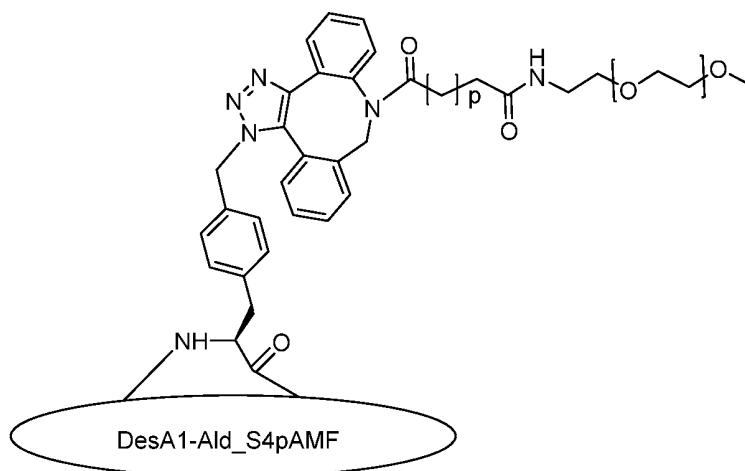
где  $p$  представляет собой целое число от 1 до 10,  $n$  представляет собой целое число от 1 до 5000, или его региоизомер, имеющий формулу:



где  $p$  представляет собой целое число от 1 до 10,  $n$  представляет собой целое число от 1 до 5000, и

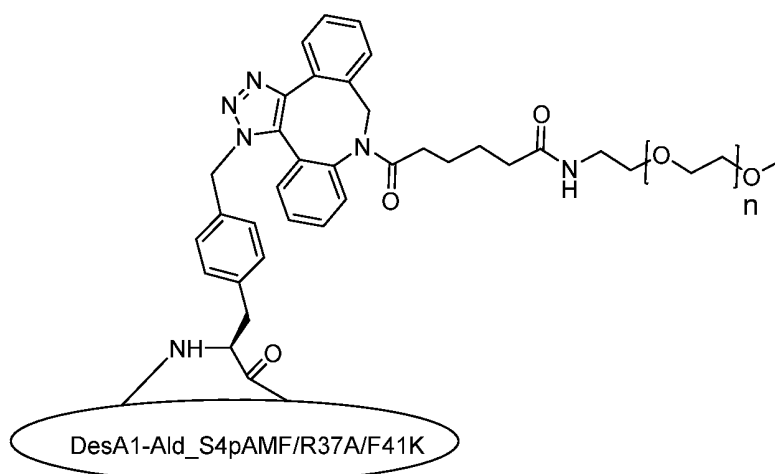


где  $p$  представляет собой целое число от 1 до 10,  $n$  представляет собой целое число от 1 до 5000, или его региоизомер, имеющий формулу:



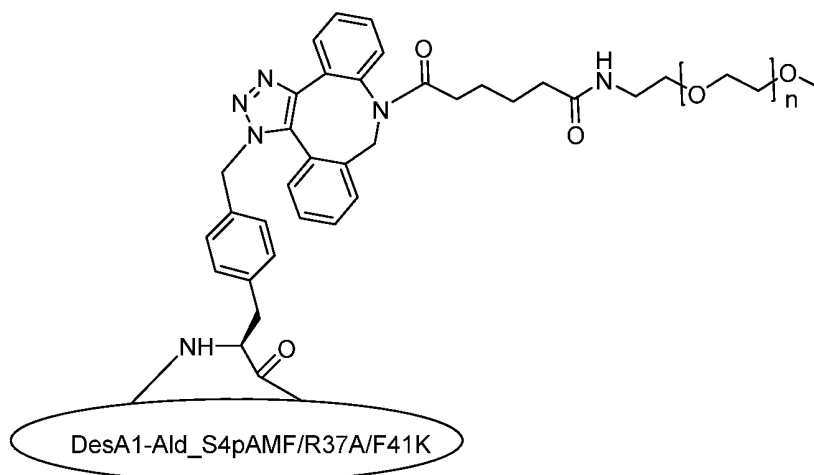
где  $p$  представляет собой целое число от 1 до 10,  $n$  представляет собой целое число от 1 до 5000.

Примеры соединений включают конъюгаты, имеющие следующую формулу:

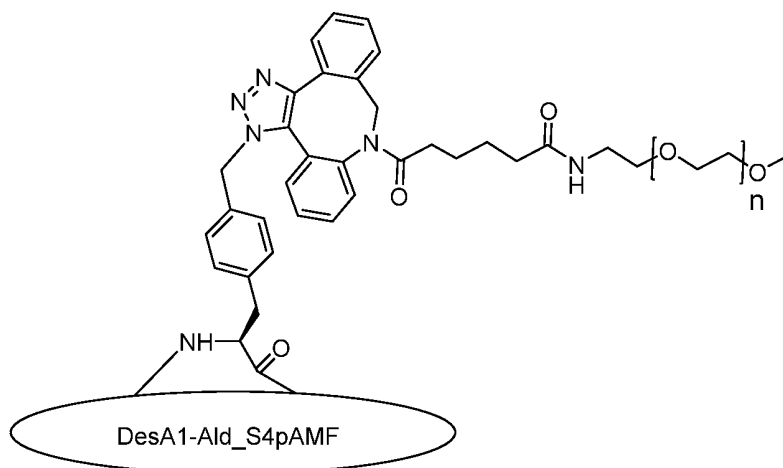


где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 5000,

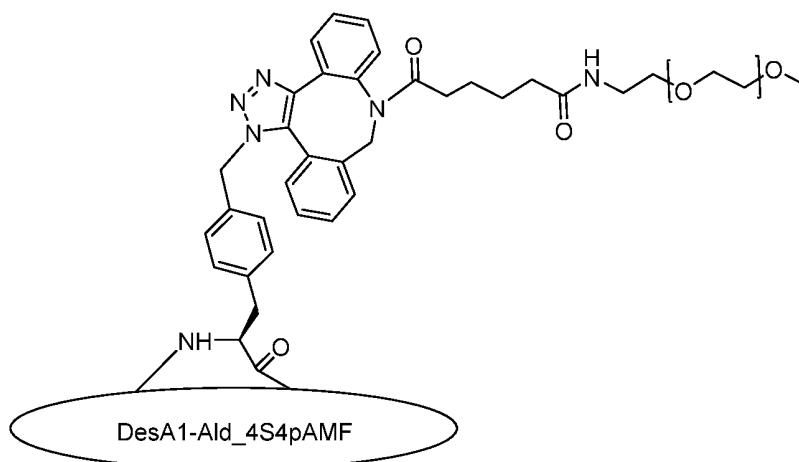
или его региоизомер, имеющий формулу:



где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 5000, и

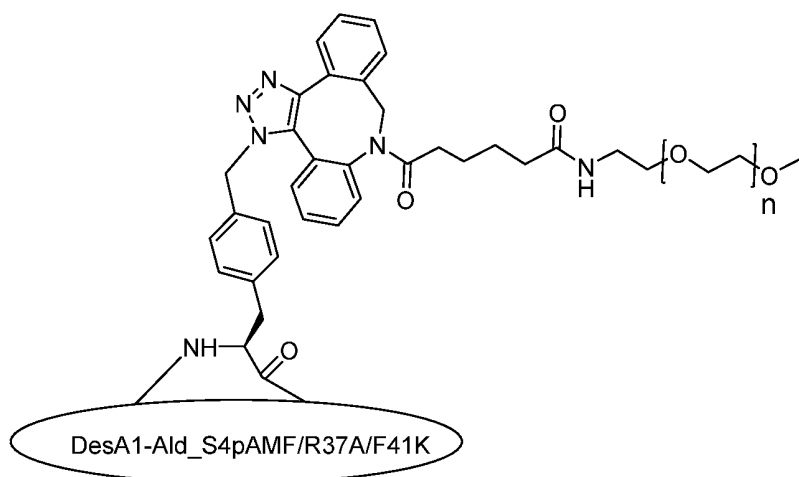


где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 5000,  
или его региоизомер, имеющий формулу:

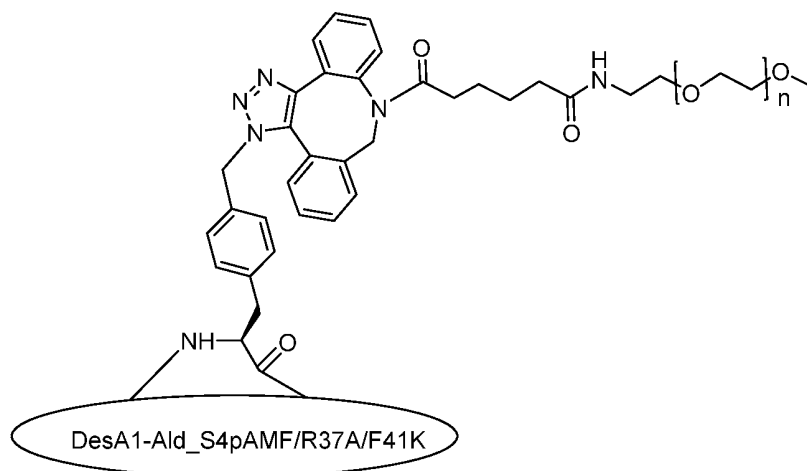


где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 5000.

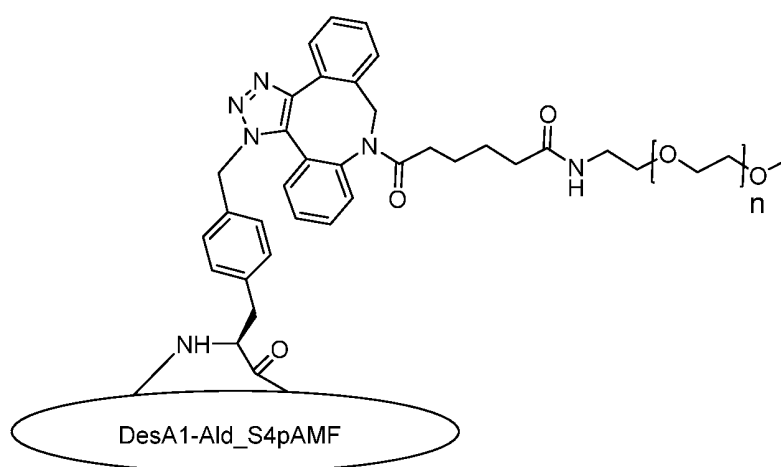
Примеры конъюгатов дополнительно включают конъюгаты, имеющие следующую формулу:  
CON1:



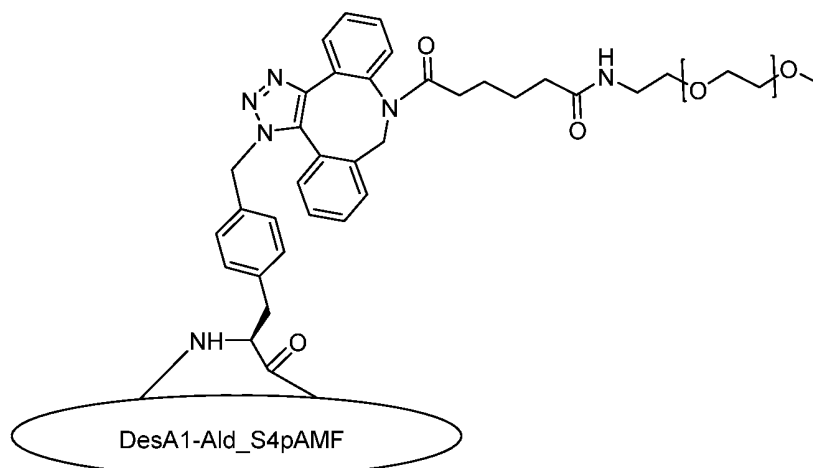
где  $n$  равняется около 681,  
или его региоизомер, имеющий формулу:



где  $n$  равняется около 681, и  
CON2:



где  $n$  равняется около 681,  
или его региоизомер, имеющий формулу:



где  $n$  равняется около 681.

#### Получение конъюгатов П-2

Конъюгаты IL-2 могут быть получены стандартными способами. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент IL-2 приводят в контакт с предшественником непептидного водорастворимого полимера в условиях, подходящих для образования связи между фрагментом IL-2 и предшественником непептидного водорастворимого полимера, с образованием конъюгата фрагмент IL-2-водорастворимый полимер. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент IL-2 приводят в контакт с предшественником линкера в условиях, подходящих для образования связи между фрагментом IL-2 и линкером. Полученный фрагмент IL-2-линкер приводят в контакт с предшественником непептидного водорастворимого полимера в условиях, подходящих для образования связи между фрагментом IL-2-линкер и предшественником непептидного водорастворимого полимера, с образованием конъюгата фрагмент IL-2-линкер-непептидный водорастворимый полимер. В некоторых вариантах осуществления предшественник непептидного водорастворимого полимера приводят в контакт с предшественником линкера в условиях, подходящих для образования связи между непептидным водорастворимым полимером и линкером. Полученный водорастворимый полимер-линкер приводят в контакт с фрагментом IL-2 в условиях, подходящих для образования связи между непептидным водорастворимым полимером-линкером с фрагментом IL-2, с образованием конъюгата фрагмент IL-2-линкер-непептидный водорастворимый полимер. Подходящие линкеры для получения конъюгатов IL-2 раскрыты в настоящем документе, а иллюстративные условия конъюгации описаны в примерах, приведенных ниже.

Варианты осуществления настоящего изобретения также относятся к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим фрагменты IL-2, векторам и клеткам-хозяевам, содержащим такие нуклеиновые кислоты, и к рекомбинантным способам получения фрагментов IL-2.

Для рекомбинантного получения фрагмента IL-2 нуклеиновую кислоту(ы), кодирующую(ие) его, можно выделить и вставить в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (т.е. амплификации ДНК) или экспрессии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота может быть получена путем гомологичной рекомбинации, например, как описано в патенте США № 5204244, содержание которого во всей своей полноте включено сюда посредством ссылки.

В данной области техники также известно множество различных векторов. Компоненты вектора обычно включают, но не ограничиваясь ими, одно или более из следующего: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции, например, как описано в патенте США № 5534615, содержание которого во всей своей полноте включено сюда посредством ссылки.

Экспрессию фрагмента IL-2, который содержит одну или более не встречающихся в природе аминокислот, можно осуществить в ортогональной биосинтетической системе трансляции, которая способна к сайт-специфической замене любой выбранной аминокислоты в последовательности IL-2 на не встречающуюся в природе аминокислоту. Такой ортогональный биосинтетический механизм трансляции включает ортогональные тРНК и ортогональные RS, а также пары ортогональные тРНК/ортогональные RS, которые при введении в клетку-хозяина или в бесклеточную систему трансляции можно использовать для включения не встречающейся в природе аминокислоты в полипептид (белок), представляет интерес. Ортогональная тРНК доставляет не встречающуюся в природе аминокислоту в ответ на селекторный кодон, а ортогональная синтетаза преимущественно аминоацилирует ортогональную тРНК с не встречающейся в природе аминокислотой. O-RS не может эффективно аминоацилировать ортогональную тРНК ни с одной из двадцати обычных аминокислот. Способы конструирования ортогональной биосинтетической системы трансляции для клеточной или бесклеточной экспрессии, а также использование таких систем для включения



в полипептид не встречающихся в природе аминокислот в заранее определенные участки известны в данной области, и они раскрыты, например, в патентах США №№ 9797908; 7736872; 9163271; 9797908; 97979908; 8445446; 7736872; 7846689; и в публикации патентной заявки на выдачу патента US 20170292139; содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Как только фрагмент PL-2, включающий не встречающуюся в природе аминокислоту(ы), продуцирован в клетке-хозяине или в бесклеточной ортогональной системе трансляции, он может быть экстрагирован из них различными способами, известными в данной области, включая ферментативные, химические способы и/или осмотический лизис и физическое разрушение. Полипептид цитокина (например, PL-2) может быть очищен стандартными методами, известными в данной области, такими как препаративная хроматография, аффинная очистка или любым другим подходящими методами.

Подходящие клетки-хозяева могут включать бактериальные клетки, например клетки *E. coli*, и клетки эукариот, например, клетки насекомых (например, клетки дрозофилы, такой как *Drosophila melanogaster*), дрожжевые клетки, клетки нематод (например, *C. elegans*), клетки мышей (например, *Mus musculus*) или клетки млекопитающих (такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки COS, клетки 293T человека, клетки HeLa, клетки NIH 3T3 и клетки эритролейкемии мыши (MEL)) или клетки человека, или другие эукариотические клетки. Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам в данной области.

При создании клеточных линий обычно предпочтительно получать стабильные клеточные линии. Известно, например, что для стабильной трансфекции клеток млекопитающих, в зависимости от вектора экспрессии и используемого метода трансфекции, только небольшая часть клеток может интегрировать чужеродную ДНК в свой геном. Чтобы идентифицировать и отобрать эти интегранты, ген, кодирующий маркер селекции (например, устойчивости к антибиотикам), обычно вводят в клетки-хозяева вместе с представляющим интерес геном. Предпочтительные маркеры селекции включают те, которые придают устойчивость к лекарствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие маркер селекции, могут быть введены в клетку-хозяина в одном и том же векторе, или же они могут быть введены в отдельном векторе. Клетки, стабильно трансфицированные введенной молекулой нуклеиновой кислоты, могут быть идентифицированы с помощью лекарственной селекции (например, клетки, которые включают ген маркера селекции, выживают, тогда как другие клетки погибают).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения описанные здесь конъюгаты интегрированы в геном клетки-хозяина. Преимущество стабильной интеграции заключается в том, что при этом достигается единообразие между отдельными клетками или клонами. Еще одним преимуществом является то, что можно проводить отбор лучших производителей. Соответственно, желательно создавать стабильные клеточные линии. В другом варианте осуществления настоящего изобретения описанные здесь конъюгаты трансфицируют в клетку-хозяина. Преимущество трансфекции конъюгатов в клетку-хозяина состоит в том, что выход белка может быть максимальным. В одном аспекте осуществления настоящего изобретения представлена клетка, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты или вектор, описанный в настоящем документе.

#### **Фармацевтические композиции и способы введения**

Представленные здесь конъюгаты PL-2 могут быть включены в состав фармацевтических композиций с использованием способов, известных в данной области техники, и способов, раскрытых в настоящем

документе. Любой из представленных здесь конъюгатов IL-2 может быть представлен в виде соответствующей фармацевтической композиции и может вводиться подходящим способом введения.

Предложенные здесь способы предусматривают введение фармацевтических композиций, содержащих по меньшей мере один конъюгат IL-2, описанный в настоящем документе, и один или более совместимых и фармацевтически приемлемых носителей. В этом контексте термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или указанный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у людей. Термин «носитель» включает разбавитель, адъювант (например, адъювант Фрейнда (полный и неполный)), эксципиент или носитель, с которым вводят терапевтический агент. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода может использоваться в качестве носителя при внутривенном введении фармацевтической композиции. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, особенно для растворов для инъекций. Примеры таких подходящих фармацевтических средств описаны в Martin, E. W., Remington's Pharmaceutical Sciences.

В клинической практике представленные здесь фармацевтические композиции или конъюгаты IL-2 можно вводить любым способом, известным в данной области. Типичные пути введения включают, но не ограничиваются ими, ингаляционный, внутриартериальный, внутривенный, внутримышечный, внутривенный, внутривенный, назальный, парентеральный, легочный и подкожный пути. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию или конъюгат IL-2, описанные в настоящем документе, вводят парентерально.

Композиции для парентерального введения могут представлять собой эмульсии или стерильные растворы. Парентеральные композиции могут содержать, например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла и органические сложные эфиры, пригодные для инъекций (например, этилолеат). Эти композиции могут также содержать смачивающие, изотонирующие, эмульгирующие, диспергирующие и стабилизирующие агенты. Стерилизацию можно проводить несколькими способами, например, с помощью бактериологического фильтра, облучением или нагреванием. Парентеральные композиции также могут быть приготовлены в виде стерильных твердых композиций, которые можно растворять во время использования в стерильной воде или в любой другой стерильной среде для инъекций.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, описанная в настоящем документе, представляет собой фармацевтическую композицию или единичную дозированную лекарственную форму. Фармацевтические композиции и единичные дозированные лекарственные формы, описанные в настоящем документе, содержат профилактически или терапевтически эффективное количество одного или более профилактических или терапевтических конъюгатов IL-2.

Фармацевтическая композиция может содержать один или более фармацевтических эксципиентов. Можно использовать любой подходящий фармацевтический эксципиент, и специалист в данной области способен выбрать подходящие фармацевтические эксципиенты. Неограничивающие примеры подходящих наполнителей включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобное. Подходит ли конкретный эксципиент для включения в фармацевтическую композицию или лекарственную форму, зависит от множества факторов, хорошо

известных в данной области, включая, помимо прочего, способ введения лекарственной формы субъекту и конкретный фрагмент IL-2 в дозированной лекарственной форме. Композиция или единичная дозированная лекарственная форма, при желании, может также содержать небольшие количества смачивающих или эмульгирующих агентов или буферных агентов. Соответственно, представленные ниже фармацевтические эксципиенты предназначены для иллюстрации, а не для ограничения. Дополнительные фармацевтические эксципиенты включают, например, те, которые описаны в справочнике Handbook of Pharmaceutical Excipients, Rowe et al. (Eds.) 6th Ed. (2009), содержание которого полностью включено сюда посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит пеногаситель. Можно использовать любой подходящий пеногаситель. В некоторых аспектах пеногаситель выбирают из спирта, эфира, масла, воска, силикона, поверхностно-активного вещества и их комбинаций. В некоторых аспектах пеногаситель выбирают из минерального масла, растительного масла, этилен-бис-стеарамид, парафинового воска, сложноэфирного воска, жирноспиртового воска, жирного спирта с длинной цепью, жирнокислотного мыла, сложного эфира жирной кислоты, силикон-гликоля, фторсиликона, сополимера полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, полидиметилсилоксан-диоксида кремния, эфира, октилового спирта, каприлового спирта, сорбитантриолеата, этилового спирта, 2-этилгексанола, диметикона, олеилового спирта, симетикона и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит соразтворитель. Иллюстративные примеры соразтворителей включают этанол, полиэтиленгликоль, бутиленгликоль, диметилацетамид, глицерин и пропиленгликоль.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит буфер. Иллюстративные примеры буферов включают ацетат, борат, карбонат, лактат, малат, фосфат, цитрат, гидроксид, диэтаноламин, моноэтаноламин, глицин, метионин, гуаровую камедь и моносодиевый глутамат.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит носитель или наполнитель. Иллюстративные примеры носителей или наполнителей включают лактозу, мальтодекстрин, маннит, сорбит, хитозан, стеариновую кислоту, ксантановую камедь и гуаровую камедь.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество. Иллюстративные примеры поверхностно-активных веществ включают d-альфа-токоферол, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, цетримид, хлорид цетилпиридиния, докзат натрия, глицерилбегенат, глицерилмоноолеат, лауриновую кислоту, макрогол-15-гидроксистеарат, миристиловый спирт, фосфолипиды, алкиловые эфиры полиоксиэтилена, сложные эфиры жирных кислот и полиоксиэтиленсорбитана, полиоксиэтиленстеараты, полиоксиглицериды, лаурилсульфат натрия, сложные эфиры сорбитана и полиэтиленгликольсукцинат витамина E.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит противослеживающий агент. Иллюстративные примеры противослеживающих агентов включают фосфат кальция (трехосновный), гидроксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу и окись магния.

Другие эксципиенты, которые можно использовать с фармацевтическими композициями, включают, например, альбумин, антиоксиданты, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты, биорассасывающиеся полимеры, хелатирующие агенты, агенты для контролируемого высвобождения, разбавители, диспергирующие агенты, усилители растворения, эмульгаторы, желеобразующие агенты, мазевые основы, усилители проникновения, консерванты, солюбилизующие агенты, растворители, стабилизаторы

и сахара. Конкретные примеры каждого из этих агентов описаны, например, в справочнике Handbook of Pharmaceutical Excipients, Rowe et al. (Eds.) 6th Ed. (2009), The Pharmaceutical Press, содержание которого полностью включено сюда посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит растворитель. В некоторых аспектах растворитель представляет собой солевой раствор, такой как стерильный изотонический солевой раствор или раствор декстрозы. В некоторых аспектах растворителем является вода для инъекций.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции находятся в форме частиц, таких как микрочастицы или наночастицы. Микрочастицы и наночастицы могут быть образованы из любого подходящего материала, такого как полимер или липид. В некоторых аспектах микрочастицы или наночастицы представляют собой мицеллы, липосомы или полимерсомы.

Кроме того, в настоящем документе представлены безводные фармацевтические композиции и дозированные лекарственные формы, содержащие конъюгат IL-2, поскольку в некоторых вариантах осуществления вода может способствовать расщеплению некоторых белков.

Предложенные здесь безводные фармацевтические композиции и дозированные лекарственные формы могут быть приготовлены с использованием безводных ингредиентов или ингредиентов с низким содержанием влаги, и в условиях с низким содержанием влаги или низкой влажностью. Фармацевтические композиции и дозированные лекарственные формы, содержащие лактозу и по меньшей мере один активный ингредиент, содержащий первичный или вторичный амин, могут быть безводными, если ожидается существенный контакт с влагой и/или влажностью во время производства, упаковки и/или хранения.

Безводную фармацевтическую композицию можно приготовить и хранить таким образом, чтобы сохранялась ее безводная природа. Соответственно, безводные композиции могут быть упакованы с использованием материалов, которые, как известно, предотвращают воздействие воды, и они могут быть включены в подходящие наборы. Примеры подходящей упаковки включают, но не ограничиваются ими, герметичную упаковку из фольги или пластика, контейнеры для единичных доз (например, флаконы), блистерные упаковки и безъячейковую упаковку с контурной герметизацией.

Представленные в настоящем документе безлактозные композиции могут содержать эксципиенты, которые хорошо известны в данной области, и которые перечислены, например, в Фармакопее США (USP) SP (XXI)/NF (XVI). Как правило, безлактозные композиции содержат активный ингредиент, связующее/наполнитель и смазывающее вещество в фармацевтически совместимых и фармацевтически приемлемых количествах. Типовые безлактозные лекарственные формы содержат активный ингредиент, микрокристаллическую целлюлозу, прежелатинизированный крахмал и стеарат магния.

Также в настоящем документе представлены фармацевтические композиции и лекарственные формы, которые содержат один или более эксципиентов, снижающих скорость разложения фрагмента IL-2 или конъюгата IL-2. Такие эксципиенты, которые упоминаются здесь как «стабилизаторы», включают, но не ограничиваются ими, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, pH-буферы или солевые буферы.

### **Парентеральные дозированные лекарственные формы**

В некоторых вариантах изобретение относится к дозированным лекарственным формам для парентерального введения. Парентеральные дозированные лекарственные формы можно вводить субъектам различными путями, включая, но не ограничиваясь ими, подкожный, внутривенный (включая болюсную инъекцию), внутримышечный и внутриартериальный. Поскольку такое введение обычно обходит

естественную защиту субъекта от контаминантов, парентеральные дозированные лекарственные формы обычно должны быть стерильными, или они должны быть стерилизованы перед введением субъекту. Примеры парентеральных дозированных лекарственных форм включают, но не ограничиваются ими, готовые растворы для инъекций, сухие продукты, готовые для растворения или суспендирования в фармацевтически приемлемом носителе для инъекций, готовые для инъекций суспензии и эмульсии.

Подходящие носители, которые можно использовать для получения парентеральных дозированных лекарственных форм, хорошо известны специалистам в данной области. Примеры включают без ограничения следующие носители: вода для инъекций USP; водные носители, такие как, но не ограничиваясь ими, хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор декстрозы для инъекций, раствор декстрозы и хлорида натрия для инъекций и раствор Рингера для инъекций с лактатом; смешивающиеся с водой носители, такие как, но не ограничиваясь ими, этиловый спирт, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль; и неводные носители, такие как, но не ограничиваясь ими, кукурузное масло, хлопковое масло, арахисовое масло, кунжутное масло, этилолеат, изопропилмиририлат и бензилбензоат.

В дозированные лекарственные формы для парентерального введения также могут быть включены эксципиенты, повышающие растворимость одного или более описанных здесь белков.

#### **Дозировка и единичные дозированные формы**

В терапии человека врач определяет дозу, которую он считает наиболее подходящей, в соответствии с профилактическим или терапевтическим лечением, а также в соответствии с возрастом, массой тела, состоянием и другими факторами, характерными для субъекта, подлежащего лечению.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, описанная здесь, представляет собой фармацевтическую композицию или единичную дозированную лекарственную форму. Фармацевтические композиции и единичные дозированные лекарственные формы, описанные здесь, содержат профилактически или терапевтически эффективное количество одного или более профилактических или терапевтических белков.

Количество конъюгата IL-2 или композиции, которое будет эффективным для профилактики или лечения расстройства или одного или более его симптомов, будет варьироваться в зависимости от природы и тяжести болезни или состояния, а также от путей введения фрагмента IL-2. Частота и дозировка также будут варьироваться в зависимости от факторов, специфичных для каждого субъекта, в зависимости от конкретной терапии (например, терапевтического или профилактического лечения), тяжести нарушения, заболевания или состояния, способа введения, а также возраста, телосложения, массы тела, реакции на лечение и истории болезни субъекта. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных *in vitro* или в тестах на животных моделях.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения типовые дозы композиции включают количества в миллиграммах или микрограммах фрагмента IL-2 на килограмм массы тела субъекта или массы образца (например, от около 10 микрограммов на килограмм до около 50 миллиграммов на килограмм, от около 100 микрограммов на килограмм до около 25 миллиграммов на килограмм или от около 100 микрограммов на килограмм до около 10 миллиграммов на килограмм). В одном конкретном варианте осуществления настоящего изобретения доза конъюгата IL-2, описанного здесь, из расчета на массу фрагмента IL-2, вводимого для предотвращения, лечения, контроля или облегчения расстройства или одного или более его симптомов у субъекта равна 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 10 мг/кг или 15 мг/кг или более, из расчета на массу тела.

Дозу можно вводить по подходящей схеме, например, один раз, два раза, три раза или четыре раза в неделю. В некоторых случаях может быть необходимо использовать дозы конъюгата IL-2, выходящие за пределы указанных здесь диапазонов, что очевидно специалистам в данной области техники. Кроме того, следует отметить, что клиницист или лечащий врач знают, как и когда прерывать, корректировать или прекращать терапию в зависимости от реакции субъекта.

Как известно специалистам в данной области техники, для различных заболеваний и состояний могут быть применимы различные терапевтически эффективные количества. Точно так же количества, достаточные для предотвращения, контроля, лечения или облегчения таких нарушений, но недостаточные для того, чтобы вызвать побочные эффекты или достаточные для уменьшения побочных эффектов, связанных с белками, описанными здесь, также охватываются указанными здесь дозами, количествами и схемами введения. Кроме того, когда субъекту вводят несколько доз композиции, описанной здесь, то не обязательно, чтобы все дозы были одинаковыми. Например, доза, вводимая субъекту, может быть увеличена для улучшения профилактического или терапевтического эффекта от композиции, или же она может быть уменьшена для уменьшения одного или более побочных эффектов, которые проявляются у конкретного субъекта.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лечение или профилактику можно начинать с одной или более нагрузочных доз конъюгата IL-2 или композиции, описанных здесь, за которыми следует одна или более поддерживающих доз.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доза конъюгата IL-2 или композиции, описанных здесь, может быть введена для достижения равновесной концентрации фрагмента IL-2 в крови или сыворотке субъекта. Равновесную концентрацию можно определить путем измерения в соответствии с методиками, известными в данной области техники, и она может быть определена с учетом физических характеристик субъекта, таких как рост, масса тела и возраст.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения введение одной и той же композиции может быть повторено, и введения могут быть разделены по времени по меньшей мере на 1 день, на 2 дня, на 3 дня, на 5 дней, на 10 дней, на 15 дней, на 30 дней, на 45 дней, на 2 месяца, на 75 дней, на 3 месяца или на 6 месяцев. В других вариантах осуществления изобретения введение одного и того же профилактического или терапевтического средства может быть повторено, и введение может быть разделено по времени по меньшей мере на 1 день, на 2 дня, на 3 дня, на 5 дней, на 10 дней, на 15 дней, на 30 дней, на 45 дней, на 2 месяца, на 75 дней, на 3 месяца или на 6 месяцев.

### **Терапевтические применения**

Для терапевтического применения конъюгаты IL-2, описанные здесь, можно вводить млекопитающему, обычно человеку, в фармацевтически приемлемой дозированной лекарственной форме, такой как формы, известные в данной области, и формы, описанные выше. Например, конъюгаты IL-2 можно вводить человеку внутривенно в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, а также путем внутримышечного, внутривентриального, внутриспинального, подкожного, внутрисуставного, интраспинального, подоболочечного или внутрипухолового введения. Конъюгаты IL-2 также подходящим образом можно вводить перитуморально, внутрь очага поражения или вокруг очага поражения для оказания местного, а также системного терапевтического действия. Внутривентриальный путь может быть особенно полезен, например, при лечении опухоли яичников.

Предложенные здесь конъюгаты IL-2 могут быть полезны для лечения любого заболевания или состояния, в которое вовлечен рецептор IL2. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание

или состояние представляет собой заболевание или состояние, при котором стимуляция или усиление иммунного ответа может принести пользу. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или состояние представляет собой заболевание или состояние, при котором может помочь лечение фрагментом IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или состояние представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или состояние представляет собой инфекционное заболевание (например, ВИЧ-инфекцию или инфекцию гепатита (HCV)).

Любой подходящий рак можно лечить с помощью конъюгатов IL-2, описанных здесь. Иллюстративные подходящие виды рака включают, например, острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), аденокарциному, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитому, базально-клеточную карциному, опухоль головного мозга, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы (включая трижды негативный рак молочной железы или TNBC), опухоль бронхов, карциному неизвестного первичного происхождения, опухоль сердца, рак шейки матки, хордому, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиому, протоковую карциному, эмбриональную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, эстезионейробластома, рак фаллопиевой трубы, фиброзную гистиоцитому, саркому Юинга, рак глаза, герминогенную опухоль, рак желчного пузыря, рак желудка, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта, гестационную трофобластическую болезнь, глиому, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, гистиоцитоз, лимфому Ходжкина, рак гортаноглотки, внутриглазную меланому, опухоль островковых клеток, саркому Капоши, рак почки, гистиоцитоз из клеток Лангерганса, рак гортани, рак губы и полости рта, рак печени, лобулярную карциному *in situ*, рак легкого, макроглобулинемию, злокачественную фиброзную гистиоцитому, меланому, карциному из клеток Меркеля, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытой первичной опухолью, карциному срединного тракта с вовлечением гена *NUT*, рак ротовой полости, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому, грибковидный микоз, миелодиспластический синдром, миелодиспластическое/миелопролиферативное новообразование, рак полости носа и околоносовых пазух, рак носоглотки, нейробластома, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак ротоглотки, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, папилломатоз, параганглиому, рак парашитовидной железы, рак полового члена, рак глотки, феохромоцитому, опухоль гипофиза, плевропульмональную бластома, первичную лимфому центральной нервной системы, первичную перитонеальную карциному, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, рак почечной лоханки и мочеточника, ретинобластома, рабдоидную опухоль, рак слюнной железы, синдром Сезари, рак кожи, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, опухоль спинного мозга, рак желудка, Т-клеточную лимфому, тератоидную опухоль, рак яичка, рак горла, тимому и карциному тимуса, рак щитовидной железы, рак уретры, рак матки, рак влагалища, рак вульвы и опухоль Вильмса.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения заболевание, подлежащее лечению конъюгатами IL-2, описанными здесь, представляет собой рак желудка, колоректальный рак, почечно-клеточную карциному, рак шейки матки, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак матки, карциному фаллопиевых труб, первичную карциному брюшины, карциному тела матки, рак эндометрия, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак головы и шеи, карциному головного мозга, рак печени, рак поджелудочной железы, мезотелиому и/или рак эпителиального происхождения. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения заболевание представляет собой колоректальный рак. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой рак яичников. В некоторых вариантах

осуществления заболевания представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой трижды негативный рак молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой почечно-клеточную карциному. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой карциному головного мозга. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой рак эндометрия.

### **Комбинированные продукты**

Кроме того, настоящее изобретение также относится к комбинированным продуктам, содержащим конъюгат IL-2 или композицию, как раскрыто здесь. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения конъюгат IL-2 содержится в медицинском устройстве доставки. Медицинское устройство доставки имеет определение, приведенное в Разделе 201(h), и включает, помимо прочего, шприцы, автоинъекторы, медицинские ручки-инъекторы, насосы и т.п. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения комбинированный продукт содержит терапевтическое средство и конъюгат IL-2, которые физически, химически или иным образом объединены или смешаны и производятся как единое целое.

Комбинированный продукт также включает варианты, в которых конъюгат IL-2 упакован отдельно и предназначен для использования только с утвержденным индивидуально указанным терапевтическим средством или устройством, где оба необходимы для достижения предполагаемого применения, показания или эффекта, и где после одобрения конъюгата IL-2, маркировка одобренного продукта должна быть изменена, например, чтобы отразить изменение предполагаемого применения, лекарственной формы, эффекта действия, пути введения или существенное изменение дозы.

Комбинированный продукт также включает варианты, в которых конъюгат IL-2 упакован отдельно, и который, согласно маркировке, предназначен для использования только с другим индивидуально указанным терапевтическим средством или устройством, когда оба необходимы для достижения предполагаемого применения, показания или эффекта.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтический агент представляет собой ингибитор контрольной точки, такой как блокатор PD-1, который представляет собой антитело к PD-1 или антитело к PD-L1. Типичные антитела против PD-1, которые можно использовать в комбинированной терапии по настоящему изобретению, включают любое антитело, которое связывает PD-1 и ингибирует связывание PD-1 с PD-L1. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения иллюстративное антитело к PD-1 выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба и цемипламаба-gwlc. Примеры антител включают следующие перечисленные ниже антитела против PD-1 и композиции, содержащие антитело против PD1 и фармацевтически приемлемый носитель или соль.

Пембролизумаб, также известный как KEYTRUDA, ламбролизумаб, MK-3475 или SCH-900475, представляет собой гуманизированное антитело против PD-1, описанное в патенте США No. 8354509 и WO 2009/114335, и которое также описано, например, в публикации Hamid, et al., New England J. Med. 369 (2): 134-144 (2013). Ниволумаб, также известный как OPDIVO, MDX-1106-04, ONO-4538 или BMS-936558, представляет собой полностью человеческое антитело IgG4 к PD-1, описанное в публикации WO 2006/121168



и в патенте США № 8008449. Цемплимаб-gwlc, также известный как цемплимаб, LIBTAYO или REGN2810, представляет собой рекомбинантное моноклональное антитело IgG4 человека, описанное в публикации WO 2015112800 и в патенте США No. № 9987500.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. Примеры химиотерапевтических агентов включают, но не ограничиваются ими:

(i) алкилирующие агенты, включая, но не ограничиваясь ими, бифункциональные алкилаторы, циклофосамид, мехлорэтамин, хлорамбуцил и мелфалан;

(ii) монофункциональные алкилаторы, включая, но не ограничиваясь ими, дакарбазин, нитрозомочевину и темозоломид (пероральный дакарбазин);

(iii) антрациклины, включая, но не ограничиваясь ими, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, митоксантрон и валрубицин;

(iv) разрушители цитоскелета (таксаны), включая, но не ограничиваясь ими, паклитаксел, доцетаксел, абраксан и таксотер;

(v) эпотилоны, включая, но не ограничиваясь ими, иксабепилон и утиделон;

(vi) ингибиторы гистондеацетилазы, включая, но не ограничиваясь ими, вориностат и ромидеписин;

(vii) ингибиторы топоизомеразы I, включая, но не ограничиваясь ими, иринотекан и топотекан;

(viii) ингибиторы топоизомеразы II, включая, но не ограничиваясь ими, этопозид, тенипозид и тафлупозид;

(ix) ингибиторы киназы, включая, но не ограничиваясь ими, бортезомиб, эрлотиниб, гефитиниб, иматиниб, вемурафениб и висмодегиб;

(x) аналоги нуклеотидов и аналоги-предшественники, включая, но не ограничиваясь ими, азациитидин, азатиоприн, фторпиримидины (например, такие как капецитабин, кармофур, доксифлуридин, фторурацил и тегафур), цитарабин, гемцитабин, гидроксимочевину, меркаптопурин, метотрексат и тиогуанин;

(xi) пептидные антибиотики, включая, но не ограничиваясь ими, блеомицин и актиномицин; агенты на основе платины, включая, но не ограничиваясь ими, карбоплатин, цисплатин и оксалиплатин;

(xii) ретиноиды, включая, но не ограничиваясь ими, третиноин, алитретиноин и бексаротен; и (xiii) алкалоиды и производные барвинка, включая, но не ограничиваясь ими, винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин.

### **Комбинированная терапия**

Настоящее изобретение также относится к комбинированной терапии для лечения индивидуума (человека или животного), предусматривающей введение индивидууму конъюгата IL-2 по настоящему изобретению и второго терапевтического агента последовательно или одновременно. В одном варианте осуществления настоящего изобретения конъюгат IL-2 вводят индивидууму до того, как индивидууму вводят терапевтический агент. В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое средство вводят индивидууму до того, как индивидууму вводят конъюгат IL-2. Конъюгат IL-2 и терапевтический агент можно вводить в отдельных дозах и в разных форматах.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтический агент представляет собой ингибитор контрольной точки, такой как блокатор PD-1. Блокатор PD-1 можно вводить в той же дозе, с частотой дозирования и с продолжительностью лечения, что и блокатор PD-1, применяемый в монотерапии по конкретным показаниям. Дозу конъюгата IL-2 можно вводить с той же частотой дозирования

и с продолжительностью лечения, которые одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (US FDA), или с частотой дозирования и с продолжительностью лечения, как и для конкретного блокатора PD-1, используемого в паре с конъюгатом PL-2.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения блокатор PD-1 представляет собой антитело к PD-1 или антитело к PD-L1. Типичные антитела против PD-1, которые можно использовать в комбинированной терапии по настоящему изобретению, включают любое антитело, которое связывает PD-1 и ингибирует связывание PD-1 с PD-L1. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения иллюстративное антитело к PD-1 выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба и цемиплимаба-gwlc. Примеры антител включают антитело против PD-1 и композиции, содержащие антитело против PD1 и фармацевтически приемлемую соль.

Конкретные дозы коммерчески доступных антител к PD-1 различаются между собой в зависимости от конкретного антитела, и, таким образом, в конкретных вариантах комбинированной терапии по настоящему изобретению доза, частота дозирования и/или продолжительность лечения могут быть, по меньшей мере, такими, которые одобрены FDA для конкретного антитела против PD-1 для конкретных показаний. Например, пембролизумаб одобрен в дозе 200 мг каждые три недели по мере необходимости (для детей (от двух лет до 18 лет) в дозе 2 мг/кг до 200 мг каждые три недели по мере необходимости); ниволумаб одобрен в дозе 3 мг/кг каждые 2 недели; цемиплимаб-gwlc одобрен в дозе 350 мг каждые три недели по мере необходимости; атезолизумаб одобрен в дозе 1200 мг каждые три недели по мере необходимости; авелумаб одобрен в дозе 10 мг/кг или 800 мг каждые две недели по мере необходимости; и дурвалумаб одобрен в дозе 10 мг/кг каждые две недели по мере необходимости.

В конкретных вариантах комбинированной терапии блокатор PD-1, представляет собой антитело к PD-1 или фрагмент антитела к PD-1, которые можно вводить в дозе от около 150 мг до около 250 мг, от около 175 до около 250 мг, от приблизительно 200 до около 250 мг, от около 150 мг до около 240 мг, от около 175 мг до около 240 мг или от около 200 мг до около 240 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения доза антитела против PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента составляет 150 мг, 175 мг, 200 мг, 225 мг, 240 мг или 250 мг. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело к PD-1 или фрагмент антитела к PD-1 можно вводить с частотой каждые три недели по мере необходимости. В другом варианте комбинированной терапии по настоящему изобретению антитело к PD-1 или фрагмент антитела к PD-1 можно вводить в дозе, превышающей 250 мг, например, в дозе около 400 мг, с частотой каждые шесть недель по мере необходимости.

В конкретных вариантах комбинированной терапии блокатор PD-1, представляет собой антитело к PD-1 или фрагмент антитела к PD-1, которые можно вводить в дозе от около 10 мг/кг до около 1200 мг. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения фрагмент блокатора PD-1, можно вводить с частотой каждые две-три недели по мере необходимости.

В то время как блокатор PD-1 можно вводить по меньшей мере в дозах, с частотой дозирования и с продолжительностью лечения, одобренных для коммерчески доступных блокаторов PD-1 в виде монотерапии, фактические дозы, частота дозирования и продолжительность лечения для любой конкретной комбинации настоящего изобретения могут отличаться от тех, которые одобрены для монотерапии блокатором PD-1. Таким образом, в конкретных вариантах комбинированной терапии по настоящему изобретению доза, частота дозирования и продолжительность лечения любым конкретным блокатором PD-1 в комбинированной терапии будут определяться на основании клинических испытаний, проведенных для комбинированной терапии.

В конкретном варианте комбинированной терапии блокатор PD-1 представляет собой ниволумаб или эффекторно-молчащий вариант ниволумаба, который вводят индивидууму внутривенно в дозе 3 мг/кг в течение 30-60 минут каждые две-три недели по мере необходимости, и где каждую дозу конъюгата IL-2 вводят внутривенно после введения блокатора PD-1 в течение того же времени лечения, что и для блокатора PD-1, или в течение времени, меньшего или большего, чем продолжительность лечения блокатором PD-1. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения ниволумаб или эффекторно-молчащий вариант ниволумаба вводят внутривенно индивидууму в начальной дозе 3 мг/кг в течение 30 минут с последующим внутривенным введением конъюгата IL-2 в течение 30 минут в тот же день, каждые три недели по четыре дозы, а затем вводят внутривенно ниволумаб в фиксированной дозе 240 мг в течение 30 минут каждые две недели или 480 мг в течение 30 минут каждые четыре недели.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения блокатор PD-1 представляет собой пембролизумаб или эффекторно-молчащий вариант пембролизумаба, который вводят взрослому человеку внутривенно в дозе 200 мг в течение 30 минут каждые три недели по мере необходимости, или ребенку внутривенно в дозе от 2 мг/кг до максимальной, составляющей около 200 мг, в течение 30 минут каждые три недели, при этом за каждым введением блокатора PD-1 следует введение дозы конъюгата IL-2, при этом каждую дозу конъюгата IL-2 вводят внутривенно после введения блокатора PD-1 в течение того же времени лечения, что и для блокатора PD-1, или в течение времени, меньшего или большего, чем продолжительность лечения блокатором PD-1.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения блокатор PD-1 представляет собой пембролизумаб или эффекторно-молчащий вариант пембролизумаба, который вводят взрослому индивидууму внутривенно в дозе 400 мг в течение 30 минут каждые шесть недель по мере необходимости, при этом за каждым введением блокатора PD-1 следует введение дозы конъюгата IL-2, при этом каждую дозу конъюгата IL-2 вводят внутривенно после введения блокатора PD-1 в течение того же времени лечения, что и для блокатора PD-1, или в течение времени, меньшего или большего, чем продолжительность лечения блокатором PD-1.

В конкретном варианте комбинированной терапии блокатор PD-1 представляет собой цемиплимаб-gwlc или эффекторно-молчащий вариант цемиплимаба-gwlc, который вводят индивидууму внутривенно в дозе 350 мг в течение 30 минут каждые три недели, по мере необходимости, и при этом каждую дозу конъюгата IL-2 вводят внутривенно после введения блокатора PD-1 в течение того же времени лечения, что и для блокатора PD-1, или в течение времени, меньшего или большего, чем продолжительность лечения блокатором PD-1. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения цемиплимаб-gwlc или эффекторно-молчащий вариант цемиплимаба-gwlc вводят внутривенно индивидууму в начальной дозе 350 мг в течение 30 минут с последующим введением конъюгата IL-2 в течение 30 минут в тот же день каждые три недели по мере необходимости.

В конкретном варианте комбинированной терапии блокатор PD-1 представляет собой атезолизумаб или эффекторно-молчащий вариант атезолизумаба, который вводят индивидууму внутривенно в дозе 1200 мг в течение 60 минут каждые три недели по мере необходимости, и где каждый дозу конъюгата IL-2 вводят внутривенно после введения блокатора PD-1 в течение того же времени лечения, что и для блокатора PD-1, или в течение времени, меньшего или большего, чем продолжительность лечения блокатором PD-1. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения атезолизумаб или эффекторно-молчащий вариант атезолизумаба вводят внутривенно индивидууму в начальной дозе 1200 мг в течение 60 минут с

последующим введением конъюгата IL-2 в течение 30 минут в тот же день каждые три недели по мере необходимости.

В конкретном варианте комбинированной терапии блокатор PD-1 представляет собой авелумаб или эффекторно-молчащий вариант авелумаба, который вводят индивидууму внутривенно в дозе 10 мг/кг или 800 мг в течение 60 минут каждые две недели по мере необходимости, и где каждую дозу конъюгата IL-2 вводят внутривенно после введения блокатора PD-1 в течение того же времени лечения, что и для блокатора PD-1, или в течение времени, меньшего или большего, чем продолжительность лечения блокатором PD-1. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения авелумаб или эффекторно-молчащий вариант авелумаба вводят внутривенно индивидууму в начальной дозе 10 мг/кг или 800 мг в течение 60 минут с последующим введением конъюгата IL-2 в течение 30 минут в том же день каждые две недели по мере необходимости.

В конкретном варианте комбинированной терапии блокатор PD-1 представляет собой дурвалумаб или эффекторно-молчащий вариант дурвалумаба, который вводят внутривенно индивидууму в дозе 10 мг/кг в течение 60 минут каждые две недели по мере необходимости и при этом каждую дозу конъюгата IL-2 вводят внутривенно после введения блокатора PD-1 в течение того же времени лечения, что и для блокатора PD-1, или в течение времени, меньшего или большего, чем продолжительность лечения блокатором PD-1. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения дурвалумаб или эффекторно-молчащий вариант дурвалумаба вводят внутривенно индивидууму в начальной дозе 10 мг/кг в течение 60 минут с последующим введением конъюгата IL-2 в течение 30 минут в тот же день каждые две недели по мере необходимости.

В то время как одобренные в настоящее время блокаторы PD-1 представлены в препаратах с концентрацией, которая позволяет осуществлять внутривенное введение индивидууму в течение 30-60 минут, однако комбинированная терапия по настоящему изобретению предполагает варианты, в которых конъюгат IL-2 и/или блокатор PD-1 представлен в составе в концентрации, которая позволяет вводить каждый из них индивидууму в виде одной инъекции. Возможность введения по меньшей мере одного из двух блокаторов за одну инъекцию значительно сократила бы время введения обоих блокаторов индивидууму.

В другом варианте настоящее изобретение относится к комбинированной терапии, при которой одновременно вводят конъюгат IL-2 и блокатор PD-1. Совместное введение может быть осуществлено путем введения конъюгата IL-2 и блокатора PD-1 в отдельных составах и одновременного введения каждого состава индивидууму, либо путем отдельных внутривенных инъекций, либо путем смешивания их перед внутривенным введением смеси индивидууму, либо путем введения их индивидууму отдельными инъекциями для каждого состава. Совместное введение также можно осуществить путем предоставления конъюгата IL-2 и блокаторов PD-1 в одном составе, который затем вводят индивидууму в виде одной внутривенной инъекции или одной инъекции.

Составы для комбинированной терапии по настоящему изобретению можно вводить индивидууму, имеющему рак, в сочетании с химиотерапией. Индивидуум может проходить химиотерапию одновременно с комбинированной терапией по настоящему изобретению. Индивидуум может проходить комбинированную терапию по настоящему изобретению после того, как этот индивидуум завершил курс химиотерапии. Индивидууму может быть назначена химиотерапия после завершения комбинированной терапии. Комбинированную терапию по настоящему изобретению можно также назначать индивидууму с рецидивирующим или метастатическим раком с прогрессированием заболевания или рецидивом рака, который подвергается химиотерапии или завершил химиотерапию.

Выбор дозы химиотерапевтического агента для химиотерапии зависит от нескольких факторов, включая скорость оборота вещества в сыворотке или ткани субъекта, уровень симптомов, иммуногенность объекта и доступность клеток-мишеней ткани или органа у индивидуума, который подвергается лечению. Доза дополнительного терапевтического агента должна быть такой, чтобы обеспечить приемлемый уровень побочных эффектов. Соответственно, величина дозы и частота дозирования каждого дополнительного терапевтического агента будут частично зависеть от конкретного терапевтического агента, тяжести рака, подлежащего лечению, и характеристик пациента. В уровне техники имеются рекомендации по выбору соответствующих доз антител, цитокинов и низкомолекулярных соединений. См., например, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom et al. (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon et al. (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602; Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed); Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002). Подходящий режим дозирования может определить лечащий врач, например, с использованием параметров или факторов, известных или предполагаемых в данной области, влияющих на лечение или предполагаемых как влияющих на лечение, и будет зависеть, например, от истории болезни человека (например, от предшествующей терапии), типа и стадии рака, подлежащего лечению, и биомаркеров реакции на один или более терапевтических агентов в комбинированной терапии.

Например, пембролизумаб в настоящее время одобрен FDA для применения в комбинированной терапии для (i) лечения немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), включающей пембролизумаб с пеметрекседом и химиотерапией платиной или карбоплатином, и либо паклитакселом, либо наб-паклитакселом; и для (ii) лечения плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), включающей пембролизумаб и платиносодержащую химиотерапию; и атезолизумаб в настоящее время одобрен для комбинированной терапии для лечения NSCLC, включающей бевацизумаб (антитело против VEGF-A, продаваемое под торговым названием AVASTIN), паклитаксел и карбоплатин.

Таким образом, настоящее изобретение охватывает варианты комбинированной терапии, которые дополнительно предусматривают стадию химиотерапии, включающую платиносодержащую химиотерапию, пеметрексед и химиотерапию платиной или карбоплатином, и либо паклитакселом либо наб-паклитакселом. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения комбинированная терапия со стадией химиотерапии может применяться для лечения по меньшей мере NSCLC и HNSCC.

Комбинированная терапия, дополнительно в сочетании со стадией химиотерапии, может быть использована для лечения любого пролиферативного заболевания, в частности, для лечения рака. В конкретных вариантах комбинированная терапия по настоящему изобретению может применяться для лечения меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи, уротелиального рака, рака молочной железы, рака желудочно-кишечного тракта, множественной миеломы, гепатоцеллюлярного рака, неходжкинской лимфомы, рака почки, лимфомы Ходжкина, мезотелиомы, рака яичников, мелкоклеточного рака легкого, рака пищевода, рака анального канала, рака желчных путей, колоректального рака, рака шейки матки, рака щитовидной железы или рака слюнных желез.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения комбинированная терапия дополнительно в сочетании со стадией химиотерапии может применяться для лечения рака поджелудочной железы, рака

bronхов, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака головного мозга или центральной нервной системы, рака периферической нервной системы, рака матки или эндометрия, рака полости рта или глотки, рака печени, рака почки, рака яичка, рака желчных путей, рака тонкой кишки или аппендикса, рака надпочечников, остеосаркомы, хондросаркомы или рака гематологических тканей.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения комбинированная терапия со стадией химиотерапии может применяться для лечения одного или более видов рака, выбранных из меланомы (метастатической или нерезектабельной), первичной медиастинальной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (PMBCL), уротелиальной карциномы, MSIHC, рака желудка, рака шейки матки, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), карциномы из клеток Меркеля (MCC), почечно-клеточной карциномы (в том числе запущенной) и плоскоклеточной карциномы кожи.

#### **Лечение с использованием комбинированной терапии**

Комбинированная терапия по настоящему изобретению может быть использована для лечения любого пролиферативного заболевания, в частности, для лечения рака. В конкретных вариантах комбинированная терапия по настоящему изобретению может быть использована для лечения меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи, уротелиального рака, рака молочной железы, рака желудочно-кишечного тракта, множественной миеломы, гепатоцеллюлярного рака, неходжкинской лимфомы, рака почки, лимфомы Ходжкина, мезотелиомы, рака яичников, мелкоклеточного рака легкого, рака пищевода, рака анального канала, рака желчных путей, колоректального рака, рака шейки матки, рака щитовидной железы или рака слюнных желез.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения комбинированная терапия по настоящему изобретению может быть использована для лечения рака поджелудочной железы, рака бронхов, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака головного мозга или центральной нервной системы, рака периферической нервной системы, рака матки или эндометрия, рака полости рта или глотки, рака печени, рака почки, рака яичка, рака желчных путей, рака тонкой кишки или аппендикса, рака надпочечников, остеосаркомы, хондросаркомы или рака гематологических тканей.

Коммерчески доступные в настоящее время блокаторы PD-1 одобрены FDA для лечения по меньшей мере одного или более видов рака, выбранных из меланомы (метастатической или нерезектабельной), первичной медиастинальной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (PMBCL), уротелиальной карциномы, MSIHC, рака желудка, рака шейки матки, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), карциномы из клеток Меркеля (MCC), почечно-клеточной карциномы (в том числе запущенной) и плоскоклеточной карциномы кожи. Таким образом, комбинированная терапия по настоящему изобретению может быть использована для лечения по меньшей мере одного или более видов рака, выбранных из меланомы (метастатической или нерезектабельной), первичной медиастинальной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (PMBCL), уротелиальной карциномы, MSIHC, рака желудка, рака шейки матки, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), карциномы из клеток Меркеля (MCC), почечно-клеточной карциномы (в том числе запущенной) и плоскоклеточной карциномы кожи.

#### **Наборы**

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанный здесь конъюгат IL-2 представлен в форме набора, т.е. это упакованная комбинация реагентов в заранее определенных количествах с инструкциями по проведению процедуры. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения процедура представляет собой диагностический анализ. В других вариантах осуществления изобретения процедура представляет собой терапевтическую процедуру.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения набор дополнительно содержит растворитель для восстановления конъюгата IL-2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конъюгат IL-2 предоставляется в форме фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения набор дополнительно содержит терапевтический агент/средство, отличающееся от конъюгата IL-2. В другом варианте осуществления настоящего изобретения набор содержит комбинированный продукт, содержащий конъюгат IL-2, содержащийся в устройстве для доставки лекарств.

Приведенные ниже примеры предназначены для дальнейшего понимания сущности настоящего изобретения.

### **Примеры**

#### **ОБЩИЕ МЕТОДЫ**

Стандартные методы молекулярной биологии описаны в Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982 & 1989 2nd Edition, 2001 3rd Edition) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; и в Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). В Ausbel, et al. (2001), *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY также описаны стандартные методы молекулярной биологии: клонирование в бактериальных клетках и мутагенез ДНК (том 1), клонирование в клетках млекопитающих и дрожжах (том 2), гликоконъюгаты и экспрессия белков (том 3) и биоинформатика (том 4).

Также описаны способы очистки белка, включая иммунопреципитацию, хроматографию, электрофорез, центрифугирование и кристаллизацию (Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Описаны химический анализ, химическая модификация, посттрансляционная модификация, производство слитых белков и гликозилирование белков (см., например, Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16. 0. 5-16. 22. 17, и в Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N. J. , pp. 384-391). Также описана продукция, очистка и фрагментация поликлональных и моноклональных антител (см. Coligan, et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York, и Harlow and Lane (1999). *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY). Известны стандартные методики для охарактеризования взаимодействий лиганд/рецептор (см., например, Coligan, et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

#### **ПРИМЕР 1**

##### **Сайты IL-2 для включения пара-азидометилфенилаланина (pAMF) и конъюгации с ПЭГ**

Для включения не встречающихся в природе остатков pAMF вместо специфических остатков были разработаны отдельные варианты IL-2 с использованием бесклеточной экспрессионной платформы Sutro

Xpress CF+ (Yin et al. Sci Rep 2017, 7, 1, 3026). Сайты для включения рAMF были выбраны таким образом, чтобы обеспечить конъюгацию фрагментов полиэтиленгликоля (ПЭГ) с помощью катализируемого медью азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC), или с помощью метода конъюгации без использования меди, например промотируемого напряжением азид-алкинового циклоприсоединения (SPAAC) через дибензоциклооктин (DBCO или DIBO).

Сокристаллическую структуру IL-2, связанного с IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\gamma$ с и IL-2R $\beta$  (Stauber et al., 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103:2793; код pdb 2ERJ), анализировали с использованием PyMOL чтобы определить, какие остатки имеют боковые цепи, которые ориентированы на растворитель или на интерфейс IL-2R $\alpha$ . Такие остатки были выбраны для включения рAMF, чтобы сделать возможной конъюгацию с ПЭГ. В частности, были выбраны 12 остатков вблизи N-конца для включения рAMF, которые имеют боковые цепи, ориентированные на растворитель. Конъюгацию ПЭГ с любым из этих сайтов были выбраны для увеличения периода полужизни IL-2, снижения требуемой дозы и/или для увеличения общего воздействия. Включение рAMF и/или конъюгация PEG в эти сайты также были выбраны для воздействия на аффинности связывания с IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\gamma$ с и IL-2R $\beta$ , которые можно использовать для оптимизации терапевтических свойств, как описано ниже. Варианты IL-2 получали с использованием стандартных методов мутагенеза или синтеза генов, и положения для включения рAMF показаны в Таблице 1.

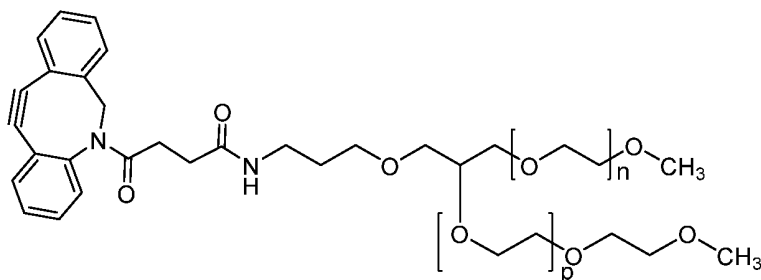
Модифицировали альдеслейкин (DesA1\_IL-2\_C124S, обозначаемый также как Ald; SEQ ID NO: 2), чтобы он имел карбокси-концевую HIS6-метку (Ald-6HIS), связанную через линкер Gly-Gly-Ser (GGS), и включал рAMF на участках, показанных в Таблице 1. Эти варианты экспрессировали в Xpress+ CF в течение ночи в присутствии <sup>14</sup>C-лейцина. Экспрессию вариантов IL-2 оценивали по включению <sup>14</sup>C (общий выход), а количество, оставшееся в растворе (выход в растворе), дополнительно измеряли после центрифугирования при 14000 г в течение 10 минут. Измеренные выходы показаны в Таблице 1.

<b>Таблица 1</b>		
Экспрессия и растворимость Ald-6HIS с включением рAMF в указанном сайте		
Положение включения рAMF в Ald-6HIS	Общий выход (мкг/мл)	Выход в растворе (мкг/мл)
Нет	692	463
P1	600	276
T2	585	278
S3	549	286
S4	579	308
S5	606	304
T6	631	211
K7	639	322
K8	637	226
T9	614	127
N25	653	244
N28	708	158
N29	607	241



Остатки рАМФ были выбраны так, чтобы обеспечить возможность конъюгации неразлагаемого ПЭГ. В этой конструкции конъюгированный ПЭГ должен связываться со всеми тремя рецепторами IL-2R и увеличивать время полужизни. Как и в описанном выше подходе, желательно иметь селективную аффинность к IL-2R $\beta$  и IL-2R $\gamma$  с по сравнению с IL-2R $\alpha$  для обеспечения усиления противоопухолевого ответа Т-клеток и НК-клеток с минимальной активацией иммуносупрессивных Т-клеток. Однако в этой конструкции полученные конъюгаты ПЭГ-IL-2 активны при начальном введении дозы. Как указано выше, некоторое связывание с IL-2R $\alpha$  может быть полезным, но необязательным для снижения системной токсичности посредством стимуляции клеток T<sub>reg</sub> или других популяций клеток, экспрессирующих IL2R $\alpha$ . Сайты сканировали, чтобы идентифицировать те, которые имели оптимальную аффинность связывания с IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\gamma$  и IL-2R $\beta$ , чтобы максимизировать терапевтический индекс. В целом, длительный период полужизни и селективное взаимодействие с рецепторами могут обеспечить более предпочтительную дозировку и повышенный терапевтический индекс по сравнению со стандартными препаратами на основе IL-2, например, с альдеслейкином.

На растворимость некоторых вариантов, по-видимому, влияет укладка белка, стабильность или склонность к агрегации IL-2 с заменой рАМФ в некоторых местах. Три лучших варианта IL-2 с самым высоким выходом вещества в растворе были выбраны для дальнейшей оценки и, соответственно, экспрессированы и очищены смолой IMAC с последующей вторичной очисткой с помощью смолы Сарто Q. Затем варианты IL-2 конъюгировали с разветвленным ПЭГ 20 кДа (DBCO 2x10 kDa PEG) следующей формулы:



где n и p каждый равняется около 227. Неконъюгированные и PEG2- конъюгированные варианты также оценивали на термостабильность (Таблица 2), связывание IL-2R $\alpha$  и IL-2R $\beta$  (Таблица 3) и анализ репортера CTLL2 STAT5 (Таблица 4).

<b>Таблица 2</b> Термостабильность Ald-6HIS с включением рАМФ в указанном сайте		
	Дифференциальная сканирующая флуориметрия, Т <sub>м</sub> (°C)	
Конструкция	Неконъюгированный	DBCO 2x10 kDa PEG (PEG2)
Ald-6HIS	52,8	NA
Ald-6HIS_S4pAMF	50,4	58,8
Ald-6HIS_S5pAMF	51,7	57,0
Ald-6HIS_K7pAMF	49,3	57,4

NA = не применимо
-------------------

<b>Таблица 3</b> Кинетическая аффинность вариантов Ald-6HIS (с включением рAMF, с конъюгацией с DBCO 2x10 kDa PEG или без конъюгации) к IL-2R $\alpha$ -Fc и IL-2R $\beta$ -Fc				
Конструкция	Связывание IL-2R $\alpha$ -Fc, анализ SPR (M)		Связывание IL-2R $\beta$ -Fc, анализ SPR (M)	
	Неконъюгированный	Конъюги-рованный с DBCO 2x10 kDa PEG (PEG2)	Неконъюгированный	Конъюги-рованный с DBCO 2x10 kDa PEG (PEG2)
Ald-6HIS	8E-09	NA	3E-07	NA
Ald-6HIS_S4pAMF	8E-09	1E-07	3E-07	NC
Ald-6HIS_S5pAMF	1E-08	7E-08	7E-07	NC
Ald-6HIS_K7pAMF	8E-09	8E-08	5E-07	NC
NA = не применимо NC = не вычисляется ND = не определено				

<b>Таблица 4</b> Анализ репортера CTLL2 STAT5		
Конструкция	Неконъюгированный	Конъюгированный с DBCO 2x10 kDa PEG (PEG2)
	EC50 (пМ)	EC50 (пМ)
Ald-6HIS	12	NA
Ald-6HIS_S4pAMF	11	209
Ald-6HIS_S5pAMF	10	169
Ald-6HIS_K7pAMF	10	245

**ПРИМЕР 2****Мутации IL-2 для снижения аффинности к IL2R $\alpha$** 

Как описано выше, для терапевтических целей желательно иметь вариант IL-2, который проявляет более низкую аффинность к IL-2R $\alpha$ , чем природный IL-2, сохраняя при этом связывание с IL-2R $\gamma$ с и IL-2R $\beta$ . Ожидается, что эта селективность связывания увеличит противоопухолевый ответ Т-клеток и NK-клеток с более низким ответом на иммуносупрессивные Т-клетки по сравнению с нативным IL-2.

Для создания вариантов IL-2, обладающих аффинностью к IL-2R $\alpha$ , сокристаллическую структуру IL-2 связывали с IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\gamma$ с и IL-2R $\beta$  (Stauber et al., 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103:2793; код pdb 2ERJ), и сначала анализировали с использованием PyMOL, чтобы определить, какие остатки имеют боковые цепи, ориентированные на интерфейс IL-2R $\alpha$ . Мутации во всех этих сайтах были просканированы с использованием

MOE (Molecular Operating Environment (MOE), 2013. 08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2018), чтобы выявить мутации, которые, по прогнозам, снижают аффинность IL-2/IL-2R $\alpha$  без существенного влияния на стабильность IL-2.

В частности, были выбраны 14 точечных мутаций, которые, как было предсказано, обладали желаемой аффинностью и стабильностью. Эти мутации были сделаны в Ald-6HIS и состояли из следующих замен: K34D, T36D, R37G, T40D, F41L, K42G, Y44V, E60T, E61S, K63G, P64A, E67G, L71I и Y106A. Кроме того, было выбрано десять наборов тройных мутаций с использованием комбинаций четырех замен P64A, E60T, E61S, Y106A, которые, как ожидалось, еще больше снизят аффинность IL-2 к IL-2R $\alpha$ . Аминокислотные положения пронумерованы по схеме нумерации A.

На Фиг. 2А, 2В и 2С показано равновесное связывание различных вариантов IL-2 с иммобилизованным биотин-IL-2R $\alpha$  или биотин-IL-2R $\beta$ .

Варианты IL-2, которые были синтезированы с использованием стандартных методов мутагенеза или генного синтеза, показаны в Таблице 5 ниже. В Таблице 5 также показаны данные по связыванию IL-2R $\alpha$  и IL-2R $\beta$ , определенные с помощью SPR на Biacore T200 с использованием способов, описанных в Примере 9.

<b>Таблица 5</b>				
Аффинность связывания, определенная с помощью анализа SPR				
Название	SPR Биотин-IL-2R $\alpha$ -His (KD, M)	Связывание IL-2R $\alpha$ (кратность уменьшения по сравнению с wt)	SPR Биотин-IL-2R $\beta$ -His (KD, M)	Связывание IL-2R $\beta$ (кратность уменьшения по сравнению с wt)
Ald-6HIS	1,00E-08	1	4,00E-07	1
Ald-6HIS_K34D	3,00E-07	30	1,00E-06	3
Ald-6HIS_T36D	5,00E-08	5	8,00E-07	2
Ald-6HIS_R37G	5,00E-07	50	6,00E-07	2
Ald-6HIS_T40D	5,00E-07	50	6,00E-07	2
Ald-6HIS_F41L	1,00E-07	10	2,00E-06	5
Ald-6HIS_K42G	1,00E-07	10	6,00E-07	2
Ald-6HIS_Y44V	6,00E-07	60	NC	
Ald-6HIS_E60T	5,00E-07	50	8,00E-07	2
Ald-6HIS_E61S	9,00E-07	90	1,00E-06	3
Ald-6HIS_K63G	4,00E-08	4	5,00E-07	1
Ald-6HIS_P64A	1,00E-08	1	5,00E-07	1
Ald-6HIS_E67G	3,00E-08	3	6,00E-07	2
Ald-6HIS_L71I	1,00E-08	1	4,00E-07	1
Ald-6HIS_Y106A	ND	ND	ND	ND
Ald-6HIS_E60T/E61S	8,00E-07	80	2,00E-06	5
Ald-6HIS_E60T/P64A	6,00E-08	6	7,00E-07	2
Ald-6HIS_E60T/Y106A	ND	ND	ND	ND
Ald-6HIS_E61S/P64A	5,00E-07	50	5,00E-07	1

Ald-6HIS_E61S/Y106A	NC	NC	2,00E-06	5
Ald-6HIS_P64A/Y106A	ND	ND	ND	ND
Ald-6HIS_E60T/E61S/P64A	2,00E-06	200	1,00E-06	3
Ald-6HIS_E60T/E61S/Y106A	ND	ND	ND	ND
Ald-6HIS_E60T/P64A/Y106A	ND	ND	ND	ND
Ald-6HIS_E61S/P64A/Y106A	NC	NC	NC	NC
NC = не вычисляется ND = не определено wt = нативный IL-2 или активность альдеслейкина				

Функциональную активность вариантов IL-2 определяли с помощью анализа димеризации PathHunter U2OS IL2RB/IL2RG и репортерного анализа GloResponse STAT5-luc2-CTLL-2, как описано соответственно в Примерах 11 и 12. Результаты показаны в Таблице 6.

<b>Таблица 6</b>		
Клеточный анализ измерения функциональной активности вариантов IL-2 в репортерных клеточных линиях		
Название	U2OS-IL2Rbg EC50 (пМ)	CTLL2-STAT5 EC50 (пМ)
Альдеслейкин	813	12
Ald-6HIS_K34D	865	12
Ald-6HIS_T36D	468	6
Ald-6HIS_R37G	753	18
Ald-6HIS_T40D	614	216
Ald-6HIS_F41L	1563	87
Ald-6HIS_K42G	1634	33
Ald-6HIS_Y44V	4188	679
Ald-6HIS_E60T	899	324
Ald-6HIS_E61S	623	5111
Ald-6HIS_K63G	485	5
Ald-6HIS_P64A	608	5
Ald-6HIS_E67G	879	7
Ald-6HIS_L71I	680	6
Ald-6HIS_E60T_E61S	1953	525
Ald-6HIS_E60T_P64A	499	24
Ald-6HIS_E61S_P64A	634	213
Ald-6HIS_E61S_Y106A	2868	>7000
Ald-6HIS_E60T_E61S_P64A	1962	1093
Ald-6HIS_E61S_P64A_Y106A	5773	>7000
> означает «более чем»		

Для создания вариантов IL-2 с еще более низкой аффинностью к IL-2R $\alpha$  был сконструирован еще один раунд мутантов, как показано в Таблице 7А-В. В частности, из первого набора, описанного выше, E60T, E61S и T40D показали значительное снижение связывания IL-2R $\alpha$  и относительно низкий риск иммуногенности. Также были включены мутации R37A и F41K, поскольку они, как описано ранее, значительно снижают связывание с IL-2R $\alpha$  (Heaton et al. Cancer Res 1993, 53, 2597-2602). Данные связывания IL-2R $\alpha$  и IL-2R $\beta$  получены с помощью анализа SPR на Biacore T200 с использованием методов, описанных в Примере 9.

<b>Таблица 7А</b>				
Аффинность связывания IL-2R $\alpha$ человека, определенная с помощью анализа SPR				
Название	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD(M)	Chi <sup>2</sup> /R макс.
Ald-6HIS	1,2E+06	1,8E-01	1,6E-07	2,58%
Ald_F41/Y44A/I71G*	NC	NC	>1E-06	14,17%
Ald-6HIS_R37A/T40D	ND	ND	ND	
Ald-6HIS_R37A/F41K	ND	ND	ND	
Ald-6HIS_R37A/E60T	NC	NC	>1E-06	0,11%
Ald-6HIS_T40D/F41K	NC	NC	>1E-06	0,24%
Альд- 6HIS_T40D/E60T	NC	NC	>1E-06	0,31%
Ald-6HIS_F41K/E60T	NC	NC	>1E-06	1,93%
Ald-6HIS_R37A/T40D/F41K	ND	ND	ND	
Ald-6HIS_R37A/T40D/E60T	ND	ND	ND	
Ald-6HIS_R37A/F41K/E60T	ND	ND	ND	
Ald-6HIS_T40D/F41K/E60T	ND	ND	ND	
NC = не вычисляется ND = не определено > - больше, чем				

<b>Таблица 7В</b>				
Аффинность связывания IL-2R $\beta$ человека, определенная с помощью анализа SPR				
Название	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD(M)	Chi <sup>2</sup> /R макс.
Ald-6HIS	2,5E+05	3,1E-01	1,2E-06	1%
Ald_F41/Y44A/I71G*	3,9E+05	3,0E-01	7,7E-07	1%
Ald-6HIS_R37A/T40D	3,4E+05	2,5E-01	7,3E-07	0%
Ald-6HIS_R37A/F41K	3,0E+05	3,0E-01	1,0E-06	4%
Ald-6HIS_R37A/E60T	7,5E+04	8,2E-02	1,1E-06	24%
Ald-6HIS_T40D/F41K	3,3E+05	3,2E-01	9,8E-07	5%
Альд- 6HIS_T40D/E60T	3,6E+05	3,6E-01	9,9E-07	1%
Ald-6HIS_F41K/E60T	4,4E+05	4,7E-01	1,1E-06	1%

Ald-6HIS_R37A/T40D/F41K	4,1E+05	2,4E-01	5,9E-07	1%
Ald-6HIS_R37A/T40D/E60T	2,2E+05	4,2E-01	1,9E-06	1%
Ald-6HIS_R37A/F41K/E60T	1,5E+08	1,3E-02	8,6E-07	0%
Ald-6HIS_T40D/F41K/E60T	3,5E+05	3,6E-01	1,0E-06	0%

Для определения стабильности вариантов IL-2 проводили анализ белкового теплового сдвига, как описано в Примере 8,.

<b>Таблица 8</b>			
Термостабильность, определенная методом дифференциальной сканирующей флуориметрии			
Название	Базовый уровень RFU	Tm1 (°C)	ΔTm (°C)
Ald-6HIS	4222	51	0
Ald-6HIS_F41/Y44A/L71G*	4528	49	-2
Ald-6HIS_R37A/T40D	4182	51,4	0,4
Ald-6HIS_R37A/F41K	4134	53,7	2,7
Ald-6HIS_R37A/E60T	4287	47,2	-3,8
Ald-6HIS_T40D/F41K	4251	52,6	1,6
Ald-6HIS_T40D/E60T	4381	49,3	-1,7
Ald-6HIS_F41K/E60T	4577	50,8	-0,2
Ald-6HIS_R37A/T40D/F41K	4057	54,1	3,1
Ald-6HIS_R37A/T40D/E60T	4356	47,7	-3,3
Ald-6HIS_R37A/F41K/E60T	4208	53,3	2,3
Ald-6HIS_T40D/F41K/E60T	4437	51,50	0,5
* - раскрыт в патенте США № 9266938			
RFU = относительные единицы флуоресценции			

<b>Таблица 9А</b>		
Измерение функциональной активности вариантов IL-2 с помощью анализа клеток STAT5-CTLL2		
Название	EC50 (нМ)	EC50 кратность изменения
Ald-6HIS	0,009	1,00
Ald-6HIS_R37A/T40D	0,101	11,19
Ald-6HIS_R37A/F41K	11,010	1218,59
Ald-6HIS_R37A/E60T	0,129	14,29
Ald-6HIS_T40D/F41K	6,314	698,84
Ald-6HIS_T40D/E60T	2,200	243,50
Ald-6HIS_F41K/E60T	103,400	11444,38
Ald-6HIS_R37A/T40D/F41K	12,690	1404,54
Ald-6HIS_R37A/T40D/E60T	6,221	688,54

Ald-6HIS_R37A/F41K/E60T	95,160	10532,37
Ald-6HIS_T40D/F41K/E60T	98,550	10907,58

**Таблица 9В**

Измерение функциональной активности вариантов IL-2 с помощью клеточного анализа NK-92

Название	EC50 (нМ)	EC50 кратность изменения
Ald-6HIS	0,007	1,00
Ald-6HIS_R37A/T40D	0,014	2,06
Ald-6HIS_R37A/F41K	0,051	7,31
Ald-6HIS_R37A/E60T	0,031	4,46
Ald-6HIS_T40D/F41K	0,020	2,81
Ald-6HIS_T40D/E60T	0,032	4,61
Ald-6HIS_F41K/E60T	0,079	11,38
Ald-6HIS_R37A/T40D/F41K	0,026	3,73
Ald-6HIS_R37A/T40D/E60T	0,076	10,96
Ald-6HIS_R37A/F41K/E60T	0,063	9,03
Ald-6HIS_T40D/F41K/E60T	0,063	9,09

**Таблица 9С**

Измерение функциональной активности вариантов IL-2 с помощью анализа мостиковых клеток U2OS В/ВG

Название	EC50 (нМ)	EC50 кратность изменения
Ald-6HIS	0,159	1,00
Ald-6HIS_R37A/T40D	0,451	2,83
Ald-6HIS_R37A/F41K	0,370	2,32
Ald-6HIS_R37A/E60T	0,522	3,28
Ald-6HIS_T40D/F41K	0,294	1,84
Ald-6HIS_T40D/E60T	0,492	3,09
Ald-6HIS_F41K/E60T	0,502	3,15
Ald-6HIS_R37A/T40D/F41K	0,185	1,16
Ald-6HIS_R37A/T40D/E60T	0,403	2,53
Ald-6HIS_R37A/F41K/E60T	0,325	2,04
Ald-6HIS_T40D/F41K/E60T	0,503	3,15

**Таблица 9D**

Измерение функциональной активности вариантов IL-2 с помощью клеточного анализа DERL7

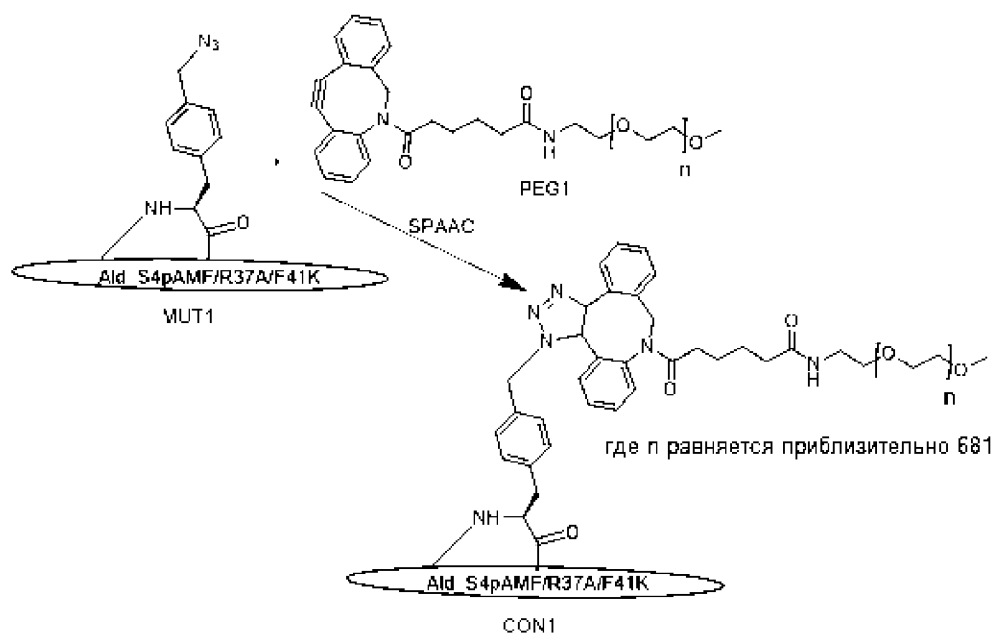
Название	EC50 (нМ)	EC50 кратность изменения
Ald-6HIS	0,018	1,00

Ald-6HIS_R37A/T40D	0,023	1,31
Ald-6HIS_R37A/F41K	0,021	1,18
Ald-6HIS_R37A/E60T	0,038	2,14
Ald-6HIS_T40D/F41K	0,012	0,65
Ald-6HIS_T40D/E60T	0,028	1,55
Ald-6HIS_F41K/E60T	0,036	2,01
Ald-6HIS_R37A/T40D/F41K	0,013	0,71
Ald-6HIS_R37A/T40D/E60T	0,043	2,41
Ald-6HIS_R37A/F41K/E60T	0,026	1,46
Ald-6HIS_T40D/F41K/E60T	0,025	1,40

### ПРИМЕР 3

#### Сочетание сайта рAMF и мутаций Ra

Альдедейкин с заменой S4pAMF комбинировали с мутациями R37A и F41K в Ra, с образованием варианта IL-2 Ald\_S4pAMF/R37A/F41K (MUT1). Как показано на приведенной ниже схеме, PEG1 конъюгировали с рAMF MUT1 для увеличения периода полужизни с использованием конъюгации SPAAC, без использования меди, как описано в Примере 6, с получением Ald\_S4pAMF (PEG1)/R37A/F41K (CON1). В качестве референсных молекул для использования в качестве контролей были созданы варианты без мутаций R37A и F41K в параллельных Ald\_S4pAMF (MUT2) и Ald\_S4pAMF(PEG1) (CON2).



### ПРИМЕР 4

#### Бесклеточная экспрессия рекомбинантного IL-2 (rIL-2) и вариантов, содержащих рAMF

Альдедейкин и его варианты экспрессировали в реакции Xpress+ CF™. Бесклеточные экстракты готовили из смеси четырех экстрактов, полученных из четырех сконструированных штаммов: (1) аттенуированный штамм RF1 E. coli, чувствительный к OmpT, сконструированный для сверхэкспрессии DsbC и FкрА E. coli, (2) аналогичный аттенуированный штамм RF1 E. coli, сконструированный для продуцирования



ортогональной CUA-кодирующей тРНК для вставки не встречающейся в природе аминокислоты в янтарный стоп-кодон, (3) аналогичный аттенуированный штамм RF1 E. coli, сконструированный для продуцирования рАМФ-специфичной аминоацил-тРНК-синтетазы, и (4) аналогичный аттенуированный штамм RF1 E. coli, сконструированный для продукции РНК-полимеразы Т7. Бесклеточный экстракт 1 обрабатывали 50 мкМ йодацетамида в течение 30 минут при комнатной температуре (20°C) и добавляли к премиксу, содержащему все остальные компоненты. Конечная концентрация в реакции синтеза белка составляла 30% (об./об.) клеточного экстракта 1, 1% (об./об.) клеточного экстракта 2 или 5 мкМ ортогональной CUA-кодирующей тРНК, 0,6 % (об./об.) клеточного экстракта 3 или 5 мкМ сконструированной рАМФ-специфической аминоацил-тРНК-синтетазы, 0,5% (об./об.) клеточного экстракта 4 или 100 нМ РНКП Т7, 2 мМ параазидометилфенилаланина (рАМФ), 2 мМ GSSG, 8 мМ глутамата магния, 10 мМ глутамата аммония, 130 мМ глутамата калия, 35 мМ пирувата натрия, 1,2 мМ AMP, по 0,86 мМ каждого из GMP, UMP и CMP, по 2 мМ аминокислот (кроме 0,5 мМ для тирозина и фенилаланина), 4 мМ оксалата натрия, 1 мМ путресцина, 1,5 мМ спермидина, 15 мМ фосфата калия, 2,5-5 мкг/мл IL-2 или вариантов ДНК. Бесклеточные реакции проводили при 20-30°C в течение 12 часов на шейкере при 650 об/мин в 96-луночных планшетах в масштабе 100 мкл, в 24-луночных цветочных планшетах в масштабе 1 мл, в чашках Петри 100 x 10 мм в масштабе 8 мл, или в резервуарах с мешалкой для больших масштабов.

#### ПРИМЕР 5

##### **Очистка альдеслейкина и вариантов**

Альдеслейкин и его варианты конструировали с 6-гистидиновой меткой на N- или C-конце; расщепляемые аффинные метки, например метка His SUMO на N-конце; или без метки. Немеченый альдеслейкин и его варианты очищали стандартными методами очистки. Альдеслейкин, меченый His (Ald-6HIS), и варианты очищали стандартными методами очистки с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом (IMAC). Молекулы с расщепляемыми аффинными метками подвергали ферментативному расщеплению с последующей стандартной очисткой для удаления метки и фермента.

#### ПРИМЕР 6

##### **Сайт-специфическое пегилрование**

Для специфической конъюгации сайта ПЭГ с вариантами альдеслейкина, содержащими рАМФ, использовали катализируемую медью химическую реакцию и реакцию без меди.

*SPAAC конъюгация без меди:* линейный или разветвленный mPEG (10 кДа, 20 кДа, 30 кДа, 40 кДа) связывали с дибензоциклооктином (DBCO) или дибензоциклооктинолом (DIBO). Исходный раствор 5 мМ DBCO/DIBO-mPEG смешивали с 1-50 мг/мл вариантов альдеслейкина, включение рАМФ осуществляли при соотношении DBCO/DIBO-mPEG к рАМФ равном 2-50 в течение времени от 8 часов до 5 дней при 22-35°C.

*CuAAC:* исходный раствор 5 мМ линейного или разветвленного алкин-mPEG (10 кДа, 20 кДа, 30 кДа, 40 кДа) смешивали с вариантами альдеслейкина в концентрации 1-50 мг/мл, включение рАМФ осуществляли при соотношении алкин-mPEG к рАМФ равном 2-50 в 10 x фосфатном буфере (100 мМ фосфата натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,4). Медный реагент готовили отдельно путем смешивания CuSO<sub>4</sub>, лиганда (на основе триазола, такого как трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин, или на основе бензимидазола, такого как трикалий 5,5',5''-[2,2',2''-нитрилотрис(метилентрис(1H-бензимидазол-2,1-дил)]трипентаноат гидрат), восстановителя (аскорбат натрия, DTT или TCEP) и поглотителя активных форм кислорода (ROS) (метионин, цистеин или гистидин). Когда в качестве восстановителя использовали аскорбат натрия, то добавляли аминоксидин.

Медь добавляли при молярном соотношении алкина к меди равном 1-1,5, молярном соотношении лиганда к меди равном 1-5, молярном соотношении восстановителя к меди равном 2-10, молярном соотношении аскорбата к аминуганидину равном 1-5. Затем медный реагент смешивали со смесью белок/лекарство в течение времени от 8 часов до 5 дней при температуре 22-35°C. Когда были необходимы анаэробные условия, все растворы перед смешиванием продували инертным газом, и во время реакции реакционную смесь выдерживали в атмосфере инертного газа.

Неконъюгированный ПЭГ удаляли. Неконъюгированные или конъюгированные с ПЭГ варианты альдеслейкина оценивали на эффективность конъюгации, стабильность и связывание с IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$ , IL-2R $\alpha\beta$ , IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$  и IL-2R $\beta\gamma_c$  с помощью анализа ELISA или анализа без метки, таким как SPR и/или интерферометрией биослоев (BLI).

#### ПРИМЕР 7

##### **Плотность пегилирования**

Плотность пегилирования определяли с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой. Белок денатурировали в 5 М гуанидине и восстанавливали с помощью 1 мМ белка TCEP, а затем пропускали через колонку C8 с градиентом ацетонитрила 0-50%. Плотность пегилирования определяли путем интегрирования УФ-спектра при 280 нм. Неконъюгированные белки и конъюгаты с негидролизруемыми ПЭГ с известной плотностью пегилирования использовали в качестве референсных стандартов.

#### ПРИМЕР 8

##### **Дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF)**

Анализ теплового сдвига белка проводили путем смешивания анализируемого белка с чувствительным к окружающей среде красителем (SYPRO Orange, Life Technologies Cat #S-6650) в фосфатно-буферном растворе (PBS), и флуоресценцию смеси контролировали в реальном времени, пока он подвергался контролируемой термической денатурации. Белковые растворы с концентрацией 0,2-2 мг/мл смешивали в объемном отношении 1:1 с раствором SYPRO Orange, разбавленным 1:500 в PBS (исходный краситель SYPRO Orange представлен в концентрации 5000X в DMSO). Аликвоты по 10 мкл смеси белок-краситель распределяли в четырех повторах в 384-луночном микропланшете (Bio-Rad Cat #MSP-3852, при этом планшеты предварительно нагревали в течение 30 минут при 95°C), после чего планшет закрывали оптически прозрачной пленкой (Bio-Rad Cat #MSB-1001) и помещали в 384-луночный планшетный термоциклер в реальном времени (Bio-Rad CFX384 Real Time System). Смесь белок-краситель нагревали от 25°C до 95°C с шагом 0,1°C за цикл (около 1,5°C в минуту), оставляя 3 секунды на уравнивание при каждой температуре перед измерением флуоресценции. В конце эксперимента определяли температуру плавления при переходе с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager.

#### ПРИМЕР 9

##### **Кинетический анализ SPR или BLI без меток**

В этом примере описаны способы идентификации вариантов альдеслейкина, которые пегилированы в сайтах, обеспечивающих (1) ограниченное воздействие или отсутствие воздействия на связывание IL-2R, (2) снижение связывания IL-2R $\alpha$  при сохранении аналогичного связывания в отношении IL-2R $\beta$ , или (3) снижение связывания IL-2R $\beta\gamma_c$  по сравнению со связыванием rhIL-2. В этом примере также представлены способы оценки того, изменяются ли свойства связывания только за счет конъюгации с ПЭГ. Таким образом,

для определения относительной аффинности связывания между вариантами альдеслейкина и различными компонентами комплекса IL-2R использовали серию анализов без метки.

Поликлональные антитела против Fc иммобилизовали на чипе CM5 (GE Life Sciences) с использованием химии связывания амина (из набора Amine Coupling Kit, GE Life Sciences). Стадии иммобилизации осуществляли при скорости потока 25 мкл/мин в 1х буфере HBS-EP<sup>+</sup> (GE Life Sciences; 10х исходный раствор разводили перед использованием). Сенсорные поверхности активировали в течение 7 минут смесью NHS (0,05 M) и EDC (0,2 M). Антитела против Fc вводили во все четыре проточные кюветы в концентрации 25 мкг/мл в 10 mM ацетате натрия, pH 4,5 в течение семи минут. Этанолламин (1 M, pH 8,5) вводили в течение семи минут для блокирования любых оставшихся активированных групп. В среднем на каждой проточной кювете было иммобилизовано 12000 единиц ответа (RU) иммобилизованного антитела.

Эксперименты по кинетическому связыванию проводили при 25°C с использованием 1х буфера HBS-EP<sup>+</sup>. IL-2R $\alpha$ -Fc или IL-2R $\beta$ -Fc (Acro Biosystems, № по каталогу ILA-H5251, ILB-H5253) вводили на анти-Fc-поверхность в концентрациях 3-10 мкг/мл в течение 12 секунд при скорости потока 10 мкл/мин в проточные кюветы 2, 3 и 4, с последующей промывкой буфером в течение 30 секунд при той же скорости потока. Кинетическую характеристику конъюгированного или неконъюгированного альдеслейкина или его вариантов проводили в диапазоне концентраций от 1 нМ до 10 мкМ и одной инъекции без антигена. После захвата лиганда (IL-2R $\alpha$ -Fc или IL-2R $\beta$ -Fc) на поверхности анти-Fc, аналит (вариант IL-2) связывается в течение 180 секунд, после чего следует 600-секундная фаза диссоциации при скорости потока 50 мкл/мин. Между каждым циклом захвата лиганда и связывания аналита проводили регенерацию с использованием двух инъекций 10 mM глицина, pH 2,0, в течение 30 секунд при скорости 30 мкл/минуту, после чего осуществляли 30-секундную стадию промывки буфером. Данные оценивали с помощью программного обеспечения Biacore T200.

Аналогичные методы оценки выполняли на ForteBio Octet (Pall Life Sciences) и MASS-1 (Sierra Sensors), чтобы обеспечить более высокую пропускную способность измерений. Также оценивали поверхности против захвата белков человека (AHC) или стрептавидина (SA) в отношении захвата Fc-слитых или биотинилированных белков, соответственно.

#### ПРИМЕР 10

##### **Анализ Kit225 STAT5-luc**

Клеточная линия Т-лимфоцитов человека Kit225 (Hori et al., Blood 70:1069-1072 (1987)) была сконструирована с репортерной люциферазой, чувствительной к STAT5, с использованием вектора Promega pGL4. 52 luc2P/STAT5 RE/Hygro (GenBank, номер JX206457). Этот вектор содержит пять копий ответного элемента STAT5 (STAT5 RE), который управляет транскрипцией репортерного гена люциферазы luc2P. Для оценки эффективности молекул IL-2 клетки Kit225 STAT5luc высевали в количестве  $1 \times 10^4$  клеток на лунку и оставляли на ночь. Затем клетки Kit225 STAT5 luc обрабатывали серийными разведениями испытуемых образцов IL-2, инкубировали в течение шести часов, и после этого измеряли активацию STAT5 с использованием набора субстратов люциферазы BrightGLO (Promega).

#### ПРИМЕР 11

##### **Анализ димеризации PathHunter U2OS IL2RB/IL2RG**

Клетки U2OS IL2RB/IL2RG (DiscoverX, 93-0998C3) оттаивали и культивировали в полной среде DMEM/F-12 (Corning) с 100 ME пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина (Corning), 2 mM GlutaMax (Gibco),

10% терминоактивированной фетальной телячьей сывороткой (FBS) (Sigma). Для отбора добавляли дополнительно 250 мкг/мл гигромицина и 500 мкг/мл G418. За один день до обработки альдеслейкином или его вариантом высевали 25 мкл клеток при  $0,075 \times 10^6$  клеток/мл, всего 1875 клеток на лунку в полной культуральной среде, в стандартный белый 384-луночный планшет с покрытием ТС. В день анализа клетки обрабатывали 25 мкл серийных разведений альдеслейкина или образцов вариантов (1:8, серийные разведения исходной концентрации 1 мкМ). Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. Добавляли 30 мкл восстанавливающего реагента Beta-Glo (Promega) и инкубировали в течение 25 минут при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты считывали с помощью планшетного ридера Envision (PerkinElmer), и показания люминесценции преобразовывали в % относительного сигнала с использованием в качестве контроля клеток, обработанных 1 мкМ альдеслейкина. Данные обрабатывали нелинейным регрессионным анализом, используя log значения по сравнению с откликом, при переменном наклоне, с использованием уравнения соответствия с 4 параметрами согласно программному обеспечению GraphPad Prism. Данные выражали как % относительного сигнала по сравнению с дозой альдеслейкина или вариантов образцов в нМ.

#### ПРИМЕР 12

##### **Репортерный анализ GloResponse STAT5-luc2-CTLL-2**

Клетки GloResponse STAT5-luc2-CTLL-2 (Promega, CD2018B05) поддерживали в полной среде RPMI-1640 (Corning) с 100 МЕ пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина (Corning), 2 mM GlutaMax (Gibco), 20% терминоактивированной FBS (Sigma) и 10 нг/мл IL-2 (Peprotech). В день анализа клетки голодали по IL-2 в течение по меньшей мере 4 часов перед обработкой. Высевали 25 мкл клеток при  $0,075 \times 10^6$  клеток/мл, всего 1875 клеток на лунку в полной культуральной среде, в стандартный белый 384-луночный планшет с покрытием ТС. Клетки обрабатывали 25 мкл серийных разведений образцов альдеслейкина или вариантов (1:8, серийные разведения исходной концентрации 1 мкМ) и затем инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. Добавляли 30 мкл восстанавливающего реагента Bio-Glo (Promega) и инкубировали в течение 25 минут при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты считывали с помощью планшетного ридера Envision (PerkinElmer), и показания люминесценции преобразовывали в % относительного сигнала с использованием в качестве контроля клеток, обработанных 1 мкМ IL-2 дикого типа (альдеслейкин). Данные обрабатывали нелинейным регрессионным анализом, используя log значения по сравнению с откликом, при переменном наклоне, с использованием уравнения соответствия с 4 параметрами согласно программному обеспечению GraphPad Prism. Данные выражали как % относительного сигнала по сравнению с дозой образцов в нМ.

#### ПРИМЕР 13

##### **Анализ пролиферации клеток NK-92, M07-e и DERL-7**

Клетки NK-92 (IL2RABG, ATCC, CRL-2407), M07-e (IL2RBG, DSMZ) и DERL-7 (IL2RBG, DSMZ, ACC 524) поддерживали в полной среде RPMI-1640 (Corning) с 100 МЕ пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина (Corning), 2 mM GlutaMax (Gibco), 20% терминоактивированной FBS (Sigma) и 10 нг/мл IL-2 (Peprotech). В день анализа клетки голодали по IL-2 в течение по меньшей мере 4 часов перед обработкой. Высевали 25 мкл клеток при  $0,075 \times 10^6$  клеток/мл, всего 1875 клеток на лунку в полной культуральной среде, в стандартный белый 384-луночный планшет с покрытием ТС. Клетки обрабатывали 25 мкл серийных разведений образцов альдеслейкина или вариантов (1:8, серийные разведения исходной концентрации 1 мкМ) и затем инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. Добавляли 30 мкл восстанавливающего реагента

CellTiter-Glo (Promega) и инкубировали в течение 25 минут при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты считывали с помощью планшетного ридера Envision (PerkinElmer), и показания люминесценции преобразовывали в % относительного сигнала с использованием в качестве контроля клеток, обработанных 1 мкМ альдеслейкина. Данные обрабатывали нелинейным регрессионным анализом, используя log значения по сравнению с откликом, при переменном наклоне, с использованием уравнения соответствия с 4 параметрами согласно программному обеспечению GraphPad Prism. Данные выражали как % относительного сигнала по сравнению с дозой образцов в нМ.

#### ПРИМЕР 14

##### **Активность вариантов альдеслейкина in vivo**

Самок мышей C57BL/6 в возрасте от восьми до десяти недель анестезировали изофлураном, и им подкожно имплантировали  $1 \times 10^6$  клеток B16F10 в правый задний бок. Рандомизацию и начало лечения ( $n = 8$  в группе) начинали при развитии опухоли (средний размер опухоли приблизительно 125 или 130 мм<sup>3</sup>). Массу тела и размер опухоли контролировали 3 раза в неделю до тех пор, пока средний размер для группы не составит приблизительно 1500 мм<sup>3</sup>. Для оценки эффективности одного агента мышам C57BL/6, имеющим развившиеся опухоли B16F10 (меланома), вводили внутривенно (в/в) носитель и указанную дозу CON1 или CON2 каждые семь дней в виде 2 доз (q7dx2).

#### ПРИМЕР 15

##### **Фенотипирование иммунных клеток in vivo**

Мышам C57BL/6 без опухоли или мышам C57BL/6 с опухолью B16F10 (как описано выше) внутривенно однократно с введением носителя вводили указанные дозы CON1 или CON2. У животных с опухолью B16F10 опухоли ( $n =$  пять на группу) брали через 3, 7 или 10 дней после начала лечения, и их подвергали механическому и ферментативному расщеплению для анализа подтипов иммунных клеток с помощью проточной цитометрии. У мышей без опухолей брали селезенку и периферическую кровь ( $n =$  четыре на группу) для анализа через 7 дней после лечения. Рассчитывали количество лимфоцитарных клеток или инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), и соотношение Т-эффекторного фенотипа к Т-регуляторному фенотипу ( $T_{\text{eff}}:T_{\text{reg}}$ ). В соответствии с прогнозом, лекарственные средства-кандидаты, которые индуцируют повышенное количество TIL и более высокое соотношение  $T_{\text{eff}}:T_{\text{reg}}$ , будут обеспечивать превосходный терапевтический ответ на rhIL-2, и их отбирали для дальнейших исследований.

#### ПРИМЕР 16

##### **Фармакокинетическая (ФК) оценка вариантов альдеслейкина in vivo**

Фармакокинетический (ФК) профиль вариантов IL-2 оценивали у мышей C57BL/6, не несущих опухоли. Мыши получали однократную болюсную внутривенную инъекцию 0,8 мг/кг CON1, CON2 или альдеслейкина ( $n=3$  на время отбора проб). Кровь собирали в пробирки с литием и гепарином, и плазму собирали центрифугированием. Все образцы хранили до анализа при -80°C. Образцы обрабатывали и анализировали с помощью анализа ELISA для определения в плазме концентрации различных вариантов видов IL-2. Анализ параметров ФК проводили с использованием программного обеспечения Phoenix WinNonLin. В соответствии с прогнозом, виды пегилированного IL-2 с молекулярной массой 30 кДа с увеличенным периодом полужизни (T1/2) и экспозицией (увеличенная площадь под кривой, AUC) по

сравнению с альдеслейкином обладают большей терапевтической ценностью, и их отбирали для дальнейших исследований.

#### ПРИМЕР 17

##### Фармакология *in vitro*

Характеристика CON1, полученная *in vitro*, подтверждает смещенный профиль связывания с IL-2R $\beta\gamma_c$  по сравнению с альдеслейкином и CON2. CON1 показал отсутствие связывания с IL-2R $\alpha$  (мышь, крыса, резус, яванский макак, человек) и связывания с IL-2R $\beta$  (человек, яванский макака, макака-резус) в пределах шестикратного избытка альдеслейкина при оценке с помощью анализа SPR. В клеточных линиях, экспрессирующих IL-2R $\alpha$ , биоактивность CON1 снижена в 100-5000 раз в зависимости от анализа. В клеточной линии DERL-7 человека экспрессия IL-2R $\alpha$  отсутствует, а активности CON1 и CON2 находятся в пределах 2-кратных значений по отношению друг к другу. Дальнейшее сравнение относительного влияния пегилирования и мутеинов проводили с использованием клеточной линии с нокаутом IL-2R $\alpha$ , результаты показали, что в отсутствие IL-2R $\alpha$  мутеины в CON1 не влияли на эффективность. Эксперименты с PBMC человека, выполненные с измерением активации pSTAT5 и при сравнении с CON1, показали, что CON1 индуцирует большее снижение активности в клетках T<sub>reg</sub> (экспрессирующих IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ ), чем CON2 с несмещенным профилем связывания, в то время как аналогичное снижение активности наблюдается для CON1 и CON2 на CTL CD8 (экспрессирующих IL-2R $\beta\gamma_c$ ).

##### Определение аффинности связывания CON1 с IL-2-R $\alpha$ и IL-2-R $\beta$ человека, яванского макака, макаки-резуса, мыши и крысы с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Для определения моновалентной аффинности пегилированных вариантов альдеслейкина в отношении меченных полигистидином или Fc-меченых рецепторов IL-2 использовали анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе Biacore T200 (GE Healthcare). Использовали программное обеспечение Biacore T200 для анализа результатов каждой серии титрования в модели связывания 1:1 или для оценки стационарной аффинности. Константы скорости ассоциации ( $k_{on}$ , M<sup>-1</sup> c<sup>-1</sup>) и диссоциации ( $k_{off}$ , c<sup>-1</sup>) определяли для каждой серии титрований и использовали для расчета константы диссоциации  $KD = k_{off}/k_{on}$  для каждого образца по сравнению с каждым рецептором. Значения  $k_{off}/k_{on}$  здесь не указаны.

Для измерения аффинности CON1 и альдеслейкина к субъединицам IL-2R рецепторы захватывают либо на поверхности антигистидинового, либо на анти-huFc антитела. Аффинность альдеслейкина ко всем видам IL-2R $\alpha$  составляет от 9,9 до 29 нМ, в то время как CON1 не проявляет заметного связывания ни с одним IL-2R $\alpha$  при анализе при 2 мкМ (Таблица 10). Альдеслейкин и CON1 не проявляют заметного связывания с мышинным и крысиным IL-2-R $\beta$ . CON1 имеет в шесть раз более низкую аффинность к IL-2-R $\beta$  человека и яванского макака/резуса, чем альдеслейкин. И альдеслейкин, и CON1 имеют аффинность к IL-2-R $\beta$  человека и яванского макака/резуса, которая находится в пределах 1,5-кратного значения при 0,73 мкМ, 1,1 мкМ, 4,4 мкМ и 5,4 мкМ, соответственно (Таблица 10).

**Таблица 10**

Оценка аффинности связывания альдеслейкина и CON1 с IL-2-R $\alpha$  и IL-2-R $\beta$  человека, яванского макака, резуса, мыши и крысы с помощью анализа SPR.<sup>1</sup>

Субъ-единица	Вид	Метка	Альдеслейкин		CON1	
			KD (M)	KD/KD	KD (M)	KD/KD

IL-2P				(человек)		(человек)
альфа	Человек	Fc	1,8E-08	1,0	NB <sup>2</sup>	n/a <sup>3</sup>
	Яванский макак		1,2E-08	0,6	NB	n/a
	Резус		1,3E-08	0,7	NB	n/a
	Человек	His	1,6E-08	1,0	NB	n/a
	Яванский макак		9,9E-09	0,6	NB	n/a
	Мышь		1,2E-08	0,8	NB	n/a
	Крыса		2,9E-08	1,8	NB	n/a
бета	Человек	His	7,3E-07	1,0	4,4E-06	1,0
	Яванский макак /резус <sup>4</sup>		1,1E-06	1,5	5,4E-06	1,2
	Мышь		NB	n/a	NB	n/a
	Крыса		NB	n/a	NB	n/a
<p>1. Количество прогонов для всех условий = 2;</p> <p>2. NB (связывание не наблюдается при 2 мкМ CON1);</p> <p>3. n/a (не применимо);</p> <p>4. Имеется 100%-ая идентичность аминокислот между внеклеточной областью IL-2Rβ яванского макака и макаки-резус.</p>						

### CON1 показал значительное снижение активности на клеточных линиях, экспрессирующих IL-2Rα

Активность CON1 и CON2 для активации пути STAT5 изучали в репортерных клетках мыши CTLL2-STAT5 (экспрессирующих мышинный IL-2Rαβγ<sub>c</sub>), а также в репортерных клетках человека Kit225-STAT5 (экспрессирующих IL-2Rαβγ<sub>c</sub> человека). Активность CON1 и CON2 в отношении стимуляции клеточной пролиферации также оценивали в клетках NK92 человека (экспрессирующих IL-2Rαβγ) и в клетках DERL-7 человека (экспрессирующих IL-2Rβγ<sub>c</sub>). Репрезентативные данные трех независимых экспериментов показаны на Фиг. 3. CON1 со смещенной активностью к IL-2R βγ<sub>c</sub>, показал большее снижение активности в клетках, экспрессирующих IL-2Rαβγ<sub>c</sub> (более чем в 5000 раз в репортерных клетках CTLL2-STAT5, более чем в 400 раз в репортерных клетках Kit225-STAT5 и более чем в 400 раз в репортерных клетках Kit225-STAT5) и более чем в 100 раз в клетках NK92, по сравнению с альдеслейкином, чем CON2 с несмещенным профилем связывания (менее чем в 5 раз), в то время как аналогичное снижение активности наблюдалось как для CON1 (в около 20 раз), так и для CON2 (в около 40 раз) в клетках, экспрессирующих IL-2Rβγ<sub>c</sub> (клетки DERL-7) (Таблица 11).

Таблица 11					
Варианты SP9849 индуцируют активацию pSTAT5 и активируют пролиферацию клеток					
Образец	Описание образца	STAT5-CTLL2		Kit225-STAT5	
		EC50	EC50	EC50	EC50

		(нМ)	(кратность)	(нМ)	(кратность)
Альдеслейкин	Альдеслейкин	0,011	1	0,001	1
CON2	Ald_S4pAMF (PEG1)	0,04	4	0,002	2
CON1	Ald_S4pAMF (PEG1)/R37A/F41K	57,4	5305	0,45	437
Образец	Образец Описание	NK-92		DERL-7	
		EC50 (нМ)	EC50 (кратность)	EC50 (нМ)	EC50 (кратность)
Альдеслейкин	Альдеслейкин	0,006	1	0,044	1
CON2	Ald_S4pAMF (PEG1)	0,01	2	1,69	38
CON1	Ald_S4pAMF (PEG1)/R37A/F41K	0,68	117	0,73	17

### CON1 улучшает относительную активность CTL по сравнению с T<sub>рег</sub>

Активность CON1 и CON2 для активации пути STAT5 в первичных клетках T<sub>рег</sub> человека (экспрессирующих IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ ) и CD8<sup>+</sup> CTL (экспрессирующих IL-2R $\gamma_c$ ) оценивали в PBMC, выделенных от разных доноров-людей. Как показано на Фиг. 4А, для человека-донора № 1 CON1 со смещенной активностью к IL-2R $\beta\gamma_c$ , индуцировал большее снижение активности в клетках T<sub>рег</sub> (в около 3500 раз по сравнению с альдеслейкином), чем CON2 с несмещенным профилем связывания (в около 10-10 раз по сравнению с альдеслейкином), в то время как аналогичное снижение активности наблюдалось как для CON1, так и для CON2 на CD8<sup>+</sup> CTL (в около 20 раз по сравнению с альдеслейкином). Разница в активности CON1 в отношении Т-клеток и CTL привела к повышению относительной активности CTL/T<sub>рег</sub> клеток (относительная величина EC50 равняется около шести для CON1, по сравнению с величиной в около 900 раз для альдеслейкина, и в около 1200 раз для CON2). Как показано на Фиг. 4В, аналогичный результат наблюдали для CON1 и CON2 на клетках T<sub>рег</sub> и CD8<sup>+</sup> CTL от человека-донора № 2 (Таблица 12).

<b>Таблица 12</b>					
Варианты альдеслейкина индуцируют активацию pSTAT5 в PBMC человека-донора					
Образец	Человек-донор №1				
	EC50 T <sub>рег</sub> клетки		EC50 CTL		CTL по сравнению с T <sub>рег</sub> (сдвиг активности)
	нМ	Кратность изменения по сравнению с wt	нМ	Кратность изменения по сравнению с wt	
Альдеслейкин	0,003	1	2,83	1	867
CON2	0,039	12	49,4	17	1252
CON1	11,8	3623	71,9	25	6
Образец	Человек-донор № 2				
	EC50 T <sub>рег</sub> клетки		EC50 CTL		CTL по сравнению с T <sub>рег</sub> (сдвиг активности)
	нМ	Кратность изменения по сравнению с wt	нМ	Кратность изменения по сравнению с wt	



Альдеслейкин	0,003	1	0,97	1	312
CON2	0,041	13	23,2	24	570
CON1	7,29	2233	43,0	45	6
wt = активность альдеслейкина					

**CON1** проявляет значительно сниженную активность в отношении клеток человека, экспрессирующих IL-2R $\alpha$ , в то время как в отсутствие IL-2R $\alpha$  мутены со смещенной активностью к IL-2 $\beta\gamma_c$  не влияют на активность

Активность CON2, MUT1 (Ald\_S4pAMF/R37A/F41K) и CON1 для активации пути STAT5 оценивали в клеточной линии Т-лимфоцитов человека Kit225 (экспрессирующих IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ ), а также в клеточной линии Kit225 с нокаутом CD25 (экспрессирующих только IL-2R $\beta\gamma_c$ ) с использованием технологии редактирования генома CRISPR-Cas9. Испытываемые образцы выбирали таким образом, чтобы они представляли ключевые свойства сконструированного IL-2: CON2, обладающий активностью к IL-2 дикого типа; MUT1, который имеет смещение к IL-2 $\beta\gamma_c$  без пегилирования; и CON1, который представляет мутены со смещенной активностью к IL-2 $\beta\gamma_c$ , с пегилированием.

В клетках Kit225, экспрессирующих IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ , мутены CON1 и MUT1 со смещенной активностью к IL-2R $\beta\gamma_c$ , показали большее снижение активности (соответственно в 190 и 5109 раз ниже), чем CON2 с несмещенным профилем связывания (в 4 раза ниже) по сравнению с альдеслейкином, который обладает активностью IL-2 дикого типа. В клетках Kit225 с нокаутом CD25, экспрессирующих только IL-2R $\beta\gamma_c$ , снижение активности было в 24 раза ниже как для CON2, так и для CON1 по сравнению с альдеслейкином. Активность MUT1 была аналогична активности альдеслейкина. Как показано на Фиг. 5А и Фиг. 5В, сконструированный Т-клеточный лимфоцит человека Kit225 показал влияние CD25-управляемой передачи сигналов на эффективность передачи сигналов STAT5, а нокаут CD25 подчеркивает, что мутации R37A/F41K не влияют на передачу сигналов IL-2R- $\beta\gamma_c$ . На Фиг. 5А показано, что клетки Kit225, экспрессирующие IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$  и репортер STAT5-люциферазы, мутены MUT1 и CON1 со смещенной активностью к IL-2R $\gamma_c$ , демонстрируют большее снижение активности (в 190 раз и в 5109 раз ниже), чем CON2 с несмещенным профилем связывания (в 4 раза ниже) по сравнению с альдеслейкином. На Фиг. 5В показано, что в отношении нокаутированных по CD25 клетках Kit225, экспрессирующих только IL-2R $\beta\gamma_c$ , MUT1 проявляет активность, сходную с активностью альдеслейкина, в то время как CON1 проявляет в 24 раза более низкую активность, и она аналогична активности CON2. В отсутствие CD25 (IL-2R $\alpha$ ) мутены со смещенной активностью к IL-2 $\beta\gamma_c$ , не влияют на активность.

#### ПРИМЕР 18

##### Фармакология *in vivo*

Имунофенотипирование периферической крови у мышей показало, что CON1 увеличивает CD8<sup>+</sup>, T<sub>eff</sub> памяти и популяции NK, что приводит к увеличению соотношения CD8<sup>+</sup> T<sub>eff</sub>/T<sub>reg</sub>. Пегилирование резко улучшает фармакокинетический профиль CON1 у мышей ( $t_{1/2}$  = 10 часов) по сравнению с альдеслейкином ( $t_{1/2}$  = 2 часам). CON1 показал, что он ингибирует рост опухоли (TGI) при применении его в качестве монотерапии на сингенной мышшиной модели B16F0, что приводит к 47% TGI. CON2 показал улучшенную эффективность (81% TGI); однако CON1 лучше переносился с незначительной потерей массы тела или без нее при эквивалентной дозе, равной 5 мг/кг. Фармакодинамические эффекты CON1 на подтипы иммунных клеток оценивали в опухолях B16F10. CON1 показал увеличение соотношения CD8/T<sub>reg</sub> в опухоли; однако CON2

показал большую величину и продолжительность ответа, что согласуется с большим ингибированием роста опухоли, наблюдаемым для CON2. Большее увеличение  $CD8^+ T_{eff}/T_{reg}$  в случае CON2 по сравнению с CON1 в микроокружении опухоли может быть отчасти связано с видовыми различиями в аффинности связывания IL-2R $\alpha$  у грызунов. CON1 и CON2 показали практически идентичную кинетику фосфорилирования pSTAT5 после однократного введения наивным мышам, и пролонгированный профиль активации pSTAT5, сравнимый с аналогом NKTR-214 5PEG в  $CD8^+$  и NK-клетках, при этом 5PEG показал увеличенную продолжительность ответа на CD4.

**Лечение мышей с использованием CON1 привело к увеличению популяций  $CD8^+$ ,  $T_{eff}$  памяти и NK-клеток, а также к увеличению соотношения  $CD8^+/T_{reg}$  в периферической крови**

Активность CON1 и CON2 *in vivo* по стимуляции иммунных клеток в селезенке и периферической крови (PB) оценивали на самках мышей C57BL/6 при введении однократной внутривенной дозы 3 мг/кг для CON2 и 10 мг/кг для CON1 (выбор дозы основан на эффективности *in vivo*). Через семь дней после внутривенного введения выделяли иммунные клетки, и их окрашивали антителами для мечения различных популяций иммунных клеток. По сравнению с альдеслейкином, лечение с использованием смещенного к IL-2R $\beta$ <sub>c</sub> CON1 значительно увеличило клеточную популяцию (в % от общего количества иммунных клеток) клеток  $CD8^+$ ,  $T_{eff}$  памяти и NK-клеток, что привело к увеличению соотношения  $CD8^+/T_{reg}$ . Подобные результаты наблюдались в PB животных, получавших CON1. Лечение с использованием CON1 показало лишь незначительное увеличение клеточной популяции в  $CD8^+$  T-клеток и клеток памяти  $T_{eff}$ , что привело к небольшому увеличению соотношения  $CD8^+/T_{reg}$  (Фиг. 6). Как показано на Фиг. 6, внутривенное введение однократной дозы CON1 в дозе 10 мг/кг в течение семи дней у мышей значительно увеличивало %  $CD8^+$ ,  $T_{eff}$  памяти и NK-клеток из селезенки и PB, что приводило к увеличению соотношения  $CD8^+/T_{reg}$ .

**Фармакокинетический профиль CON1 у мышей C57BL/6**

Фармакокинетический профиль CON1 оценивали по уровням общих антител после однократного введения дозы 0,8 мг/кг мышам C57BL/6, не имеющим опухоли. Образцы плазмы собирали в несколько моментов времени в пределах семи дней для комплексного фармакокинетического анализа. Профили средней концентрации в плазме вариантов IL-2 CON1, CON2 и альдеслейкина показаны на Фиг.7. Фармакокинетический анализ показал, что варианты альдеслейкина, CON1 и CON2, оба из которых конъюгированы с невысвобождаемым 30 кДа ПЭГ, имеют более длительный период полужизни  $t_{1/2}$ , более низкий клиренс и более высокую экспозицию по сравнению с альдеслейкином, имеющим профиль IL-2 дикого типа (Фиг. 7 и Таблица 13). Все три молекулы продемонстрировали сопоставимые фармакокинетические профили по меньшей мере в двух независимых экспериментах. Следует также отметить, что репрезентативный набор данных по альдеслейкину из другого исследования был выбран для сравнения с вариантами альдеслейкина CON1 и CON2. Предельные значения  $t_{1/2}$  для альдеслейкина являются оценкой, основанной на двух последних временных точках.

Как показано на Фиг.7, CON1 и CON2 имеют расширенный фармакокинетический профиль по сравнению с альдеслейкином.

**Таблица 13**

Обобщенные фармакокинетические параметры для альдеслейкина и его вариантов у мышей C57BL/6

Лечение	Предел-ные значения $t_{1/2}$ (ч)	$C_0$ (нг/мл)	$C_{max} \pm SE$ (нг/мл)	$AUC_{0-last} \pm SE$ (день/нг/мл)	$AUC_{0-inf}$ (ч/нг/мл)	Клиренс (мл/час/кг)	$V_{ss}$ (мл/кг)
0,8 мг/кг CON1	10,0	7970	7620 $\pm$ 320	71900 $\pm$ 1800	72100	11,1	73,9
0,8 мг/кг CON2	4,24	9980	9520 $\pm$ 700	83600 $\pm$ 4200	83700	9,56	47,1
0,8 мг/кг альдес-лейкина	2,08	734	276 $\pm$ 18	253 $\pm$ 10	254	3150	1660

#### **Зависимость дозы CON1 и ответа в сингенной мышшиной модели B16F10**

Взаимосвязь доза-ответ для CON1 оценивали в сингенной модели опухоли мышшиной меланомы B16F10. Мышей, несущих установленные опухоли B16F10 (около 125 мм<sup>3</sup>), обрабатывали дозами 5, 7 и 10 мг/кг CON1 и 5 мг/кг CON2 (q7dx2: каждые 7 дней, две инъекции). Лечение дозой 5 мг/кг CON1 приводило к значительной эффективности (47% TGI,  $p = 0,0085$ ) по сравнению с контрольным носителем (Фиг. 8A). Активность стабилизировалась при дозе 5 мг/кг, что указывает на отсутствие зависимости от дозы. Эквивалентная доза 5 мг/кг CON2 показала улучшенную эффективность по сравнению с CON1 (81% TGI против 47%, соответственно), из чего следует, что связывание IL-2R $\alpha$  способствует эффективности (Фиг. 8A). Однако CON1 переносился лучше, чем CON2, с небольшой потерей массы тела или без нее при дозе 5 мг/кг (Фиг. 8B). Как показано на Фиг. 8A и 8B, CON1 проявляет значительную противоопухолевую активность в сингенной мышшиной модели опухоли B16F10 и хорошо переносится.

#### **Эффективность CON1 в сингенной мышшиной модели B16F10**

Эффективность CON1 оценивали в сингенной модели опухоли мышшиной меланомы B16F10. Мышей, несущих установленные опухоли B16F10 (около 130 мм<sup>3</sup>), обрабатывали дозами 5 мг/кг CON1 (q7dx2). В соответствии с предыдущим исследованием, доза 5 мг/кг CON1 значительно ингибировала рост опухоли B16F10 по сравнению с контрольным носителем (45% TGI,  $p = 0,0197$ , Фиг. 9A) и вызывала минимальную потерю массы тела (Фиг. 9B). Как показано на Фиг. 9A и 9B, CON1 проявляет устойчивую эффективность в сингенной мышшиной модели опухоли B16F10 и хорошо переносится.

#### **Фармакодинамические (PD) эффекты CON1 на опухоли B16F10**

Эффекты действия PD на подтипы иммунных клеток при применении CON1 оценивали в опухолях B16F10. Мышей, несущих установленные опухоли B16F10 (около 125 мм<sup>3</sup>), обрабатывали однократной дозой 5 мг/кг CON1 или CON2. Для изучения продолжительных иммунных ответов в микроокружении опухоли, анализ методом проточной цитометрии проводили на опухолях, полученных на 3, 7 и 10 день после лечения. Исследование иммунных инфильтратов показало, что частота (процент живых клеток) CD8<sup>+</sup> Т-клеток и количество CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих гранзим В (GzmZ B<sup>+</sup>), было увеличено у животных, получавших CON1 и CON2 (Фиг. 10A и Фиг. 10B). Однако не наблюдали заметных различий в кинетике инфильтрации и активации Т-клеток. CON1 индуцировал раннее увеличение частоты Т-клеток CD8 и GzmZ B<sup>+</sup> CD8 Т-клеток на третий день, в то время как CON2 показал отсроченную активацию, которая достигала пика на 7-й день и снижалась на 10-й день (Фиг. 10A и 10B). Как CON1, так и CON2 значительно увеличивали частоту общих

НК-клеток, НКТ-клеток и НКТ-клеток, экспрессирующих GmZ B<sup>+</sup>, на третий день по сравнению с группой, получавшей носитель (Фиг. 10E, Фиг. 10F и Фиг. 10G). Показатели для этих популяций к седьмому дню уменьшились до тех же уровней, что и у группы, получавшей контрольный носитель, и они оставались низкими до 10-го дня (Фиг. 10E, Фиг. 10F и Фиг. 10G). Также наблюдалась тенденция к более низким или схожим уровням CD4 клеток по сравнению с группой, получавшей носитель, после получения животными CON1 и CON2, за исключением повышенных уровней для CON2 на 10-й день (Фиг. 10C).

Дальнейший анализ популяции клеток CD4 показал, что и CON1, и CON2 способствовали значительному уменьшению T<sub>reg</sub>-клеток на седьмой день (по сравнению с третьим днем) с последующим восстановлением на 10-й день (Фиг. 10D). Увеличение количества CD8<sup>+</sup> T-клеток или НКТ-клеток и снижение количества T<sub>reg</sub>-клеток приводило к увеличению соотношений этих эффекторных клеток в опухоли. Увеличение соотношений CD8<sup>+</sup> T<sub>eff</sub>/T<sub>reg</sub> и НКТ/T<sub>reg</sub> наблюдали на третий день в группе, получавшей CON1, тогда как группа, получавшая CON2, показала самое высокое увеличение соотношений CD8<sup>+</sup> T<sub>eff</sub>/T<sub>reg</sub> и НКТ/T<sub>reg</sub> соответственно на седьмой и третий день (Фиг. 10H и Фиг. 10I).

Эти результаты показывают, что, хотя и CON1, и CON2 являются иммунологически активными, лечение с использованием CON2 приводило к большему количеству, устойчивой продолжительности и благоприятной кинетике иммунных клеток в микроокружении опухоли. Этот иммунный профиль подтверждает немного повышенную противоопухолевую эффективность CON2 по сравнению с CON1 (Фиг. 10J), что согласуется с тенденциями, наблюдаемыми в предыдущих исследованиях. Кроме того, следует отметить, что экспансию CD8<sup>+</sup> T-клеток и увеличение отношения CD8/T<sub>reg</sub>, индуцированные действием CON2, наблюдаемые на седьмой день, дополняет еженедельный режим дозирования, обычно использовавшийся в предыдущих исследованиях эффективности, что может дополнительно способствовать его повышенной эффективности в модели B16F10. На Фиг. 10A-J показано, что вариант IL-2 CON1 индуцирует увеличение количества CD8<sup>+</sup> T-клеток, НК и НКТ-клеток в микроокружении опухоли B16F10.

#### **Динамика фосфорилирования STAT5 у наивных мышей после обработки CON1**

Активность по индукции фосфорилирования STAT5 при использовании CON2, CON1 и аналога НКTR-214 «5PEG» оценивали у наивных мышей C57BL/6 в различные моменты времени (1 час, 1, 3, 5, 7 и 10 дней после инъекции) как показано на Фиг. 11. CON2 и CON1 показали очень схожую кинетику активности pSTAT5 *in vivo* в эти моменты времени, когда почти 100% НК- и CD8 T-клеток в крови имели pSTAT5 в течение 1 часа после инъекции (Фиг. 11). Потеря активности pSTAT5 происходила в течение времени до 72 часов, когда pSTAT5 больше не обнаруживали в НК- или CD8<sup>+</sup> T-клетках. В CD4 T-клетках CON2 и CON1 показали более медленную индукцию pSTAT5 (пики через 24 часа после инъекции) с более низкой частотой (около 40%) pSTAT5<sup>+</sup> CD4 T-клеток. Инверсия pSTAT5 в CD4 T-клетках также происходила с более медленной кинетикой по сравнению с НК или CD8<sup>+</sup> T-клетками, где была обнаружена полная потеря pSTAT5 на 120-й день после инъекции. 5PEG показал в целом более медленную кинетику достижения пика pSTAT5 через 24 (НК или CD8<sup>+</sup>) или 48 (CD4) часов с более низкой максимальной активацией pSTAT5. В то время как CON2 и CON1 показали почти 100% pSTAT5<sup>+</sup> популяции в НК или CD8<sup>+</sup> T-клетках, аналог IL-2 5PEG никогда не достигал аналогичной величины, что показано на Фиг. 11. Таким образом, CON2 и CON1 показали, что они обеспечивают быстрое достижение и устойчивую активность pSTAT5 *in vivo* в крови наивных мышей, по сравнению с 5PEG.

#### **ПРИМЕР 19**

### Фармакокинетическое (ФК) и фармакодинамическое (ФД) исследование повторных доз CON1 и CON2 у нечеловекообразных приматов (NHP)

У онкологических больных лечение с использованием IL-2 связано с синдромом сосудистой утечки (VLS), который коррелировал с заметным увеличением циркулирующих эозинофилов. Результаты, полученные у NHP показали дозозависимое увеличение количества эозинофилов после введения CON1 и CON2. Однако при равных дозах 0,3 мг/кг CON2 привел к наибольшей величине эозинофилии по сравнению с CON1 (Фиг. 12A и Фиг. 12B), что свидетельствует о потенциальном преимуществе CON1 в отношении безопасности.

Как и в случае с препаратами на основе IL-2, введение CON1 и CON2 приводило к эффектам ФД, которые включали быстрое снижение (маргинацию) общего количества периферических лимфоцитов в течение 48 часов после введения дозы с последующим сопутствующим увеличением количества лимфоцитов (дни 4-8, Фиг. 12C и Фиг. 12D). Эти циклические тенденции наблюдали для обоих препаратов после первой и второй дозы, и они свидетельствовали об обратимости к исходным уровням к концу жизни. Эти данные свидетельствуют о большей связанной с CON1 величине увеличения лимфоцитов по сравнению с CON1 при одинаковых дозах 0,3 мг/кг.

Для характеристики различных представляющих интерес популяций лимфоцитов и их соотношений после введения CON1 и CON2 использовали анализ проточной цитометрии. В соответствии с общими тенденциями, наблюдаемыми для лимфоцитов, оба препарата вызывали быстрое снижение с последующим увеличением количества цитотоксических Т-клеток [CTL; CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>] (Фиг. 12E и Фиг. 12F), регуляторных Т-клеток [CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/CD127<sup>low</sup>] (Фиг. 12G и Фиг. 12H) и натуральных клеток-киллеров (NK-клеток) [CD3<sup>-</sup>/CD159<sup>+</sup>] (Фиг. 12I и Фиг. 12J). По сравнению с CON2, для CON1 при дозе  $\geq 0,3$  мг/кг отмечена большая величина размножения NK-клеток и большее значение соотношений CD8<sup>+</sup>T<sub>reg</sub> (Фиг. 13A и 13B).

В совокупности данные и результаты, полученные у NHP, предполагают лучший фармакодинамический профиль для CON1 (постоянно смещенный к  $\beta\gamma_c$ ) по сравнению с профилем CON2 (без смещения к  $\beta\gamma_c$ ).

Сайт-специфическое пэгилирование с помощью одного невысвобождаемого ПЭГ 30 кДа в рAMF, включенного в положение S4, обеспечивает значительное увеличение времени полужизни у мышей (10 часов) и NHP (17 часов). Постоянное смещение к  $\beta\gamma_c$  за счет мутации R37A/F41K устраняет связывание с субъединицей IL-2R $\alpha$  и снижает активность, обусловленную  $\alpha\beta\gamma_c$ , в 100–5000 раз в клеточных анализах и в 2000–3000 раз в РВМС.

#### ПРИМЕР 20

В этом примере представлены данные и результаты, полученные в сингенной мышинной модели опухоли CT26, которые показывают, что эффективность CON1 в отношении ингибирования роста опухоли (TGI) может быть повышена путем введения его в комбинации с антителом против мышинного PD-1, и что CON1 хорошо переносится в дозах 5 мг/кг и 10 мг/кг в монотерапии или в комбинации с антителом против мышинного PD1.

#### *Мыши*

Мыши дикого типа C57BL/6J были получены из Jackson laboratories. Все процедуры для животных были одобрены Институциональным комитетом MRL по уходу за животными и их использованию в

соответствии с рекомендациями Ассоциации по оценке и аккредитации лабораторий по исследованию на животных. Исследование проводилось компанией HDBiosciences Inc. (6122 Nancy Ridge Drive, Сан-Диего, Калифорния).

*Введение опухолевых клеток и лечение*

Для экспериментов с сингенной опухолью мышам C57BL/6J в возрасте от 8 до 12 недель подкожно (п/к) вводили в бок  $3 \times 10^5$  клеток СТ26. Диаметр опухоли измеряли электронным штангенциркулем, и объем опухоли рассчитывали по формуле: длина x ширина x ширина x 1/2. Лечение начинали, когда опухоль достигала приблизительно 100 мм<sup>3</sup>. Лечение проводили в соответствии с дозами, схемой введения и способом введения, как показано в Таблице 14.

Таблица 14						
Группа	Лечение в группе	Доза	Схема дозирования	РОА	N	День 15: TGI%/CR
1	Изотипический контроль + носитель	10 мг/кг	Д 0, 5, 10, 15	IP	10	
		-	Д 0, 7, 14	IV		
2	Изотипический контроль + Альдеслейкин	1 мг/кг	(BID 5Д + 2 пауза) x 2	IP	10	68% ICR
3	muDX400 + носитель	10 мг/кг	Д 0, 5, 10, 15	IP	10	25%
			Д 0, 7, 14	IV		
4	mDX400 + Альдеслейкин	10 мг/кг	Д 0, 5, 10, 15	IP	10	85% ICR
		1 мг/кг	(BID 5Д + 2 пауза) x 2	IP		
5	Изотипический контроль + CON1	10 мг/кг	Д 0, 5, 10, 15	IP	10	24%
		5 мг/кг	Д 0, 7, 14	IV		
6	Изотипический контроль + CON1	10 мг/кг	Д 0, 5, 10, 15	IP	10	49%
		10 мг/кг	Д 0, 7, 14	IV		
7	muDX400+ CON1	10 мг/кг	Д 0, 5, 10, 15	IP	10	45%
		5 мг/кг	Д 0, 7, 14	IV		
8	muDX400+ CON1	10 мг/кг	Д 0, 5, 10, 15	IP	10	69% IPR
		10 мг/кг	Д 0, 7, 14	IV		
TGI = ингибирование роста опухоли; CR = полный ответ; PR= частичный ответ; РОА = путь введения; N = количество мышей в группе; IP = внутрибрюшинная инъекция; IV = внутривенная инъекция; BID = два раза в день; Д = день						

Антитело mDX400против мышиноного PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие аминокислотные последовательности, раскрытые в международной патентной заявке № WO 2020185722 (см. в ней соответственно: SEQ ID №№ 63 и 64), содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Для контроля потенциальных эффектов изотипа в качестве контроля изотипа IgG1

использовали анти-AD5-Нехон антитело мыши IgG1 (D265A). В качестве носителя для доз использовали 20 mM NaOAc, буфер pH 5,5.

Альдеслейкин, введенный в дозе 1 мг/кг, показал эффективность в отношении ингибирования роста опухоли (TGI) аналогичную ранее наблюдаемым эффектам (ранее наблюдаемые 69% против 68% в этом примере) (Фиг. 16A). Когда альдеслейкин вводили в дозе 1 мг/кг в комбинации с mDX400 в дозе 10 мг/кг, эффективность альдеслейкина в отношении TGI повышалась, достигая 85% TGI при комбинированном лечении по сравнению с 69% при монотерапии (Фиг. 16A).

CON1 в дозе 5 мг/кг показал эффективность в отношении TGI, которая усиливалась, когда CON1 вводили в дозе 5 мг/кг в комбинации с mDX400 в дозе 10 мг/кг, приводя к 45% TGI при комбинированном лечении по сравнению с 24% при монотерапии CON1. (Фиг. 16B). Эффективность CON1 в дозе 10 мг/кг показала эффективность в отношении TGI, которая была повышена, когда CON1 вводили в дозе 10 мг/кг в комбинации с mDX400 в дозе 10 мг/кг, приводя к 49% TGI при комбинированном лечении, по сравнению с 45% при монотерапии CON1 (Фиг. 16C).

На Фиг. 17A-17B показаны индивидуальные объемы опухоли у животных для каждой группы лечения. Полные ответы (CR) до дня 36 представлены для реагирующих на лечение групп. На Фиг. 17A-17B показаны средний объем опухоли и стандартная ошибка среднего значения для каждой группы лечения (начальное количество: n = 10 в группе). Величины объема опухолей у животных, которые были исключены из исследования из-за больших объемов опухолей, включали в среднее значение до тех пор, пока не было проведено последнее измерение для этой группы лечения.

На Фиг. 18A-18B показано изменение массы тела в ходе экспериментов. Данные показывают, что CON1 хорошо переносился в дозах 5 и 10 мг/кг как в виде монотерапии, так и в комбинации с mDX400.

#### *Заключение*

Мышиная модель сингенной опухоли CT26 была использована для демонстрации преимуществ сочетания лечения IL-2 (NKTR-214) с блокадой контрольных точек с целью улучшения ингибирования роста опухоли (TGI) (Charuch et al, Clin Cancer Res; 22(3) 2016). Альдеслейкин вводили двумя курсами в дозе 1 мг/кг два раза в день (BID; дважды в сутки) в течение пяти дней отдельно или в комбинации с мышинным антителом против PD1 (mDX400), вводимым в дозе 10 мг/кг каждые пять дней. CON1 вводили каждые семь дней в дозе 10 мг/кг отдельно или в комбинации с mDX400. Результаты, приведенные здесь, показывают, что и альдеслейкин и CON1 обеспечивают ингибирование роста опухоли, и этот эффект еще более усиливается при сочетании с антителом против PD1. Величина TGI для CON1 составила 45%, и она увеличилась до 69% в случае сочетания с mDX400, а величина TGI для альдеслейкина составила 68%, которая увеличилась до 85% в случае сочетания с mDX400. CON1 также оценивали при дозе 5 мг/кг, и, хотя TGI было менее выражено, тем не менее наблюдали преимущества комбинации с mDX400. Состояние здоровья животных оценивали путем наблюдения за потерей массы тела на протяжении всего исследования, и было установлено, что CON1 хорошо переносится как в дозах 5 мг/кг, так и в дозах 10 мг/кг.

Таблица последовательностей		
SEQ ID NO:	Описание	Последовательность

1	Нативный IL-2 человека (зрелый)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIISTLT
2	DesA1_IL-2_C124S (зрелый) (альдеслейкин)	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT
3	<p>Конъюгат IL-2</p> <p>X1 = A, другая аминокислота, NNAA или отсутствует</p> <p>X2 = P, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X3 = T, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X4 = S, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X5 = S, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X6 = S, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X7 = T, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X8 = K, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X9 = K, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X10 = T, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X1-X10 = при условии, что 1-10 содержат только одну NNAA, и NNAA конъюгирована с непептидным водорастворимым полимером</p> <p>X35 = K или другая аминокислота</p> <p>X37 = T или другая аминокислота</p> <p>X38 = R или другая аминокислота</p> <p>X41 = T или другая аминокислота</p> <p>X42 = F или другая аминокислота</p> <p>X43 = K или другая аминокислота</p> <p>X45 = Y или другая аминокислота</p> <p>X61 = E или другая аминокислота</p> <p>X62 = E или другая аминокислота</p> <p>X64 = K или другая аминокислота</p> <p>X65 = P или другая аминокислота</p>	XXXXXXXXXXQLQLEHLLLDLQMILNG INNYKNPXLXXMLXXXFXMPKKATELK HLQCLEXXLXXLEXVLNXXAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEXADE TATIVEFLNRWITFXQSIISTLT



	<p>X68 = E или другая аминокислота</p> <p>X72 = L или другая аминокислота</p> <p>X107 = Y или другая аминокислота</p> <p>X125 = C или другая аминокислота</p> <p>X1-X133 = при условии, что по меньшей мере одна из аминокислот в положениях 37, 38, 41, 42, 43, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72 и 107 не является аминокислотой в том же положении, что и в нативном IL-2</p>	
4	<p>Конъюгат IL-2</p> <p>X1 = P, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X2 = T, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X3 = S, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X4 = S, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X5 = S, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X6 = T, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X7 = K, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X8 = K, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X9 = T, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X1-X9 = при условии, что 1-9 содержат только одну NNAA и NNAA конъюгирована с непептидным водорастворимым полимером</p> <p>X34 = K или другая аминокислота</p> <p>X36 = T или другая аминокислота</p> <p>X37 = R или другая аминокислота</p> <p>X40 = T или другая аминокислота</p> <p>X41 = F или другая аминокислота</p> <p>X42 = K или другая аминокислота</p> <p>X44 = Y или другая аминокислота</p> <p>X60 = E или другая аминокислота</p> <p>X61 = E или другая аминокислота</p> <p>X63 = K или другая аминокислота</p> <p>X64 = P или другая аминокислота</p>	<p>XXXXXXXXXXQLQLEHLLLDLQMILNGI  NNYKNPXLXXMLXXXFXMPKKATELK  HLQCLEXLXXLEXVLNXAQSKNFHLR  PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEXADE  TATIVEFLNRWITFXQSIISTLT</p>

	<p>X67 = E или другая аминокислота</p> <p>X71 = L или другая аминокислота</p> <p>X106 = Y или другая аминокислота</p> <p>X124 = C или другая аминокислота</p> <p>X1-X132 = при условии, что по меньшей мере одна из аминокислот в положениях 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 69, 71 и 106 не является аминокислотой в том же положении, что и в альдеслейкине</p>	
5	<p>Конъюгат IL-2</p> <p>X4 = NNAА, конъюгированная с непептидным водорастворимым полимером</p> <p>X34 = K или другая аминокислота</p> <p>X36 = T или другая аминокислота</p> <p>X37 = R или другая аминокислота</p> <p>X40 = T или другая аминокислота</p> <p>X41 = F или другая аминокислота</p> <p>X42 = K или другая аминокислота</p> <p>X44 = Y или другая аминокислота</p> <p>X60 = E или другая аминокислота</p> <p>X61 = E или другая аминокислота</p> <p>X63 = K или другая аминокислота</p> <p>X64 = P или другая аминокислота</p> <p>X67 = E или другая аминокислота</p> <p>X71 = L или другая аминокислота</p> <p>X106 = Y или другая аминокислота</p> <p>X124 = A или S</p> <p>X1-X132 = при условии, что по меньшей мере одна из аминокислот в положениях 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 69, 71 и 106 не является аминокислотой в том же положении, что и в Нативный IL-2 человека</p>	<p>PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINN YKNPXLXXMLXXXFXMPKKA TELKHLQ CLEXXLXXLEXVLNXAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEXADETATIV EFLNRWITFXQSIISTLT</p>

6	<p>Конъюгат IL-2</p> <p>X4 = NNAА, конъюгированная с непептидным водорастворимым полимером</p> <p>X37 = любая аминокислота, кроме R</p> <p>X41 = любая аминокислота, кроме F</p> <p>X124 = любая аминокислота, кроме C</p>	<p>PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTXMLTXKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFXQSIISTLT</p>
7	<p>Конъюгат IL-2</p> <p>X5 = NNAА, конъюгированная с непептидным водорастворимым полимером</p> <p>X38 = любая аминокислота, кроме R</p> <p>X42 = любая аминокислота, кроме F</p> <p>X125 = любая аминокислота, кроме C</p>	<p>APTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTXMLTXKFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFXQSIISTLT</p>
8	<p>Конъюгат IL-2</p> <p>X4 = NNAА, конъюгированная с непептидным водорастворимым полимером</p> <p>X124 = A или S</p>	<p>PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFXQSIISTLT</p>
9	<p>Конъюгат IL-2</p> <p>X5 = NNAА, конъюгированная с непептидным водорастворимым полимером</p> <p>X125 = A или S</p>	<p>APTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFXQSIISTLT</p>
10	<p>Конъюгат IL-2 DesA1_S4NNA(непептидный водорастворимый полимер)/R37A/F41K/C124S</p> <p>X4 = NNAА, конъюгированная с непептидным водорастворимым полимером</p>	<p>PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT</p>
11	<p>Конъюгат IL-2 IL-2_S5NNA(непептидный водорастворимый полимер)/R38A/F42K/C125S</p> <p>X5 = NNAА, конъюгированная с непептидным водорастворимым полимером</p>	<p>APTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT</p>
12	<p>Конъюгат IL-2 DesA1_IL-2_S4pAMF(непептидный водорастворимый полимер)/R37A/F41K/C124S</p> <p>X4 = pAMF конъюгированный с непептидным водорастворимым полимером</p>	<p>PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT</p>

13	<p>Конъюгат IL-2 IL-2_S5 pAMF(непептидный водорастворимый полимер)/R38A/F42K/C125S</p> <p>X5 = pAMF конъюгированный с непептидным водорастворимым полимером</p>	<p>APTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN          NYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHL          QCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD          LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI          VEFLNRWITFSQSIISTLT</p>
14	<p>Конъюгат IL-2 DesA1_IL-2_S4 pAMF(PEG)/R37A/F41K/C124S</p> <p>X4 = pAMF конъюгированный с PEG</p>	<p>PTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN          YKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLQ          CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI          SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV          EFLNRWITFSQSIISTLT</p>
15	<p>Конъюгат IL-2 IL-2_S5 pAMF(PEG)/R38A/F42K/C125S</p> <p>X5 = pAMF конъюгированный с PEG</p>	<p>APTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN          NYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHL          QCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD          LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI          VEFLNRWITFSQSIISTLT</p>
16	<p>Конъюгат IL-2 DesA1_IL-2_S4 pAMF(PEG)/R37A/F41K/C124S</p> <p>X4 = pAMF конъюгированный с mPEG</p>	<p>PTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN          YKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLQ          CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI          SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV          EFLNRWITFSQSIISTLT</p>
17	<p>Конъюгат IL-2 IL-2_S5 pAMF(PEG)/R38A/F42K/C125S</p> <p>X5 = pAMF конъюгированный с mPEG</p>	<p>APTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN          NYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHL          QCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD          LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI          VEFLNRWITFSQSIISTLT</p>
18	<p>Конъюгат IL-2 DesA1_IL-2/S4 pAMF(30 kDa mPEG)/R37A/F41K/C124S</p> <p>X4 = pAMF конъюгированный с 30 кДа mPEG</p>	<p>PTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN          YKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLQ          CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI          SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV          EFLNRWITFSQSIISTLT</p>
19	<p>Конъюгат IL-2 IL-2_S5 pAMF(30 kDa mPEG)/R38A/F42K/C125S</p> <p>X5 = pAMF конъюгированный с 30 кДа mPEG</p>	<p>APTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN          NYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHL          QCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD          LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI          VEFLNRWITFSQSIISTLT</p>
20	<p>Конъюгат IL-2 Des-A1_IL-2_S4pAMF(PEG1)/R37A/F41K/C124S</p> <p>X4 = pAMF конъюгированный с PEG1 триазольной связью (CON1)</p>	<p>PTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN          YKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLQ          CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI          SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV          EFLNRWITFSQSIISTLT</p>

21	Конъюгат IL-2 IL-2_S5pAMF(PEG1)/R38A/F42K/C125S  X5 = pAMF конъюгированный с PEG1 триазольной связью	APTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHL QCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFSQSIISTLT
22	Конъюгат IL-2 DesA1/S4pMF(PEG1)/C124S  X4 = pAMF конъюгированный с PEG1 триазольной связью (CON2)	PTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLT
23	Ald-6HIS_F41K/E60T/E61S	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTKKFYMPKKATELKHLQ CLETSLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
24	Ald-6HIS_T40D/E60T/E61S	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLDFKFYMPKKATELKHLQ CLETSLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
25	Ald-6HIS_T40D/F41K/E61S	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLDKKFYMPKKATELKHLQ CLEESLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
26	Ald-6HIS_T40D/F41K/E60T	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLDKKFYMPKKATELKHLQ CLETELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
27	Ald-6HIS_R37A/E60T/E61S	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQ CLETSLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
28	Ald-6HIS_R37A/F41K/E61S	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQ CLEESLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
29	Ald-6HIS_R37A/F41K/E60T	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQ CLETELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH

30	Ald-6HIS_R37A/T40D/E61S	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTAMLDKFKFYMPKKATELKHLQ CLEESLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
31	Ald-6HIS_R37A/T40D/E60T	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTAMLDKFKFYMPKKATELKHLQ CLETELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
32	Ald-6HIS_R37A/T40D/F41K	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTAMLDKFKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
33	Ald-6HIS_F41K/E61S	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTKKFYMPKKATELKHLQ CLEESLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
34	Ald-6HIS_F41K/E60T	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTKKFYMPKKATELKHLQ CLETELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
35	Ald-6HIS_T40D/E61S	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLDFKFKFYMPKKATELKHLQ CLEESLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
36	Ald-6HIS_T40D/E60T	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLDFKFKFYMPKKATELKHLQ CLETELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
37	Ald-6HIS_T40D/F41K	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLDKKFYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
38	Ald-6HIS_R37A/E61S	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTAMLTFKFKFYMPKKATELKHLQ CLEESLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH

39	Ald-6HIS_R37A/E60T	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINN YKNPKLTAMLTFFKPYMPKKATELKHLQ CLETELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
40	Ald-6HIS_R37A/F41K	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINN YKNPKLTAMLTFFKPYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
41	Ald-6HIS_R37A/T40D	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINN YKNPKLTAMLDFFKPYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFSQSIISTLTGGSHHHHHH
42	<p>Фрагмент IL-2</p> <p>X1 = A, другая аминокислота, NNAA или отсутствует</p> <p>X2 = P, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X3 = T, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X4 = S, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X5 = S, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X6 = S, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X7 = T, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X8 = K, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X9 = K, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X10 = T, другая аминокислота или NNAA</p> <p>X1-X10 = при условии, что 1-10 включают только одну NNAA</p> <p>X35 = K или другая аминокислота</p> <p>X37 = T или другая аминокислота</p> <p>X38 = R или другая аминокислота</p> <p>X41 = T или другая аминокислота</p> <p>X42 = F или другая аминокислота</p> <p>X43 = K или другая аминокислота</p> <p>X45 = Y или другая аминокислота</p> <p>X61 = E или другая аминокислота</p>	XXXXXXXXXXQLQLEHLLLDLQMLNG INNYKNPXLXXMLXXXFXMPKKATELK HLQCLEXLXXLEXVLNXAQSKNFHLR PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEXADE TATIVEFLNRWITFXQSIISTLT

	<p>X62 = E или другая аминокислота</p> <p>X64 = K или другая аминокислота</p> <p>X65 = P или другая аминокислота</p> <p>X68 = E или другая аминокислота</p> <p>X72 = L или другая аминокислота</p> <p>X107 = Y или другая аминокислота</p> <p>X125 = C или другая аминокислота</p> <p>X1-X133 = при условии, что по меньшей мере одна из аминокислот в положениях 37, 38, 41, 42, 43, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72 и 107 не является аминокислотой в том же положении, что и в нативном IL-2</p>	
43	<p>Фрагмент IL-2</p> <p>X1 = P, другая аминокислота или NNAА</p> <p>X2 = T, другая аминокислота или NNAА</p> <p>X3 = S, другая аминокислота или NNAА</p> <p>X4 = S, другая аминокислота или NNAА</p> <p>X5 = S, другая аминокислота или NNAА</p> <p>X6 = T, другая аминокислота или NNAА</p> <p>X7 = K, другая аминокислота или NNAА</p> <p>X8 = K, другая аминокислота или NNAА</p> <p>X9 = T, другая аминокислота или NNAА</p> <p>X1-X9 = при условии, что 1-9 включают только одну NNAА</p> <p>X34 = K или другая аминокислота</p> <p>X36 = T или другая аминокислота</p> <p>X37 = R или другая аминокислота</p> <p>X40 = T или другая аминокислота</p> <p>X41 = F или другая аминокислота</p> <p>X42 = K или другая аминокислота</p> <p>X44 = Y или другая аминокислота</p> <p>X60 = E или другая аминокислота</p> <p>X61 = E или другая аминокислота</p>	<p>XXXXXXXXXXQLQLEHLLLDLQMILNGI  NNYKNPXLXXMLXXXFXMPKKATELK  HLQCLEXLXXLEXVLNXAQSKNFHLR  PRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEXADE  TATIVEFLNRWITFXQSIISTLT</p>



	<p>X63 = К или другая аминокислота</p> <p>X64 = Р или другая аминокислота</p> <p>X67 = Е или другая аминокислота</p> <p>X71 = L или другая аминокислота</p> <p>X106 = Y или другая аминокислота</p> <p>X124 = С или другая аминокислота</p> <p>X1-X132 = при условии, что по меньшей мере одна из аминокислот в положениях 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 69, 71 и 106 не является аминокислотой в том же положении, что и в альдеслейкине</p>	
44	<p>Фрагмент IL-2</p> <p>X4 = NNAA</p> <p>X34 = К или другая аминокислота</p> <p>X36 = Т или другая аминокислота</p> <p>X37 = R или другая аминокислота</p> <p>X40 = Т или другая аминокислота</p> <p>X41 = F или другая аминокислота</p> <p>X42 = К или другая аминокислота</p> <p>X44 = Y или другая аминокислота</p> <p>X60 = Е или другая аминокислота</p> <p>X61 = Е или другая аминокислота</p> <p>X63 = К или другая аминокислота</p> <p>X64 = Р или другая аминокислота</p> <p>X67 = Е или другая аминокислота</p> <p>X71 = L или другая аминокислота</p> <p>X106 = Y или другая аминокислота</p> <p>X124 = А или S</p> <p>X1-X132 = при условии, что по меньшей мере одна из аминокислот в положениях 36, 37, 40, 41, 42, 44, 60, 61, 63, 64, 69, 71 и 106 не является аминокислотой в том же положении, что и в нативном IL-2 человека</p>	<p>PTSXSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINN YKNPXLXXMLXXXFXMPKKA TELKHLQ CLEXXLXXLEXVLNXAQSKNFHLRPRDL ISNINVIVLELKGSETTFMCEXADETATIV EFLNRWITFXQSIISTLT</p>

45	<p>Фрагмент IL-2</p> <p>X4 = NNAА</p> <p>X37 = любая аминокислота, кроме R</p> <p>X41 = любая аминокислота, кроме F</p> <p>X124 = любая аминокислота, кроме C</p>	<p>PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINN</p> <p>YKNPKLTXMLTXKFYMPKKATELKHLQ</p> <p>CLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI</p> <p>SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV</p> <p>EFLNRWITFXQSIISTLT</p>
46	<p>Фрагмент IL-2</p> <p>X5 = NNAА</p> <p>X38 = любая аминокислота, кроме R</p> <p>X42 = любая аминокислота, кроме F</p> <p>X125 = любая аминокислота, кроме C</p>	<p>APTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGIN</p> <p>NYKNPKLTXMLTXKFYMPKKATELKHL</p> <p>QCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD</p> <p>LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI</p> <p>VEFLNRWITFXQSIISTLT</p>
47	<p>Фрагмент IL-2</p> <p>X4 = NNAА</p> <p>X124 = А или S</p>	<p>PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINN</p> <p>YKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLQ</p> <p>CLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI</p> <p>SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV</p> <p>EFLNRWITFXQSIISTLT</p>
48	<p>Фрагмент IL-2</p> <p>X5 = NNAА</p> <p>X125 = А или S</p>	<p>APTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGIN</p> <p>NYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHL</p> <p>QCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD</p> <p>LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI</p> <p>VEFLNRWITFXQSIISTLT</p>
49	<p>Фрагмент IL-2</p> <p>DesA1_S4NNA_R37A_F41K_C124S</p> <p>X4 = NNAА</p>	<p>PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINN</p> <p>YKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLQ</p> <p>CLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI</p> <p>SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV</p> <p>EFLNRWITFSQSIISTLT</p>
50	<p>Фрагмент IL-2 IL-2_</p> <p>S5NNAА_R38A_F42K_C125S</p> <p>X5 = NNAА</p>	<p>APTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGIN</p> <p>NYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHL</p> <p>QCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD</p> <p>LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI</p> <p>VEFLNRWITFSQSIISTLT</p>
51	<p>Фрагмент IL-2 DesA1_IL-</p> <p>2_S4pAMF_R37A_F41K_C124S</p> <p>X4 = pAMF</p>	<p>PTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINN</p> <p>YKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLQ</p> <p>CLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI</p> <p>SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV</p> <p>EFLNRWITFSQSIISTLT</p>
52	<p>Фрагмент IL-2 IL-2_S5</p> <p>pAMF_R38A_F42K_C125S</p> <p>X5 = pAMF</p>	<p>APTSXSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGIN</p> <p>NYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHL</p> <p>QCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD</p> <p>LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI</p> <p>VEFLNRWITFSQSIISTLT</p>

53	DesA1_IL-2 (зрелый)	PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQ CLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV EFLNRWITFCQSIISTLT
----	---------------------	---

Хотя настоящее изобретение описано здесь со ссылкой на иллюстративные варианты осуществления, следует понимать, что изобретение ими не ограничивается. Специалисты, обладающие обычными знаниями в данной области техники и имеющие доступ к изложенным здесь сведениям, способны выполнить дополнительные модификации и варианты осуществления в пределах их объема. Следовательно, настоящее изобретение ограничено только прилагаемой формулой изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Конъюгат интерлейкина 2 (IL-2), содержащий полипептид IL-2, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, и дополнительно содержащий:

(i) одну или более аминокислотных замен, которые снижают аффинность полипептида IL-2 к тримеру  $\alpha\beta\gamma_c$  рецептора IL-2 человека (IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ ) по сравнению с IL-2 человека дикого типа; и

(ii) замену аминокислоты на N-конце полипептида IL-2 или рядом с ним на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку из не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером на N-конце полипептида IL-2 или вблизи него;

при этом полипептид IL-2 имеет по существу сходную аффинность связывания с димером  $\beta\gamma_c$  рецептора IL-2 человека (IL-2R $\beta\gamma_c$ ) по сравнению с IL-2 человека дикого типа.

2. Конъюгат IL-2 по п.1, в котором полипептид IL-2 по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичен аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, при условии, что полипептид IL-2 содержит по меньшей мере аминокислоты E15, H16, L19, D20, D84, N88, V91, Q126, T123 и I129, где положения аминокислот соответствуют положениям, представленных в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

3. Конъюгат IL-2 по п.1, в котором конъюгат полипептида IL-2 не имеет обнаруживаемого связывания с альфа-мономером рецептора IL-2 человека (IL-2R $\alpha$ ), определенное с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса.

4. Конъюгат IL-2 по п.1, в котором одна или более аминокислотных замен независимо выбраны из группы, состоящей из K34, T36, R37, T40, F41, K42, F43, Y44, E60, E61, K63, P64, E67, L71, M103, C104 и Y106, где положения замен аминокислот соответствуют положениям аминокислот в аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 53.

5. Конъюгат IL-2 по п.3, где одна или более аминокислотных замен в полипептиде IL-2 находятся в положениях R37 и F41.

6. Конъюгат IL-2 по п.4, где аминокислотные замены в полипептиде IL-2 представляют собой R37A и F41K.

7. Конъюгат IL-2 по п.1, в котором полипептид IL-2 дополнительно содержит замену остатка цистеина в положении 124 аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из A и S, где положение аминокислоты соответствует положению аминокислоты в аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 53.

8. Конъюгат IL-2 по п.1, где полипептид IL-2 дополнительно содержит остаток аланина на N-конце.

9. Конъюгат IL-2 по п.1, в котором не встречающаяся в природе аминокислота заменена на аминокислоту в положении P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8 или T9 или связана с N-концевой аминокислотой амидной связью.

10. Конъюгат IL-2 по п.9, где не встречающаяся в природе аминокислота расположена в положении аминокислоты, соответствующем положению 4 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2.

11. Конъюгат ПЛ-2 по п.1, в котором не встречающаяся в природе аминокислота содержит функциональную группу, и водорастворимый полимер связан с реакционноспособной группой, которая способна реагировать с функциональной группой с образованием ковалентной связи.

12. Конъюгат ПЛ-2 по п.1, в котором не встречающаяся в природе аминокислота выбрана из группы, состоящей из п-азидометил-L-фенилаланина, п-азидо-L-фенилаланина, п-ацетил-L-фенилаланина, N6-азидоэтоксид-L-лизина, N6-пропаргилэтоксид-L-лизина (PraK), BCN-L-лизина, норборненилизина, TCO-лизина, метилтетразинлизина, аллилоксикарбониллизина, 2-амино-8-оксононановой кислоты, 2-амино-8-оксооктановой кислоты, O-метил-L-тирозина, L-3-(2-нафтил)аланина, 3-метилфенилаланина, O-4-аллил-L-тирозина, 4-пропил-L-тирозина, три-O-ацетил-GlcNAc-серина, L-дофа, фторированного фенилаланина, изопропил-L-фенилаланина, п-бензоил-L-фенилаланина, L-фосфосерина, фосфоносерина, фосфонотиروزина, п-йодифенилаланина, п-бромфенилаланина, п-амино-L-фенилаланина, изопропил-L-фенилаланина, п-пропаргилоксифенилаланина, 2-амино-3-((2-((3-(бензилокси)-3-оксопропил)амино)этил)селанил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(фенилселанил)пропановой кислоты, селеноцистеина, м-ацетилфенилаланина, 2-амино-8-оксононановой кислоты и п-пропаргилоксифенилаланина.

13. Конъюгат ПЛ-2 по п.1, в котором не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой п-азидометил-L-фенилаланин.

14. Конъюгат ПЛ-2 по п.1, в котором непептидный водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу от 1 кДа до 100 кДа.

15. Конъюгат ПЛ-2 по п.1, в котором непептидный водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу около 30 кДа.

16. Конъюгат ПЛ-2 по п.1, в котором непептидный водорастворимый полимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ), поли(пропиленгликоль) (ППГ), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, поли(оксиэтилированный полиол), поли(олефиновый спирт), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(α-гидроксикислота), поли(виниловый спирт), полифосфазен, полиоксазолины (POZ), поли(N-акрилоилморфолин) или их комбинации.

17. Конъюгат ПЛ-2 по п.1, в котором непептидный водорастворимый полимер представляет собой линейный или разветвленный ПЭГ.

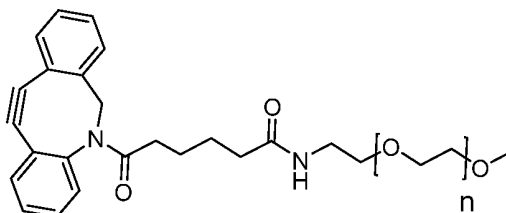
18. Конъюгат ПЛ-2 по п.11, в котором непептидный водорастворимый полимер, связанный с реакционноспособной группой, имеет формулу:



где RG представляет собой реакционноспособную группу, которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой не встречающейся в природе аминокислоты; линкер представляет собой ковалентную связь или замещенный или незамещенный C<sub>1-20</sub> алкил; POLY представляет собой непептидный водорастворимый полимер; и x представляет собой спирт или метильную группу на конце POLY.

19. Конъюгат ПЛ-2 по п.11, в котором реакционноспособная группа непептидного водорастворимого полимера содержит алкин, а функциональная группа не встречающейся в природе аминокислоты содержит азид, или реакционноспособная группа непептидного водорастворимого полимера содержит азид, а функциональная группа не встречающейся в природе аминокислоты содержит алкин.

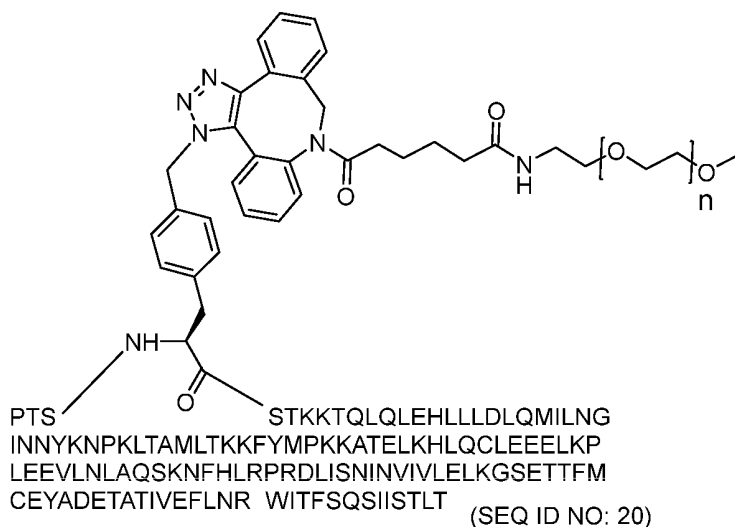
20. Конъюгат ПЛ-2 по п.18, в котором непептидный водорастворимый полимер, связанный с реакционноспособной группой, имеет формулу:



где  $n$  равняется около 681.

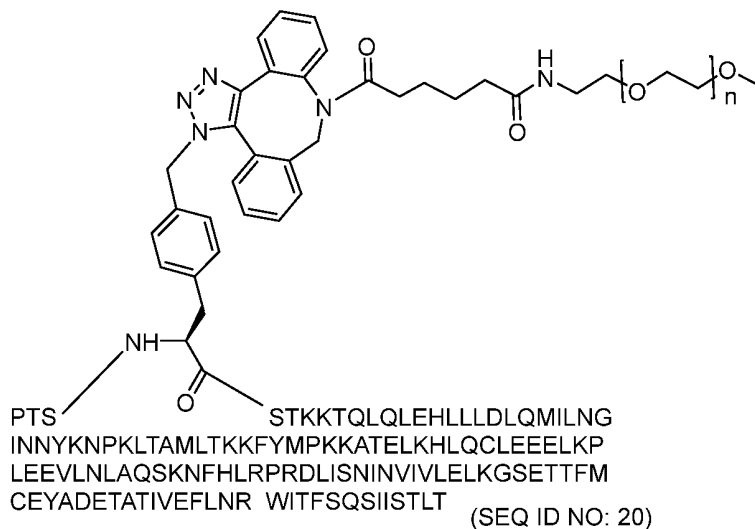
21. Конъюгат IL-2 по п.1, в котором конъюгат IL-2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

22. Конъюгат интерлейкина 2 (IL-2), содержащий формулу



где  $n$  равняется около 681,

или его региоизомер, содержащий формулу



где  $n$  равняется около 681.

23. Композиция, содержащая:

конъюгат IL-2 по любому из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

24. Способ лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума, включающий:

введение терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 по любому из пп. 1-22 или композиции по п.23 индивидууму, нуждающемуся в этом, для лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума.

25. Комбинированная терапия для лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума, включающая:

введение терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 по любому из пп. 1-22 или композиции по п.23 нуждающемуся в этом индивидууму, и

введение индивидууму терапевтически эффективного количества терапевтического агента для лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума.

26. Комбинированная терапия по п.25, в которой терапевтический агент представляет собой антитело к PD1 или антитело к PDL1.

27. Комбинированная терапия по п.25, в которой конъюгат IL-2 или композицию вводят до введения терапевтического агента.

28. Комбинированная терапия по п.25, в которой конъюгат IL-2 или композицию вводят после введения терапевтического агента.

29. Комбинированная терапия по п.25, в которой конъюгат IL-2 или композицию вводят одновременно с терапевтическим агентом.

30. Применение конъюгата IL-2 по любому из пп. 1-22, или композиции по п.23, для лечения пролиферативного заболевания или рака.

31. Применение конъюгата IL-2 по любому из пп. 1-22, или композиции по п.23, и терапевтического агента для лечения пролиферативного заболевания или рака.

32. Применение по п.31, где терапевтический агент представляет собой антитело к PD1 или антитело к PDL1.

33. Применение конъюгата IL-2 по любому из пп. 1-22, или композиции по п.23, для получения лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания или рака.

34. Конъюгат интерлейкина 2 (IL-2), содержащий полипептид IL-2, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности представленной в SEQ ID NO: 53, и дополнительно содержащий:

(i) одну или более аминокислотных замен, выбранных из группы, состоящей из K34, T36, R37, T40, F41, K42, F43, Y44, E60, E61, K63, P64, E67, L71, M103, C104 и Y106; и

(ii) замену аминокислоты на N-конце полипептида IL-2 или рядом с ним на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку из не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером на N-конце полипептида IL-2 или вблизи него, где положения аминокислот соответствуют положениям, указанным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

35. Конъюгат IL-2 по п.34, в котором аминокислотная последовательность полипептида IL-2 по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, при условии, что полипептид IL-2 содержит по меньшей

мере аминокислоты E15, H16, L19, D20, D84, N88, V91, Q126, T123 и I129, где положения аминокислот соответствуют положениям, представленным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

36. Конъюгат IL-2 по п.34, в котором одна или более аминокислотных замен в полипептиде IL-2 находятся в положениях R37 и F41.

37. Конъюгат IL-2 по п.36, в котором аминокислотные замены в полипептиде IL-2 представляют собой R37A и F41K.

38. Конъюгат IL-2 по п.34, в котором полипептид IL-2 дополнительно содержит замену остатка цистеина в положении 124 аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из A и S.

39. Конъюгат IL-2 по п.34, в котором полипептид IL-2 дополнительно содержит остаток аланина на N-конце.

40. Конъюгат IL-2 по п.34, в котором не встречающаяся в природе аминокислота заменена на аминокислоту в положении P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8 или T9 или связана с N-концевой аминокислотой амидной связью.

41. Конъюгат IL-2 по п.40, в котором не встречающаяся в природе аминокислота расположена в положении аминокислоты, соответствующем положению 4 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2.

42. Конъюгат IL-2 по п.34, в котором не встречающаяся в природе аминокислота содержит функциональную группу, и водорастворимый полимер связан с реакционноспособной группой, которая способна реагировать с функциональной группой с образованием ковалентной связи.

43. Конъюгат полипептида IL-2 по п.34, в котором не встречающаяся в природе аминокислота выбрана из группы, состоящей из п-азидометил-L-фенилаланина, п-азидо-L-фенилаланина, п-ацетил-L-фенилаланина, N6-азидоэтоксид-L-лизина, N6-пропаргилэтоксид-L-лизина (PraK), BCN-L-лизина, норборненлизина, TCO-лизина, метилтетразинлизина, аллилоксикарбониллизина, 2-амино-8-оксононановой кислоты, 2-амино-8-оксооктановой кислоты, O-метил-L-тирозина, L-3-(2-нафтил)аланина, 3-метилфенилаланина, O-4-аллил-L-тирозина, 4-пропил-L-тирозина, три-O-ацетил-GlcNAc-серина, L-дофа, фторированного фенилаланина, изопропил-L-фенилаланина, п-бензоил-L-фенилаланина, L-фосфосерина, фосфоносерина, фосфотирозина, п-йодофенилаланина, п-бромфенилаланина, п-амино-L-фенилаланина, изопропил-L-фенилаланина, п-пропаргилоксифенилаланина, 2-амино-3-((2-((3-(бензилокси)-3-оксопропил)амино)этил)селанил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(фенилселанил)пропановой кислоты, селеноцистеина, м-ацетилфенилаланина, 2-амино-8-оксононановой кислоты и п-пропаргилоксифенилаланина.

44. Конъюгат IL-2 по п.34, в котором не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой п-азидометил-L-фенилаланин.

45. Конъюгат IL-2 по п.34, в котором непептидный водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу от 1 кДа до 100 кДа.

46. Конъюгат IL-2 по п.34, в котором непептидный водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу около 30 кДа.

47. Конъюгат IL-2 по п.34, в котором непептидный водорастворимый полимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ), поли(пропиленгликоль) (ППГ), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, поли(оксиэтилированный полиол), поли(олефиновый спирт), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(а-

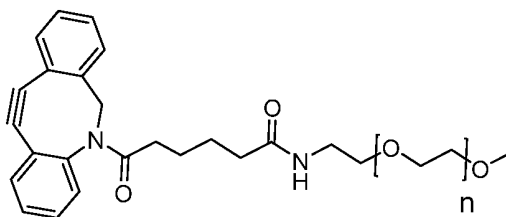


гидроксикислота), поли(виниловый спирт), полифосфазен, полиоксазолины (POZ), поли(N-акрилоилморфолин) или их комбинации.

48. Конъюгат IL-2 по п.34, где непептидный водорастворимый полимер представляет собой линейный или разветвленный ПЭГ.

49. Конъюгат IL-2 по п.42, в котором реакционноспособная группа непептидного водорастворимого полимера содержит алкин, и функциональная группа не встречающейся в природе аминокислоты содержит азид, или реакционноспособная группа непептидного водорастворимого полимера содержит азид, и функциональная группа не встречающейся в природе аминокислоты содержит алкин.

50. Конъюгат IL-2 по п.48, в котором непептидный водорастворимый полимер, содержащий алкин, имеет формулу:



где n равняется около 681.

51. Конъюгат IL-2 по п.34, в котором конъюгат IL-2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

52. Композиция, содержащая:

конъюгат IL-2 по любому из пп. 34-51 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

53. Способ лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума, включающий:

введение терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 по пп. 34-51 или композиции по п.52 индивидууму, нуждающемуся в этом, для лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума.

54. Комбинированная терапия для лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума, включающая:

введение терапевтически эффективного количества конъюгата IL-2 по пп. 34-51 или композиции по п.52 нуждающемуся в этом индивидууму и

введение индивидууму терапевтически эффективного количества терапевтического агента для лечения пролиферативного заболевания или рака у индивидуума.

55. Комбинированная терапия по п.54, где терапевтический агент представляет собой антитело к PD1 или антитело к PDL1.

6. Комбинированная терапия по п.54, где конъюгат IL-2 или композицию вводят до введения терапевтического агента.

57. Комбинированная терапия по п.54, где конъюгат IL-2 или композицию вводят после введения терапевтического агента.

58. Комбинированная терапия по п.54, где конъюгат IL-2 или композицию вводят одновременно с терапевтическим агентом.

59. Применение конъюгата IL-2 по пп. 34-51, или композиции по п.52, для лечения пролиферативного заболевания или рака.

60. Применение конъюгата IL-2 по пп. 34-51, или композиции по п.52, и терапевтического агента для лечения пролиферативного заболевания или рака.

61. Применение по п.60, где терапевтический агент представляет собой антитело к PD1 или антитело к PDL1.

62. Применение конъюгата IL-2 по пп. 34-51 или композиции по п.52 для изготовления лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания или рака.

63. Конъюгат IL-2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

64. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат IL-2 по п.63 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

65. Фрагмент IL-2, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52.

66. Конъюгат интерлейкина 2 (IL-2), содержащий полипептид IL-2, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, и дополнительно содержащий:

замену аминокислоты на N-конце полипептида IL-2 или рядом с ним на не встречающуюся в природе аминокислоту, конъюгированную с непептидным водорастворимым полимером, или вставку из не встречающейся в природе аминокислоты, конъюгированной с непептидным водорастворимым полимером на N-конце полипептида IL-2 или вблизи него, при условии, что полипептид IL-2 содержит по меньшей мере аминокислоты E15, H16, L19, D20, K34, T36, R37, T40, F41, K42, F43, Y44, E60, E61, K63, P64, E67, L71, D84, N88, V91, M103, C104, Y106, Q126, T123 и I129, где положения аминокислот соответствуют положениям, представленным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

67. Конъюгат IL-2 по п.66, в котором полипептид IL-2 дополнительно содержит замену остатка цистеина в положении 124 аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из A и S.

68. Конъюгат IL-2 по п.66, в котором полипептид IL-2 дополнительно содержит остаток аланина на N-конце.

69. Конъюгат IL-2 по п.66, в котором не встречающаяся в природе аминокислота заменена на аминокислоту в положении P1, T2, S3, S4, S5, T6, K7, K8 или T9, или связана с N-концевой аминокислотой амидной связью.

70. Конъюгат IL-2 по п.69, в котором не встречающаяся в природе аминокислота расположена в положении аминокислоты, соответствующем положению 4 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2.

71. Конъюгат IL-2 по п.66, в котором не встречающаяся в природе аминокислота содержит функциональную группу, и водорастворимый полимер связан с реакционноспособной группой, которая способна реагировать с функциональной группой с образованием ковалентной связи.

72. Конъюгат полипептида IL-2 по п.66, в котором не встречающаяся в природе аминокислота выбрана из группы, состоящей из п-азидометил-L-фенилаланина, п-азидо-L-фенилаланина, п-ацетил-L-фенилаланина, N6-азидоэтоксид-L-лизина, N6-пропаргилэтоксид-L-лизина (PraK), BCN-L-лизина, норборненилизина, TCO-лизина, метилтетразинилизидина, аллилоксикарбониллизина, 2-амино-8-оксононановой

кислоты, 2-амино-8-оксооктановой кислоты, O-метил-L-тирозина, L-3-(2-нафтил)аланина, 3-метилфенилаланина, O-4-аллил-L-тирозина, 4-пропил-L-тирозина, три-O-ацетил-GlcNAc-серина, L-дофа, фторированного фенилаланина, изопропил-L-фенилаланина, п-бензоил-L-фенилаланина, L-фосфосерина, фосфоносерина, фосфонотирина, п-йодофенилаланина, п-бромфенилаланина, п-амино-L-фенилаланина, изопропил-L-фенилаланина, п-пропаргилоксифенилаланина, 2-амино-3-((2-((3-(бензилокси)-3-оксопропил)амино)этил)селанил)пропановой кислоты, 2-амино-3-(фенилселанил)пропановой кислоты, селеноцистеина, м-ацетилфенилаланина, 2-амино-8-оксононановой кислоты и п-пропаргилоксифенилаланина

73. Конъюгат IL-2 по п.66, в котором не встречающаяся в природе аминокислота представляет собой п-азидометил-L-фенилаланин.

74. Конъюгат IL-2 по п.66, в котором непептидный водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу от 1 кДа до 100 кДа.

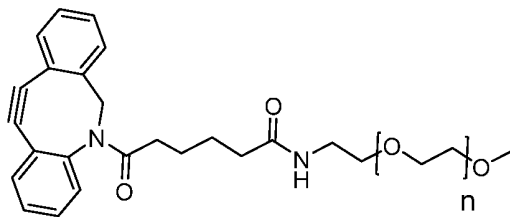
75. Конъюгат IL-2 по п.66, в котором непептидный водорастворимый полимер имеет среднюю молекулярную массу около 30 кДа.

76. Конъюгат IL-2 по п.66, в котором непептидный водорастворимый полимер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ), поли(пропиленгликоль) (ППГ), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, поли(оксиэтилированный полиол), поли(олефиновый спирт), поли(винилпирролидон), поли(гидроксиалкилметакриламид), поли(гидроксиалкилметакрилат), поли(сахариды), поли(α-гидроксикислота), поли(виниловый спирт), полифосфазен, полиоксазолины (POZ), поли(N-акрилоилморфолин) или их комбинации.

77. Конъюгат IL-2 по п.66, в котором непептидный водорастворимый полимер представляет собой линейный или разветвленный ПЭГ.

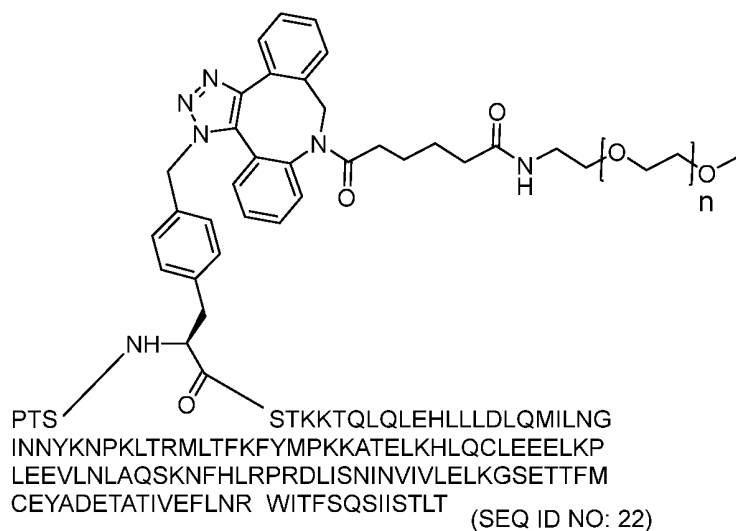
78. Конъюгат IL-2 по п.71, в котором реакционноспособная группа непептидного водорастворимого полимера содержит алкин и функциональная группа не встречающейся в природе аминокислоты содержит азид, или реакционноспособная группа непептидного водорастворимого полимера содержит азид и функциональная группа не встречающейся в природе аминокислоты содержит алкин.

79. Конъюгат IL-2 по п.78, в котором непептидный водорастворимый полимер, содержащий алкин, имеет формулу:



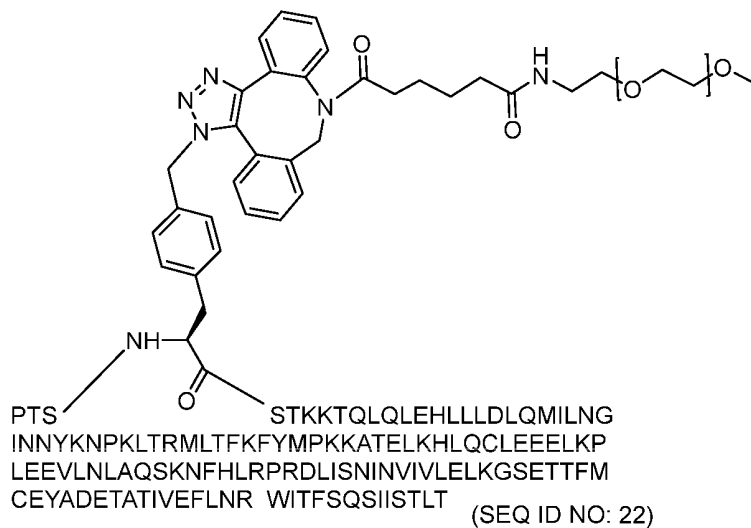
где n равняется около 681.

80. Конъюгат IL-2 по п. 66, где конъюгат IL-2 имеет формулу:



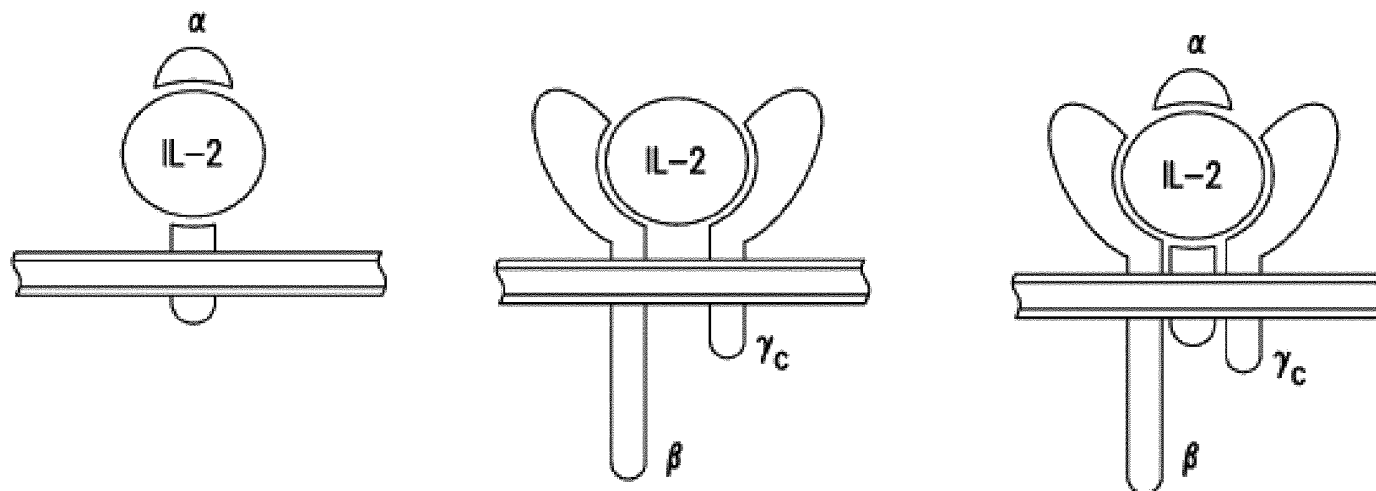
где  $n$  равняется около 681,

или его региоизомер, имеющий формулу



где  $n$  равняется около 681.

IL-2 рецептор находится в трех состояниях



Низкая аффинность

$K_d 10^{-8}$

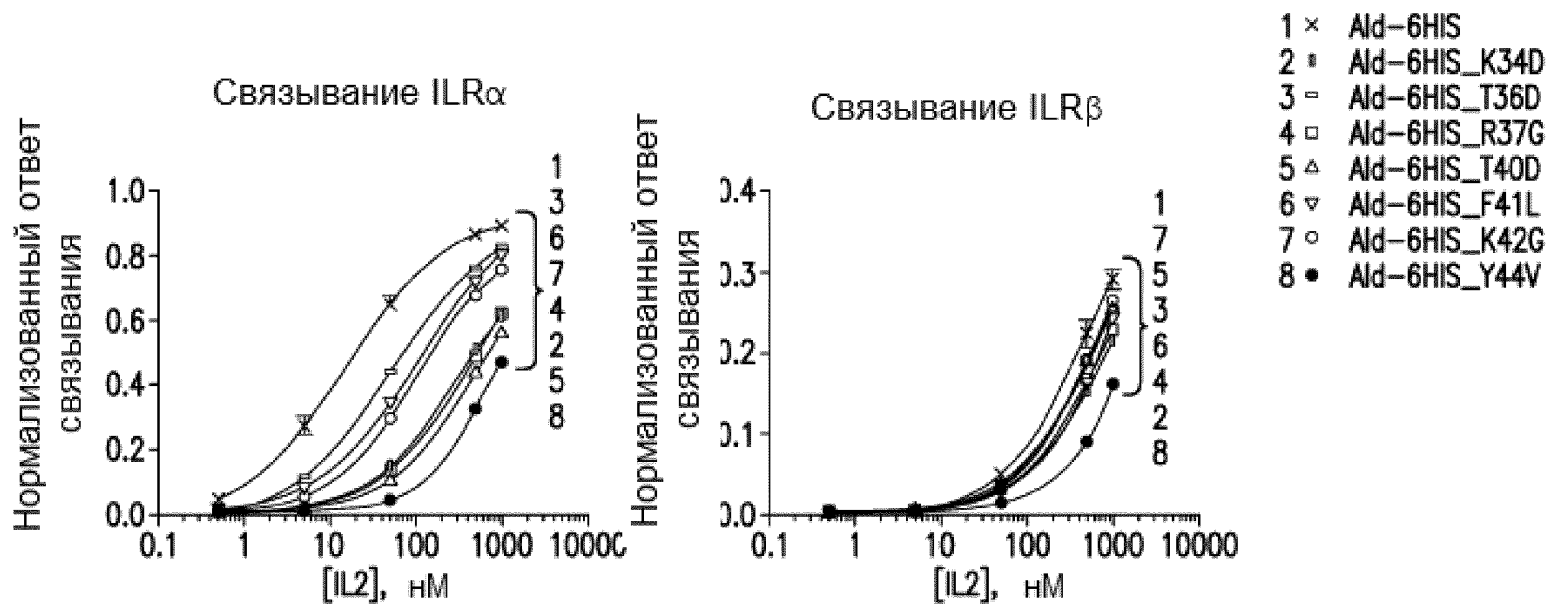
Средняя аффинность

$K_d 10^{-9}$

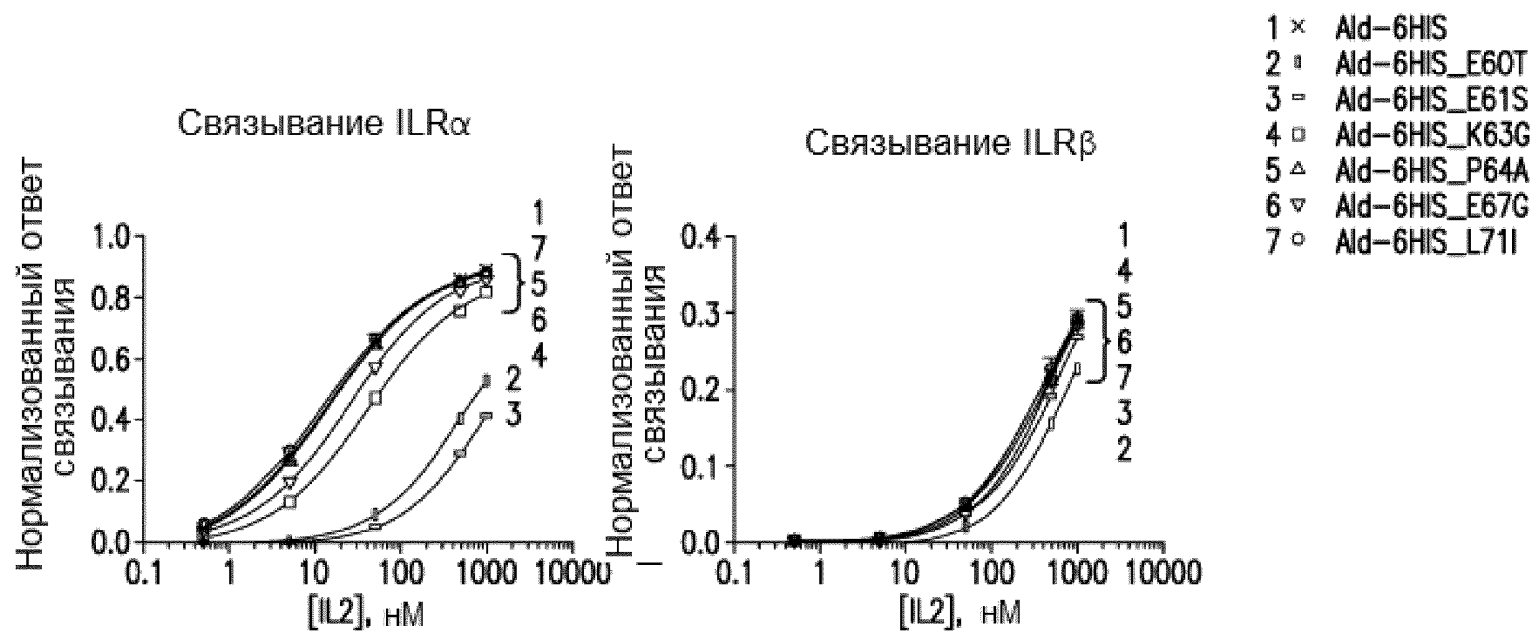
Высокая аффинность

$K_d 10^{-11}$

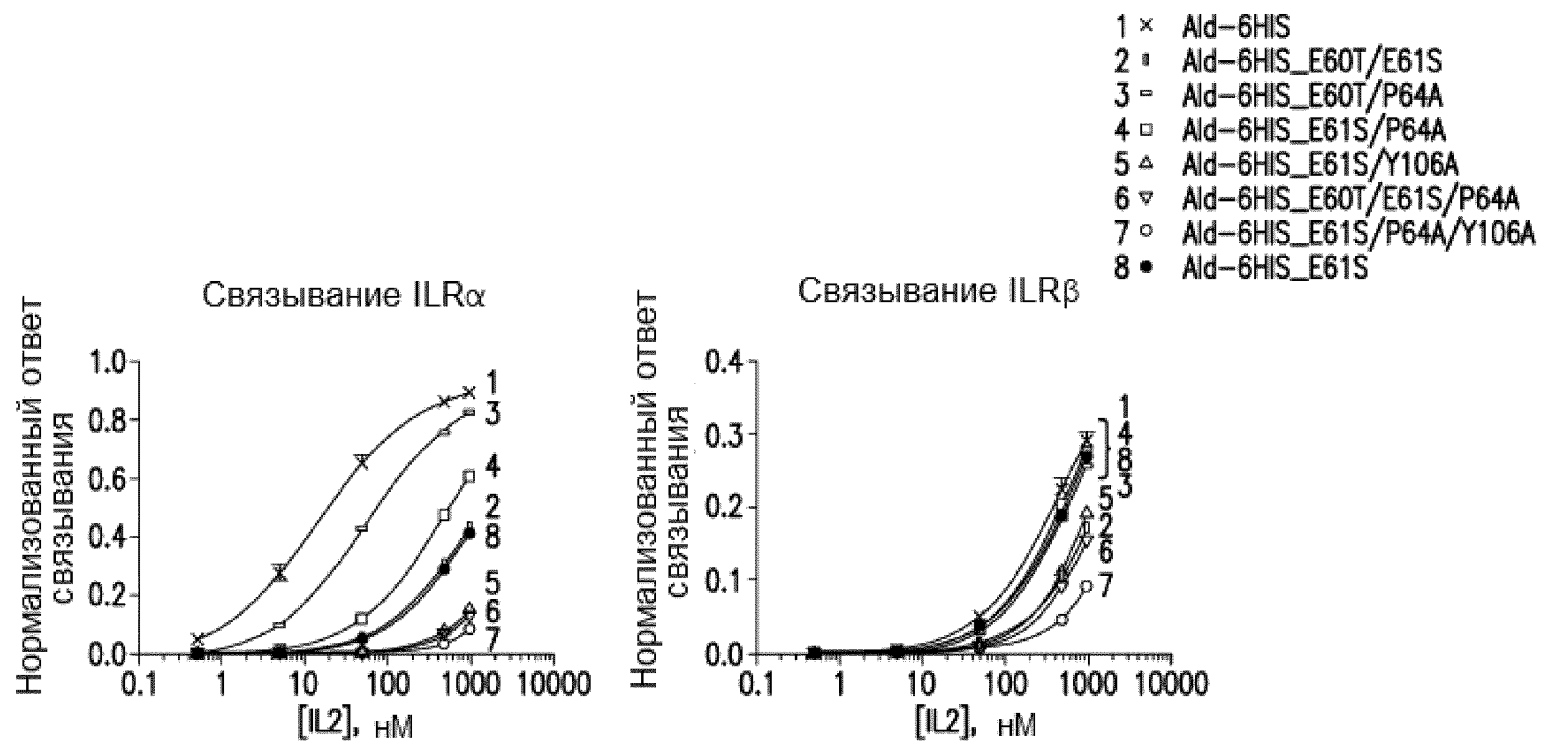
Фиг. 1



Фиг. 2А

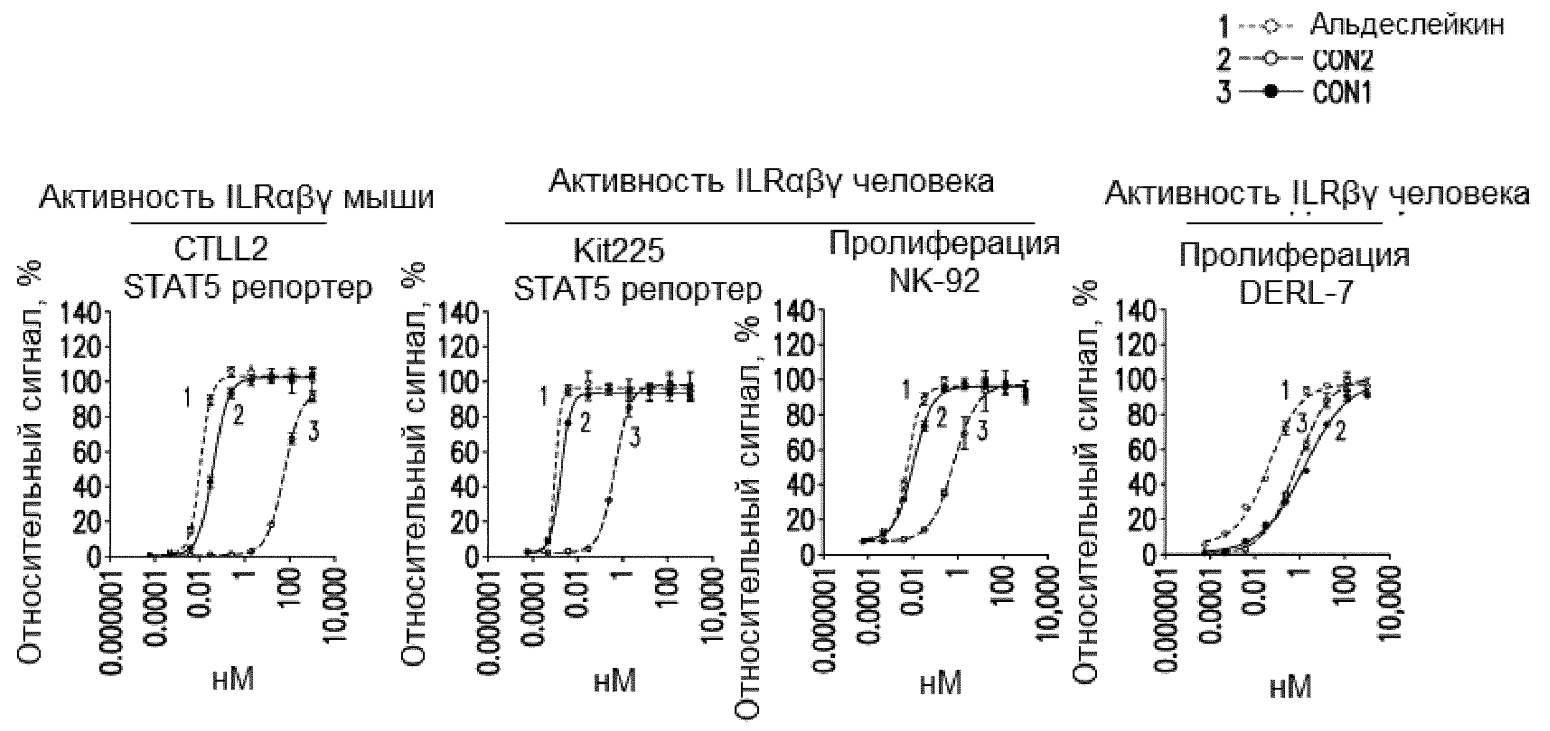


Фиг.2В

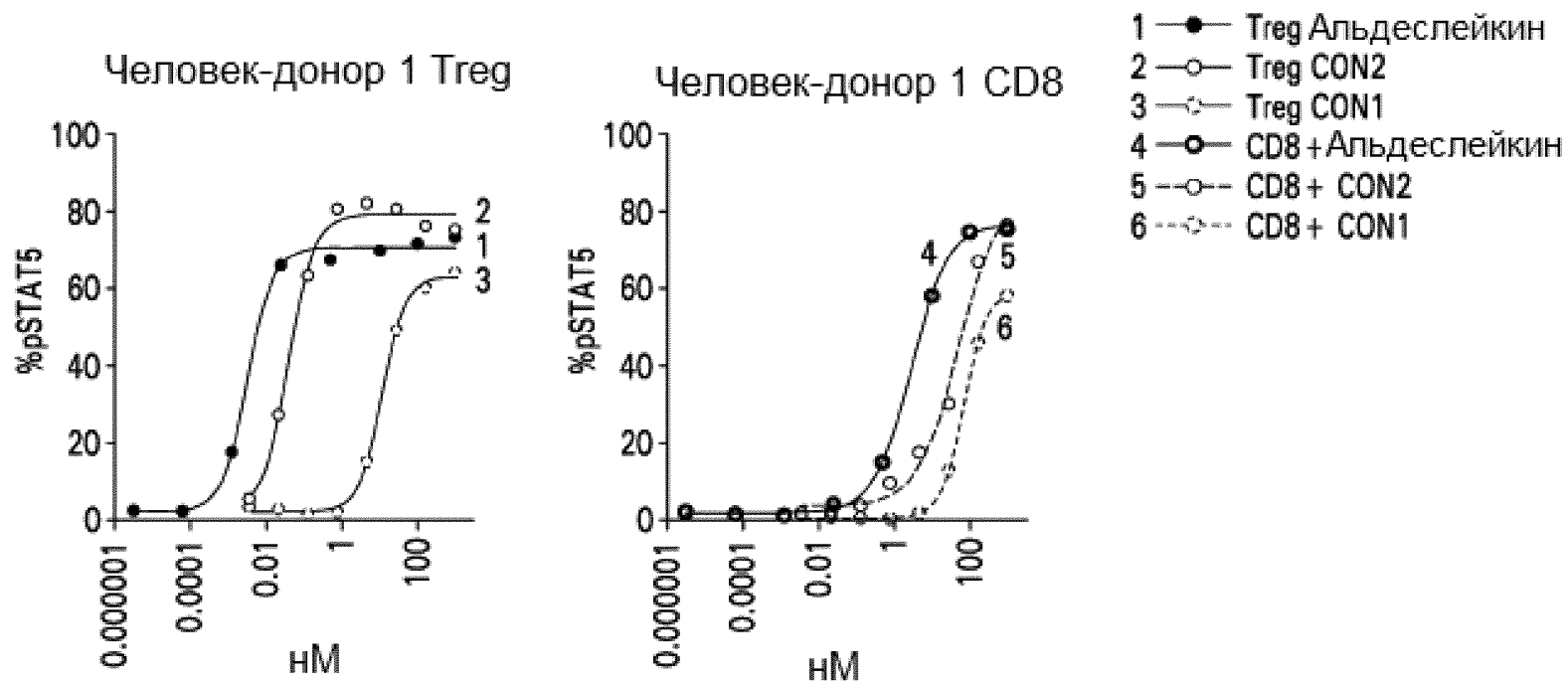


Фиг. 2С

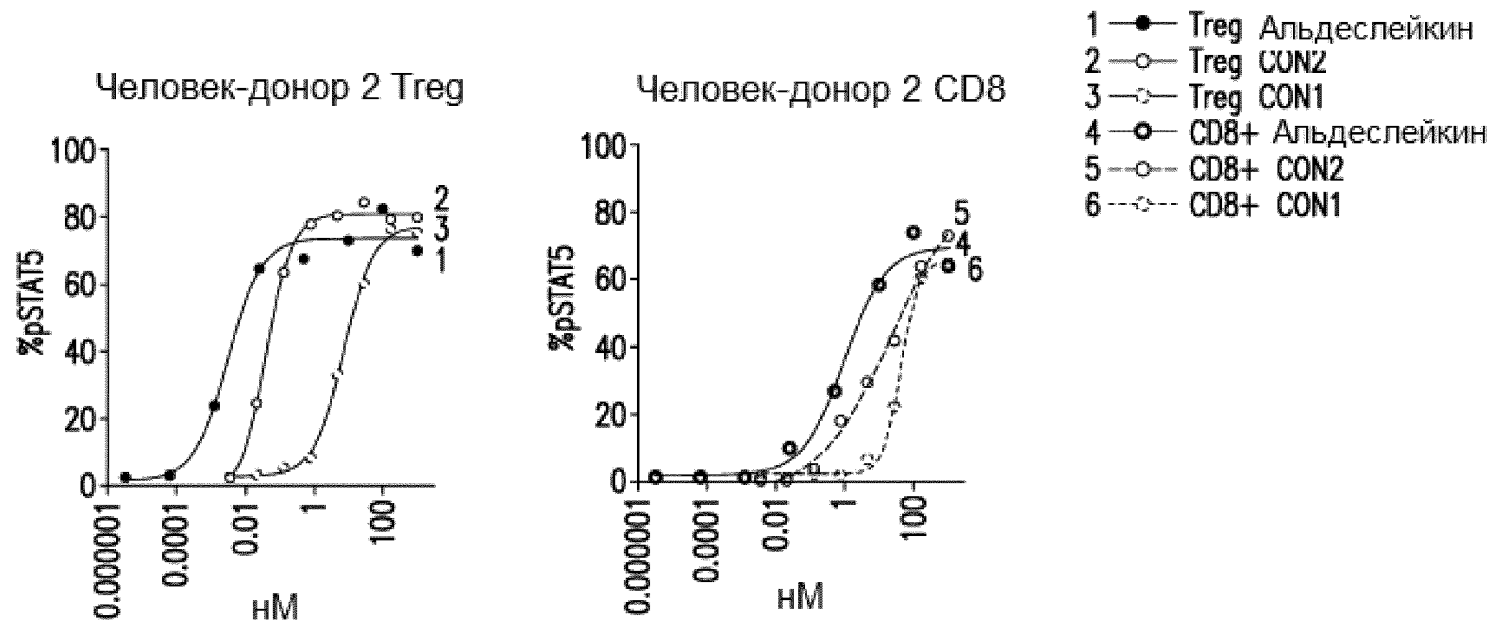




ФИГ. 3

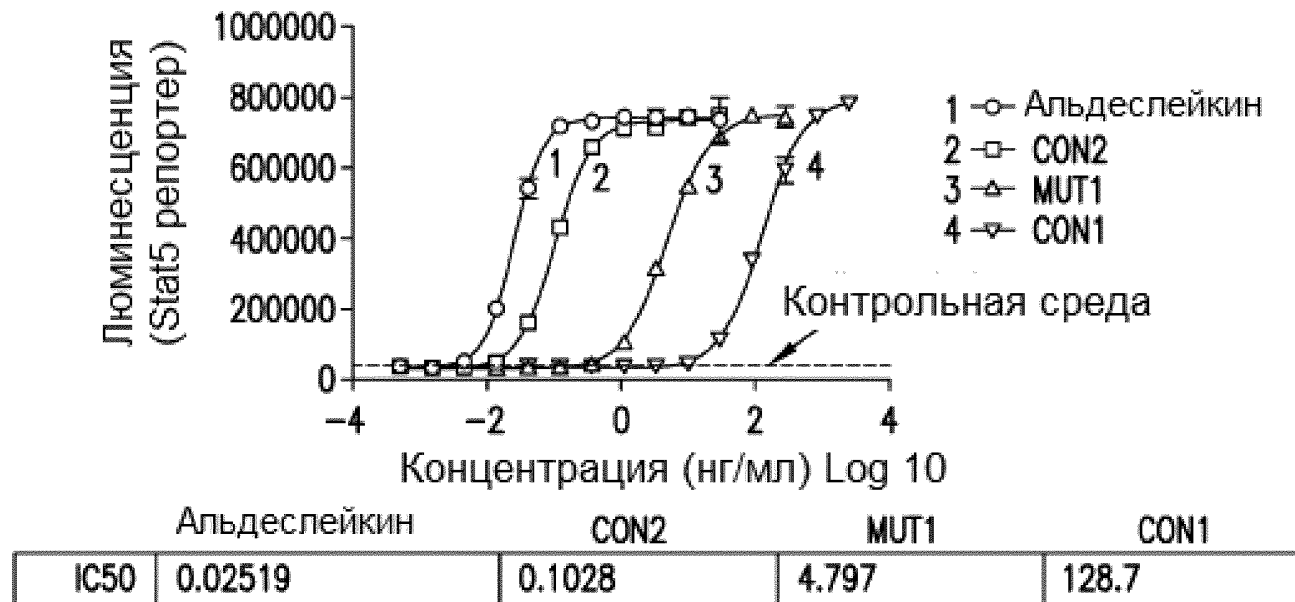


Фиг. 4А



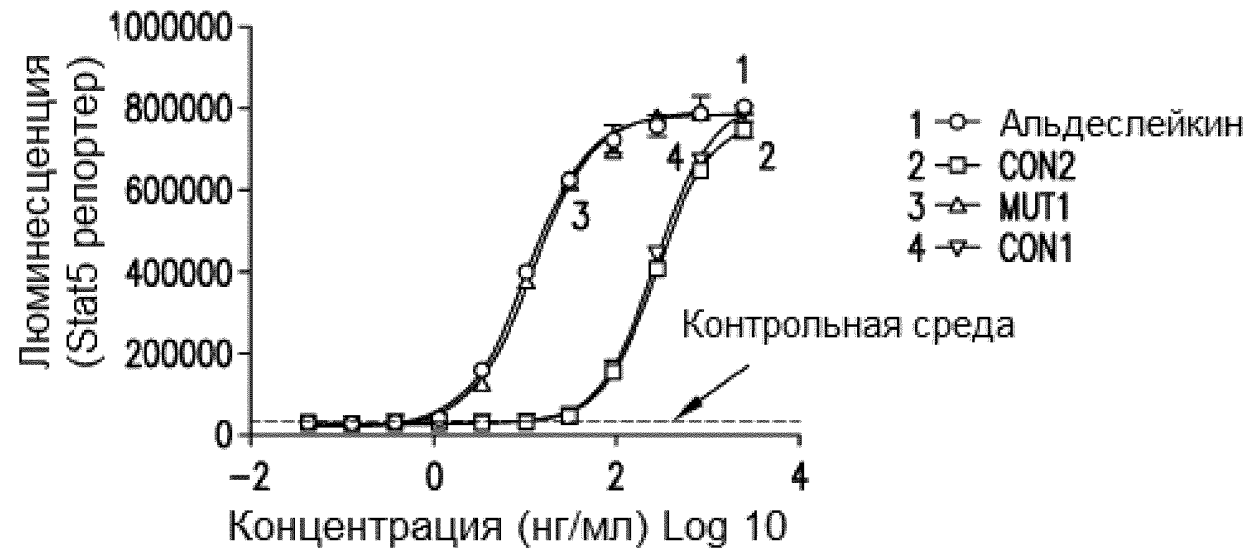
Фиг. 4В

Биоактивность CON1 относительно других соединений IL-2  
Анализ Kit225Stat5Luc



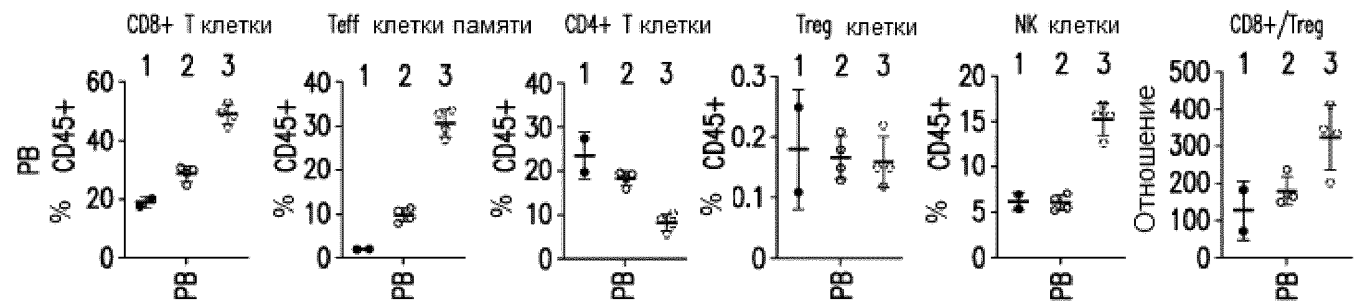
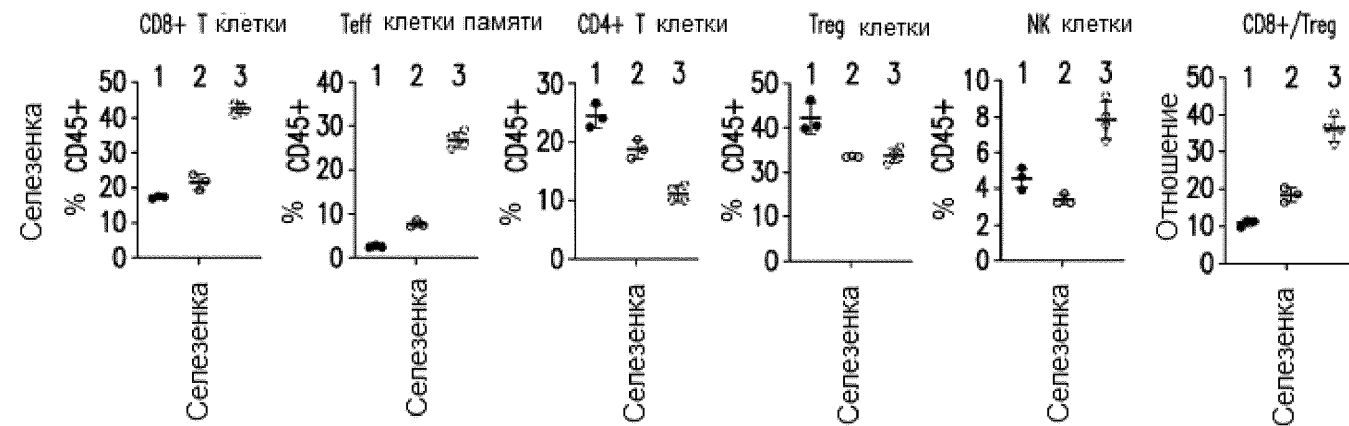
Фиг. 5А

Биоактивность CON1 относительно других соединений IL-2  
 Анализ Kit225Stat5Luc с нокаутом по CD25



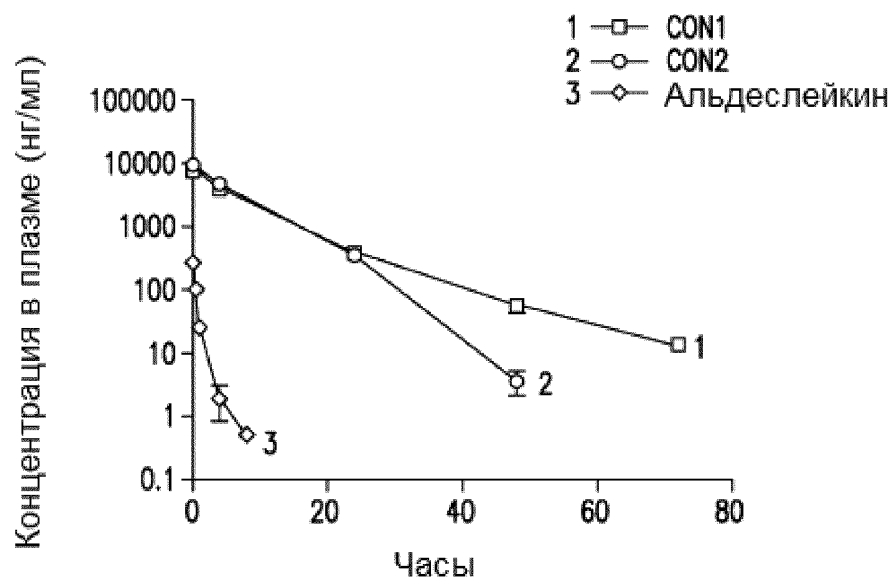
	Альдеслейкин	CON2	MUT1	CON1
IC50	10.84	269.9	12.33	270.1

Фиг. 5В

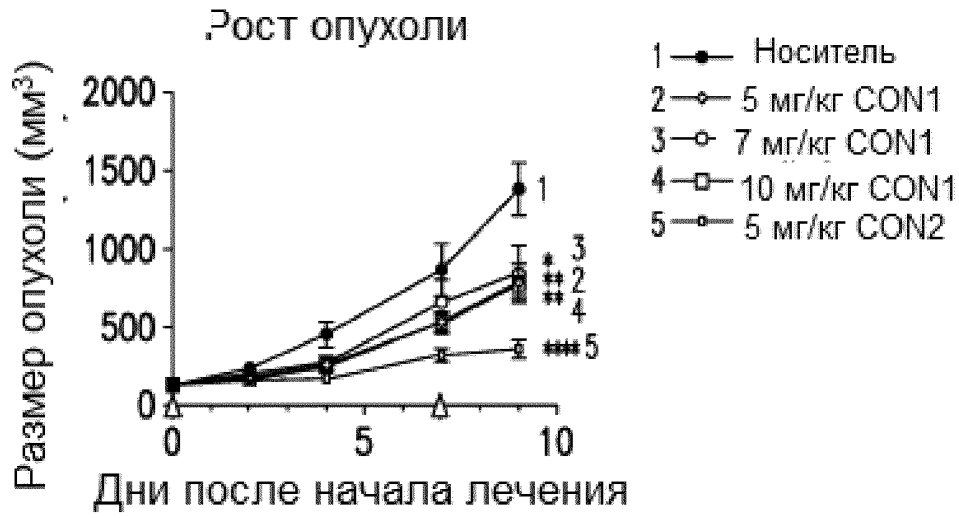


1 • Носитель  
 2 ◦ CON2 3 мг/кг  
 3 ◦ CON1 10 мг/кг

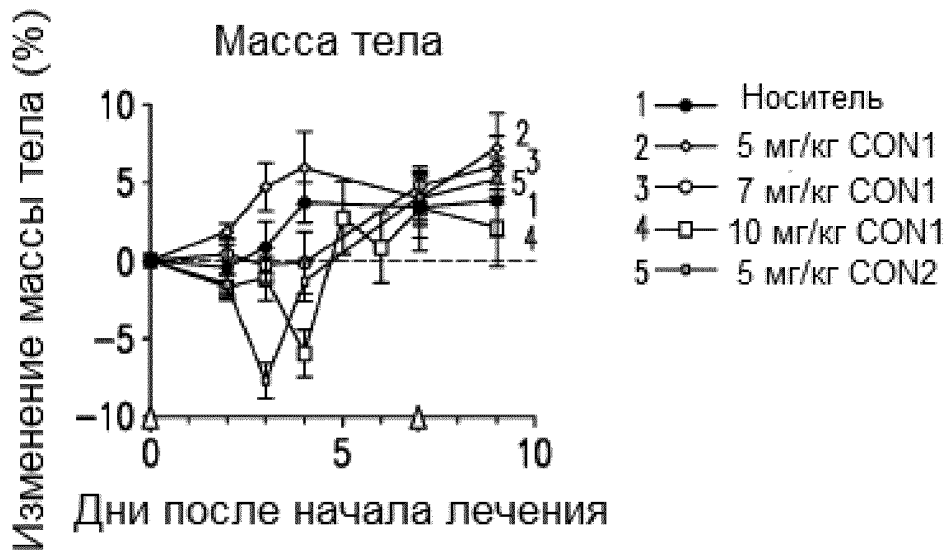
Фиг. 6



Фиг. 7

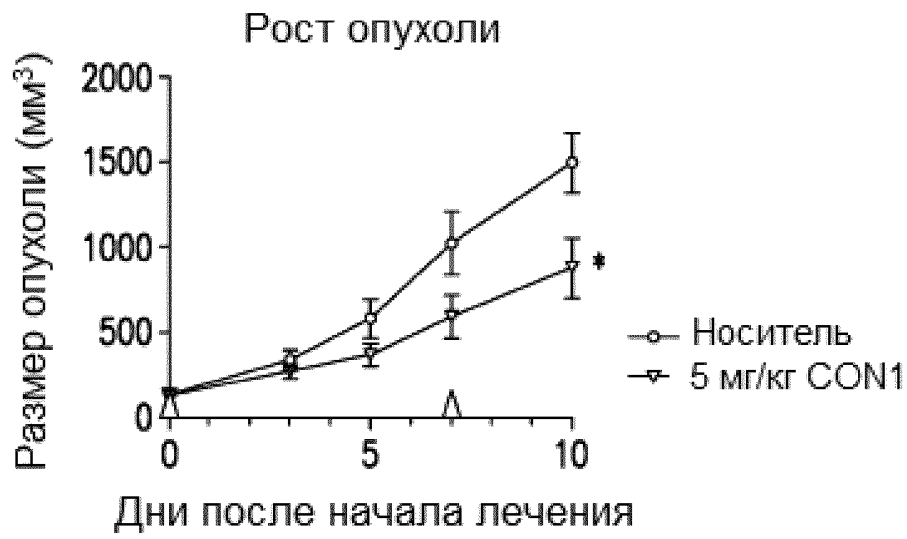


Фиг. 8А

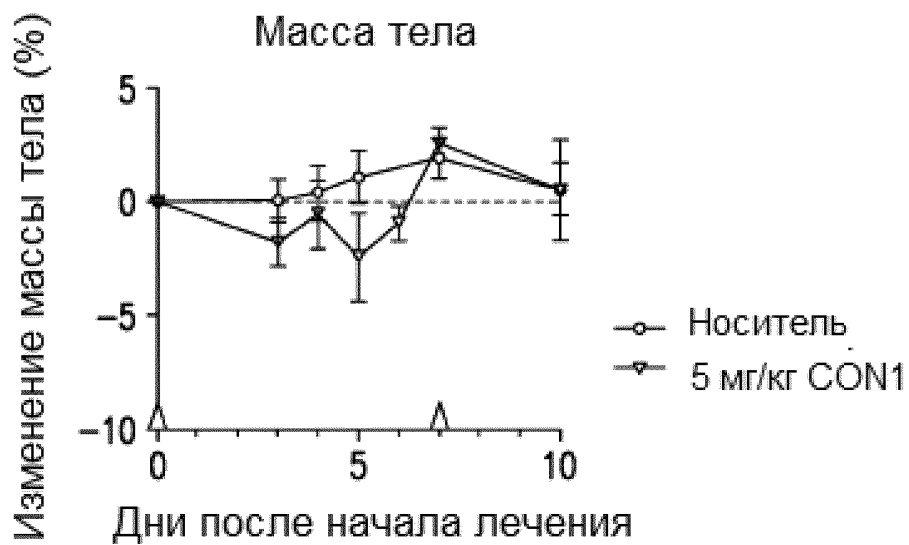


Фиг. 8В

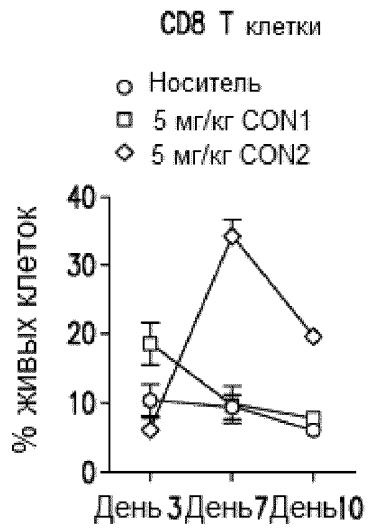




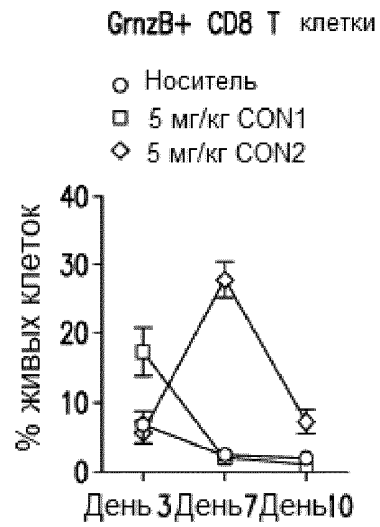
Фиг. 9А



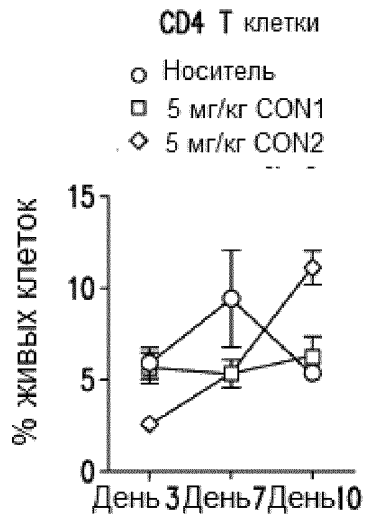
Фиг. 9В



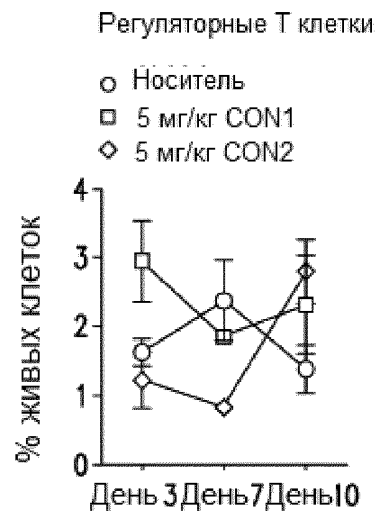
Фиг. 10А



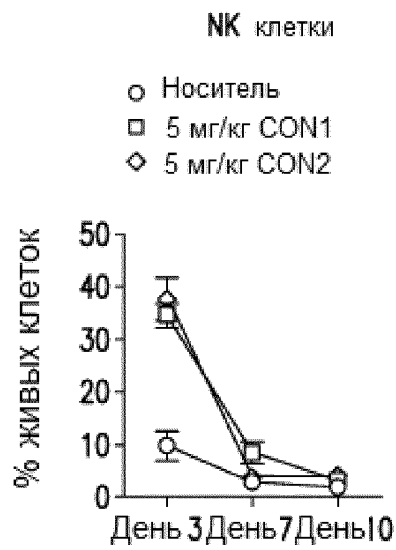
Фиг. 10В



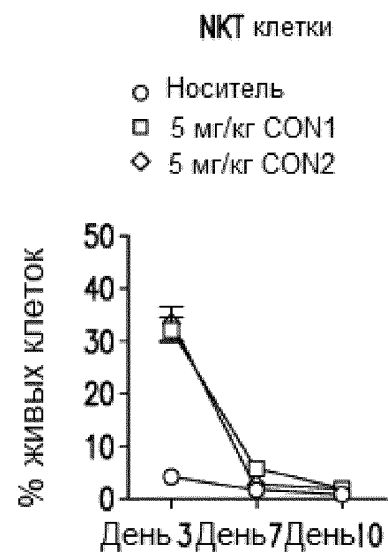
Фиг. 10С



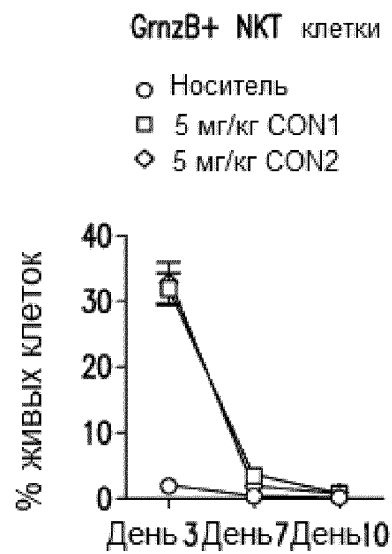
Фиг. 10D



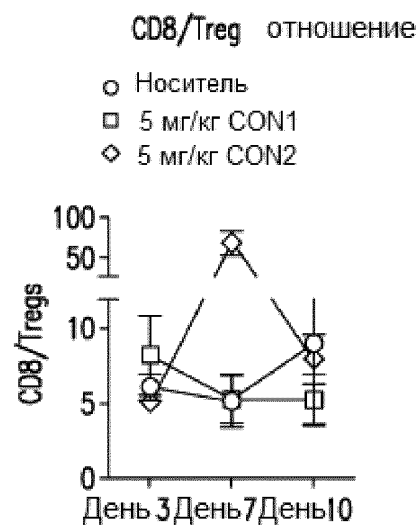
Фиг. 10Е



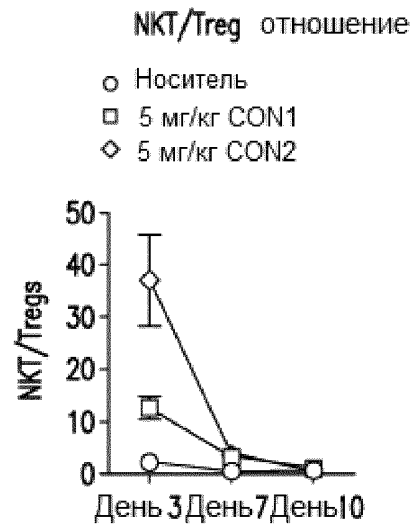
Фиг. 10F



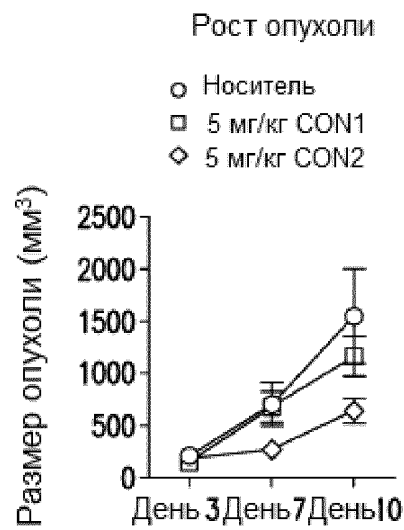
Фиг. 10G



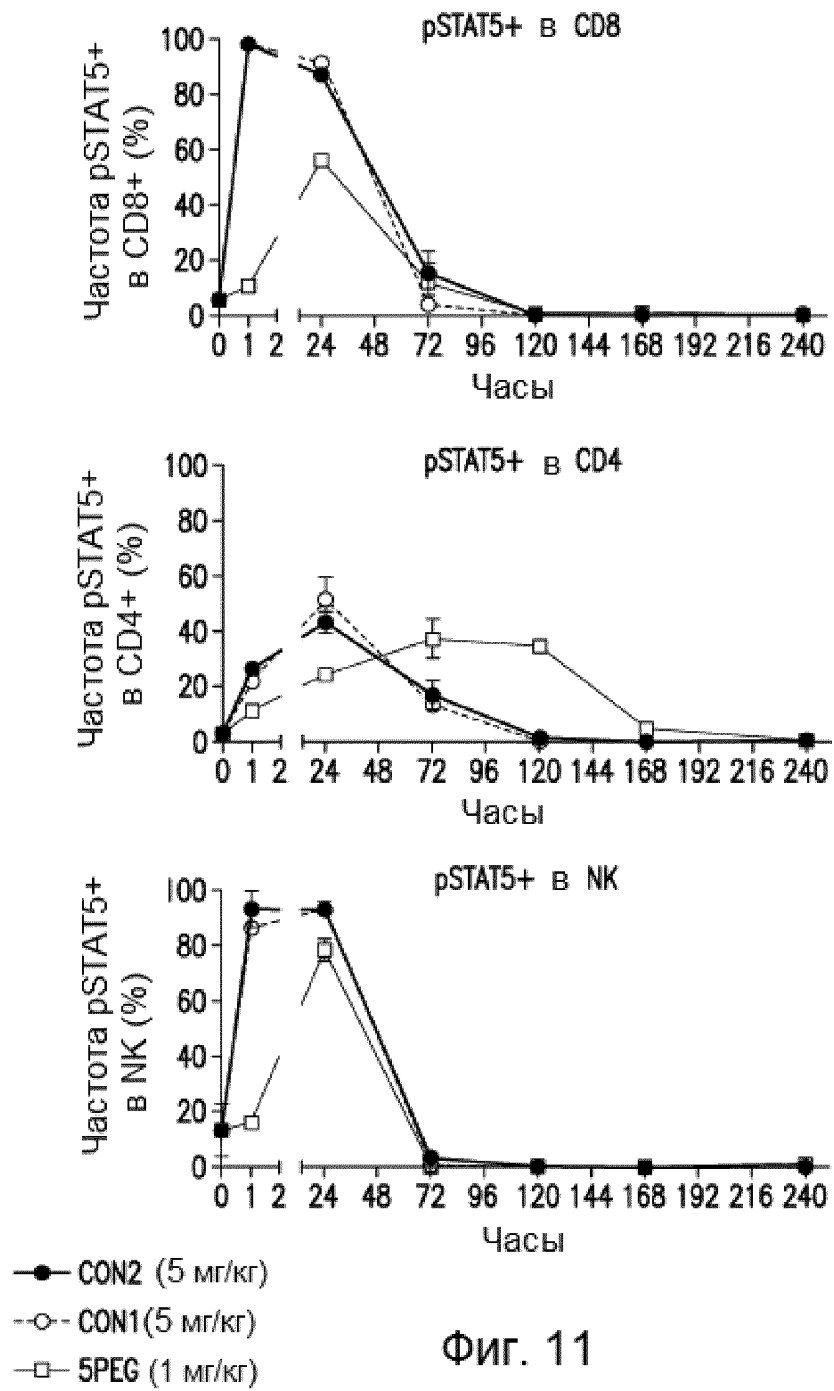
Фиг. 10H



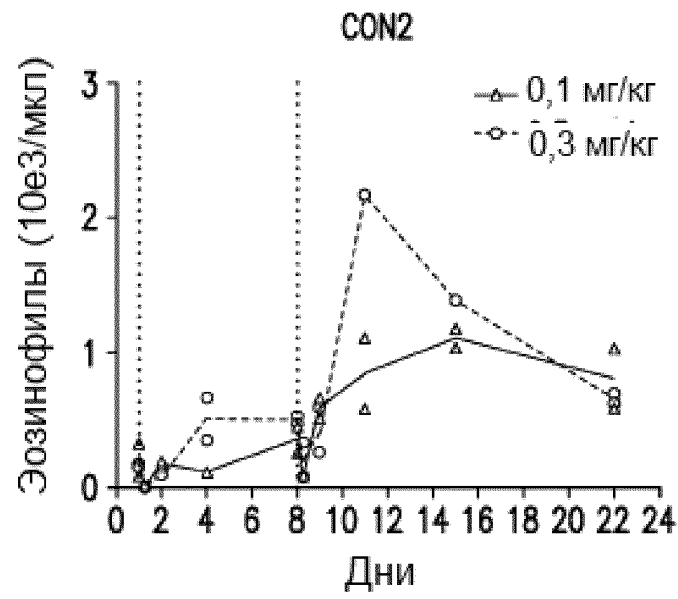
Фиг. 10I



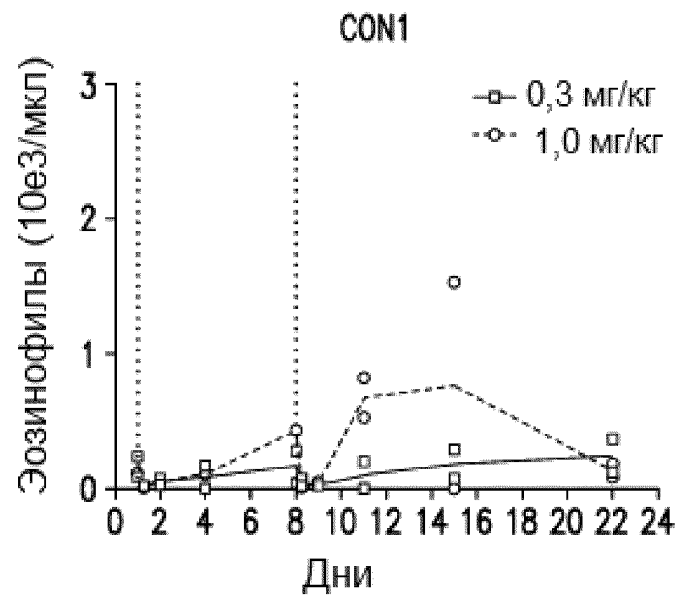
Фиг. 10J



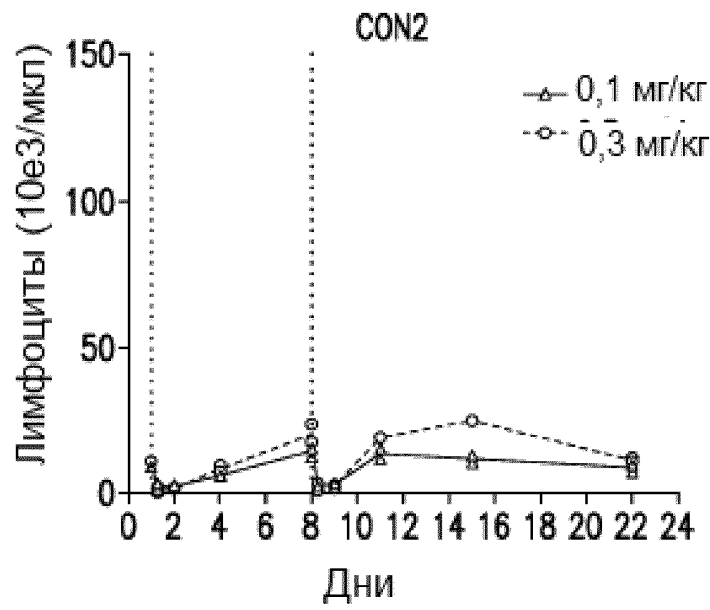
ФИГ. 11



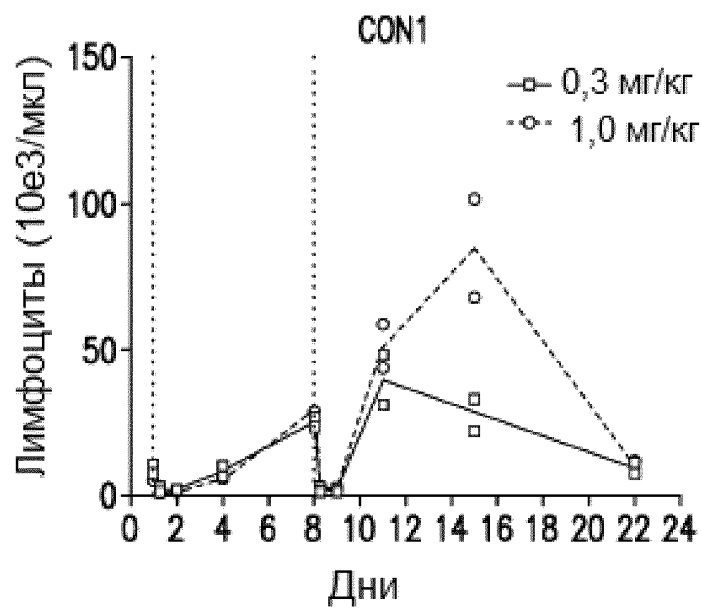
Фиг. 12А



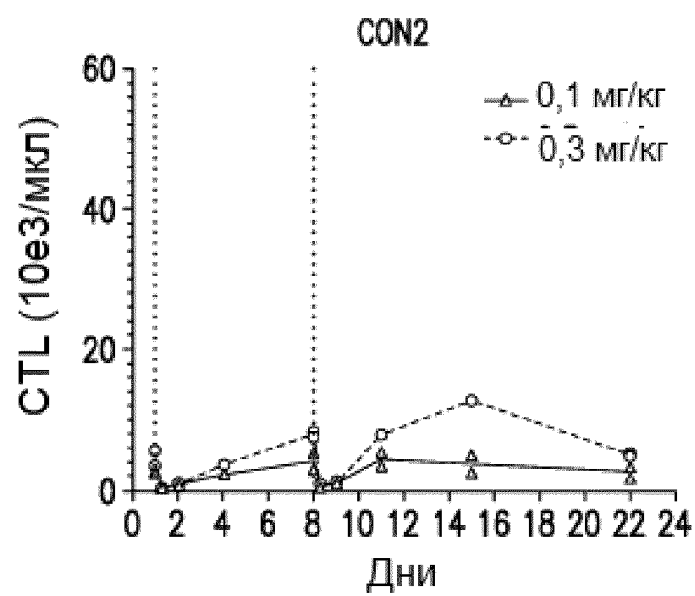
Фиг. 12В



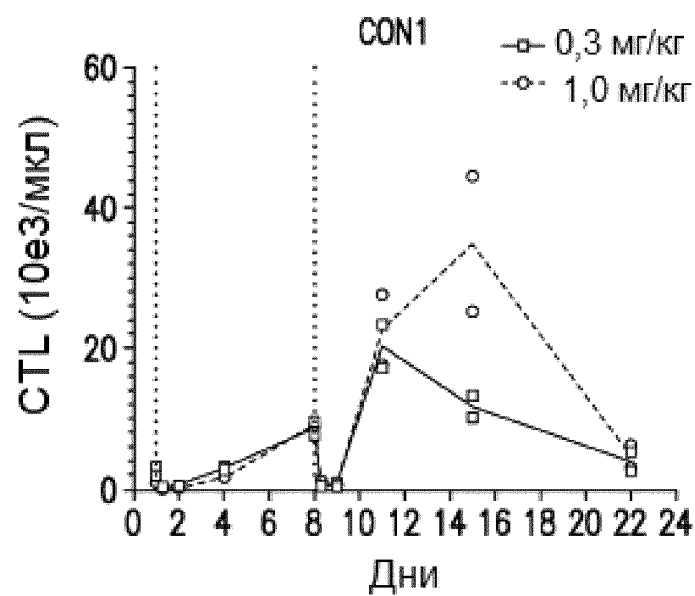
Фиг. 12С



Фиг. 12D

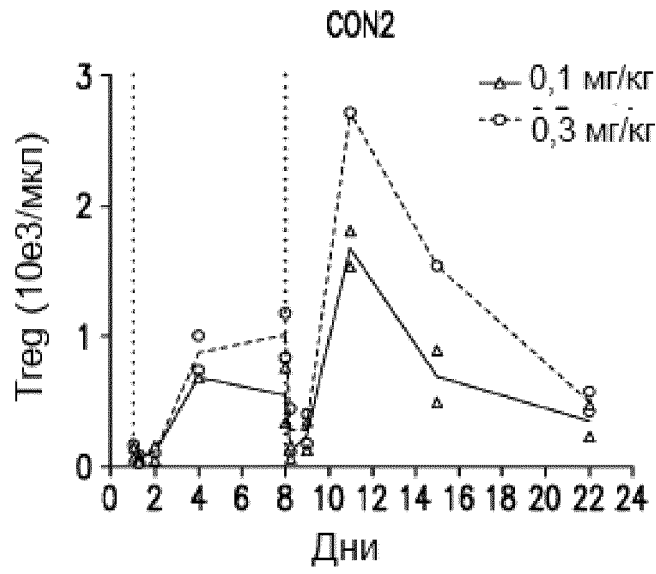


Фиг. 12Е

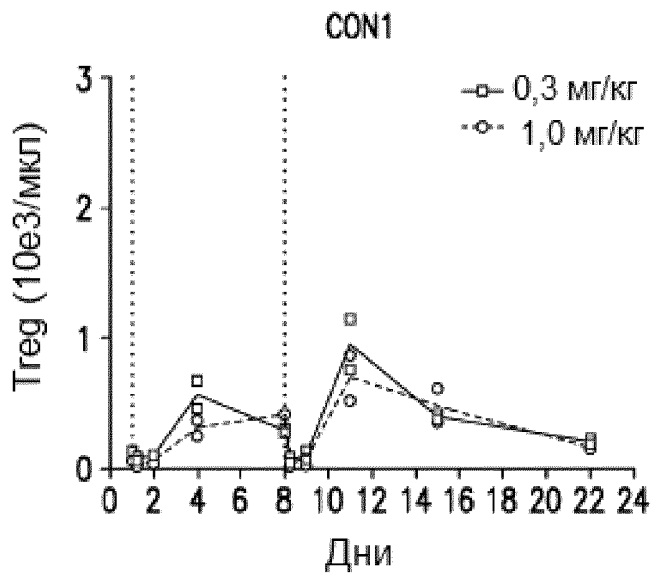


Фиг. 12F

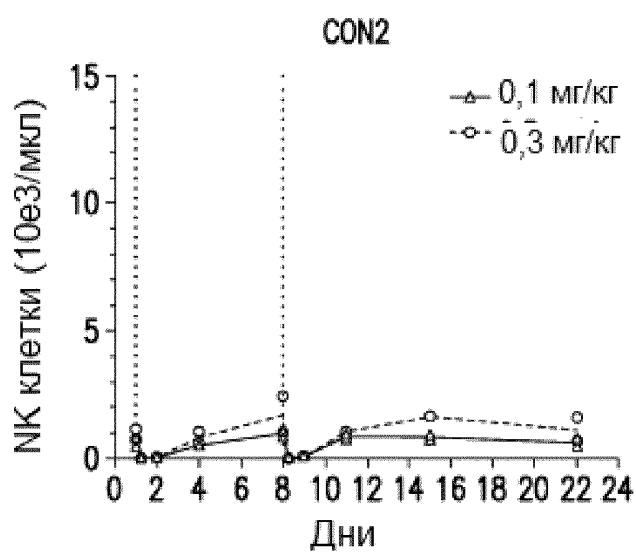




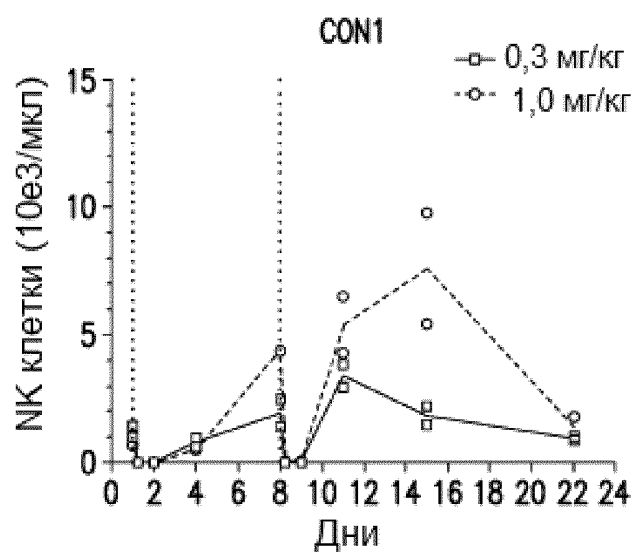
ФИГ. 12G



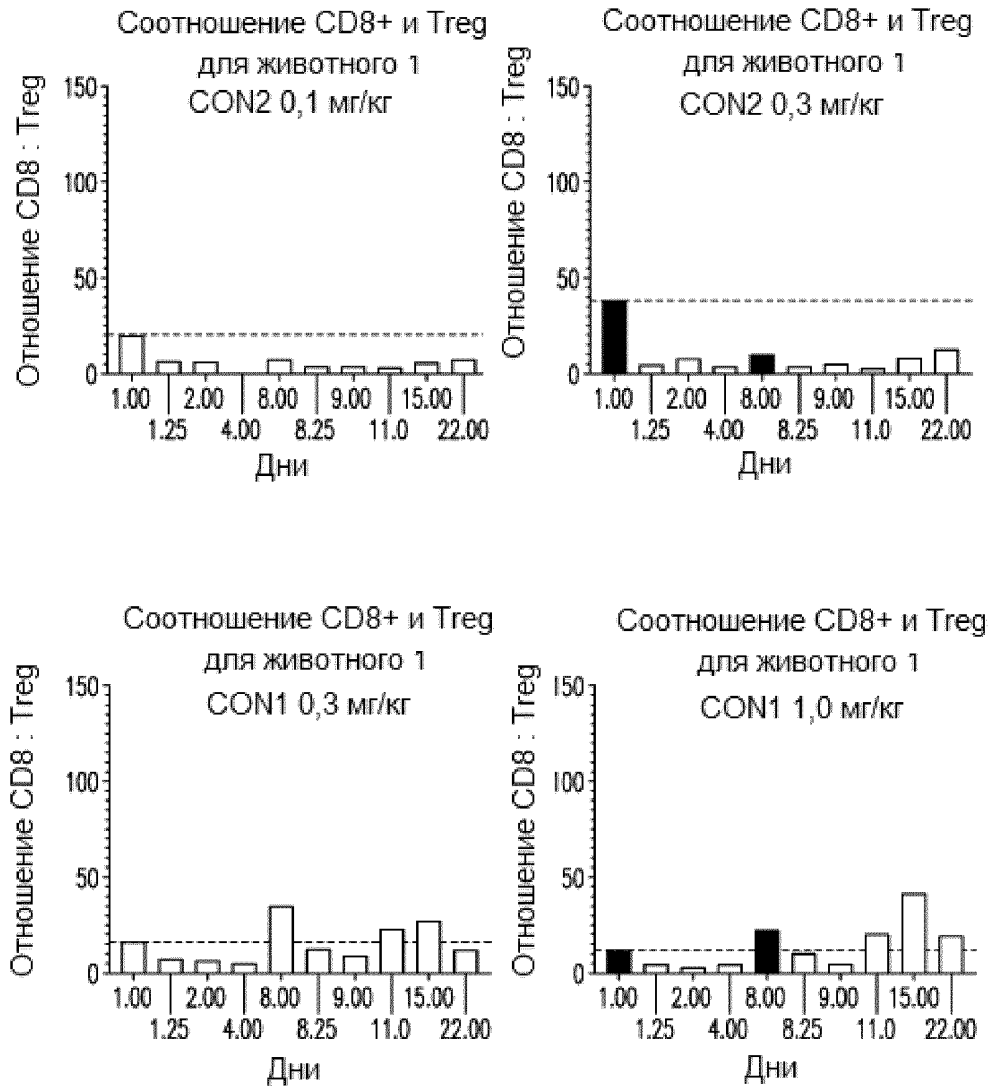
ФИГ. 12H



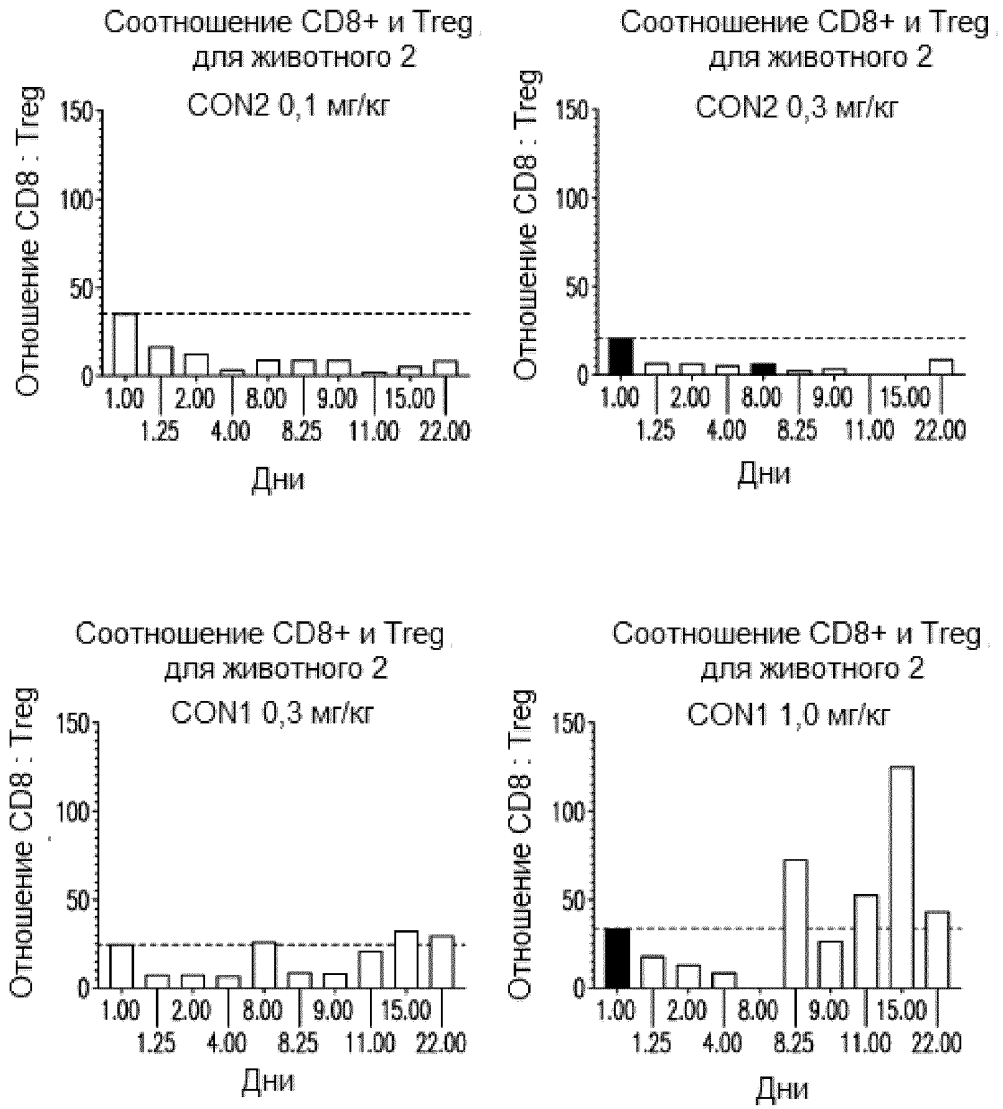
Фиг. 12I



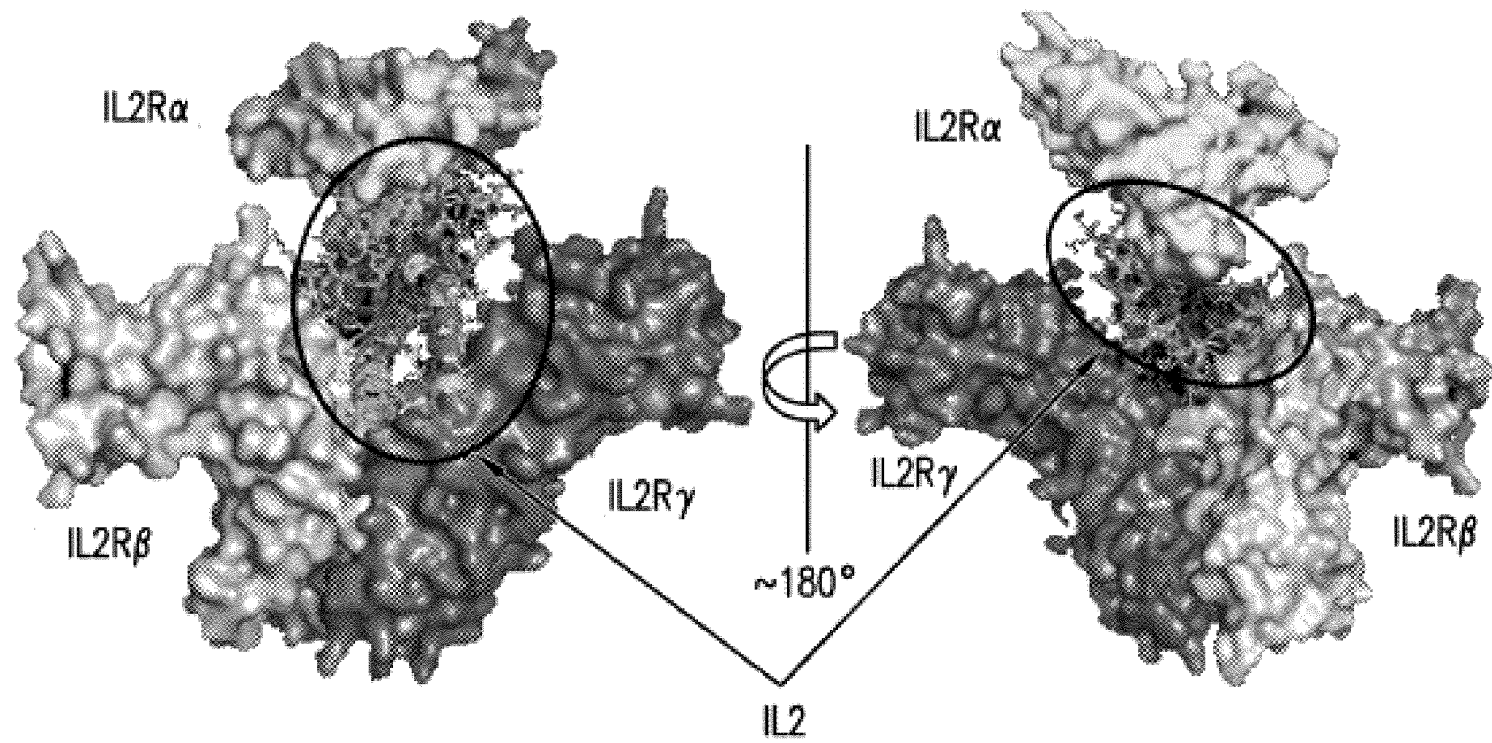
Фиг. 12J



Фиг. 13А

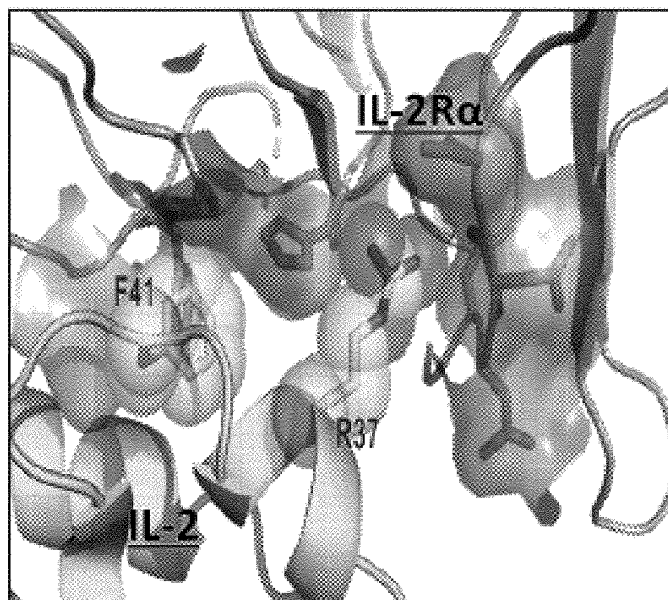


Фиг. 13В

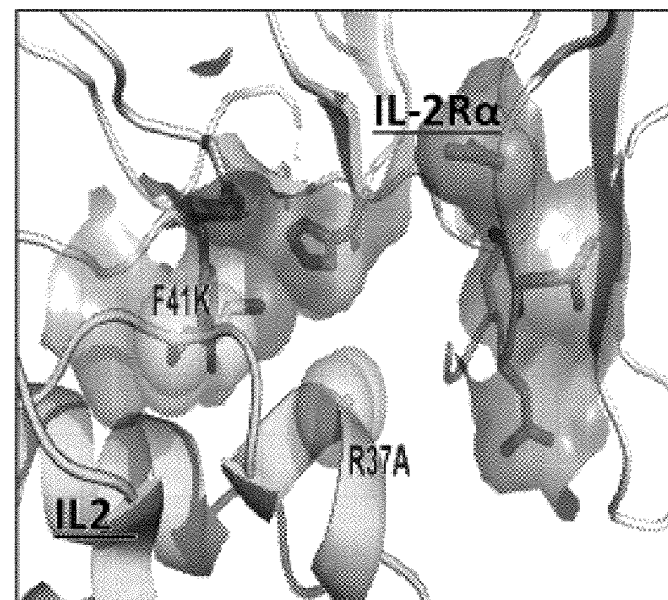


Фиг. 14А

Панель А  
Нативный IL-2 с остатками R37/F41  
на границе раздела с IL-2R $\alpha$



Панель В  
Мутантный IL-2 с заменами R37A/F41K  
на границе раздела с IL-2R $\alpha$



Фиг. 14В

Нативный IL-2 человека (зрелый)

1 2 3 4 5 6 7  
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123  
APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA

8 9 0 1 2 3  
456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123  
QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT  
(SEQ ID NO: 1)

Фиг. 15А

Альдеслейкин [нумерация по схеме А]

1 2 3 4 5 6 7  
12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012  
PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA

8 9 0 1 2 3  
345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012  
QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

(SEQ ID NO: 2)

Фиг. 15В



Альдеслейкин [нумерация по схеме В]

1 2 3 4 5 6 7  
23456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123  
PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA

8 9 0 1 2 3  
456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123  
QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

(SEQ ID NO: 2)

Фиг. 15С

CON1 [нумерация по схеме A]

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	12
PTS	<b>X</b> STKKTQLQLEHLLLDLQMI	LNGINNYKNPKLT	<b>A</b> MLT	<b>K</b> KFYMPKKATEL	KHLQC	LEEELKPLEEVL	NLA	
	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		
34567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	12	
QSKNFHLRPRDL	ISNINVIVLELKGSETTFMCEY	ADETATIVEFLNRWITFSQSI	ISTLT					

(SEQ ID NO: 20)

X представляет собой pAMF, конъюгированный с PEG1

Замены аминокислот выделены жирным и подчеркнутым шрифтом

Фиг. 15D

CON1 [нумерация по схеме B]

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	
234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	123
PTS	XSTKKTQLQLEHLLLDLQMI	LNGINNYKNPKLT	<u>AMLTK</u>	KFYMPKKATEL	KHLQCLEEELKPLEEVLNLA			
	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		
4567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	123	
QSKNFHLRPRDLISNIN	VIVLELKGSETTFMCEY	ADETATIVEFLNRWITFSQSI	ISTLT					

(SEQ ID NO: 20)

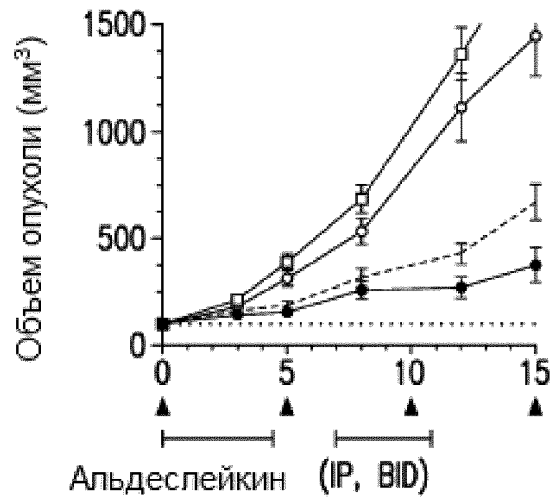
X представляет собой pAMF, конъюгированный с PEG1

Замены аминокислот выделены жирным и подчеркнутым шрифтом

Фиг. 15E

Объем опухоли  
Эффективность альдеслейкина  
+/- mDX400 в СТ26

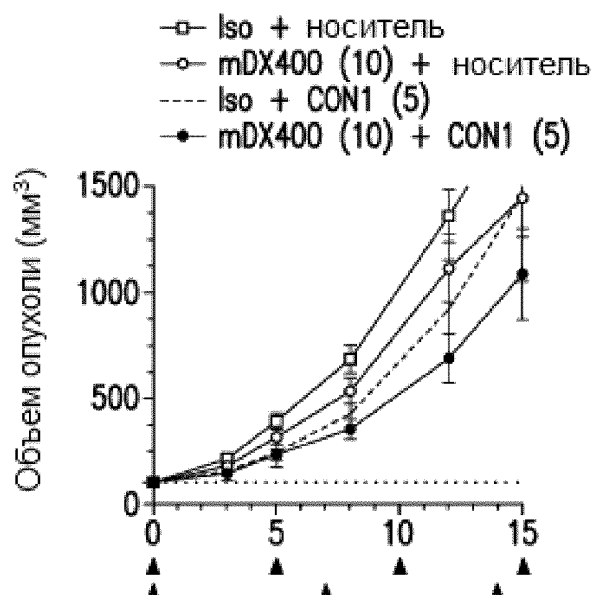
- Iso + носитель
- mDX400 (10) + носитель
- Iso + Альдеслейкин (1)
- mDX400 (10) + Альдеслейкин (1)



Лечение	Доза (мг/кг)	День 15 TGI%	CR/PR
Изотип (Iso) + носитель			
<b>Mdx400 + носитель</b>		<b>25</b>	
Iso + Альдеслейкин	1	68	1CR
<b>mDX400 + Альдеслейкин</b>	1	<b>85</b>	<b>1CR</b>

Фиг. 16А

Объем опухоли  
Эффективность CON1 5 мг/кг  
+/- mDX400 в СТ26

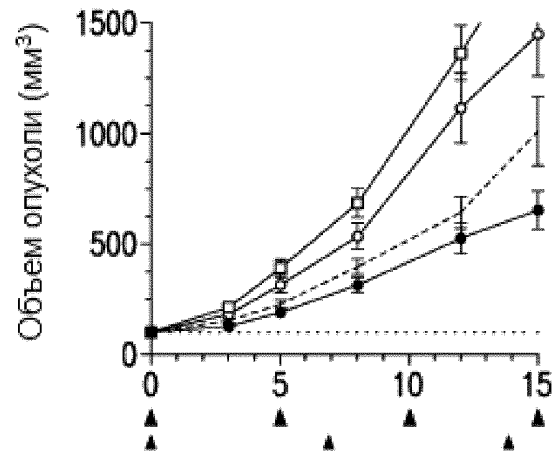


Лечение	Доза (мг/кг)	День 15 TGI%	CR/PR
Изотип (Iso) + носитель			
<b>Mdx400</b> + носитель		25	
Iso + CON1	5	24	
mDX400 + CON1	5	45	

Фиг. 16В

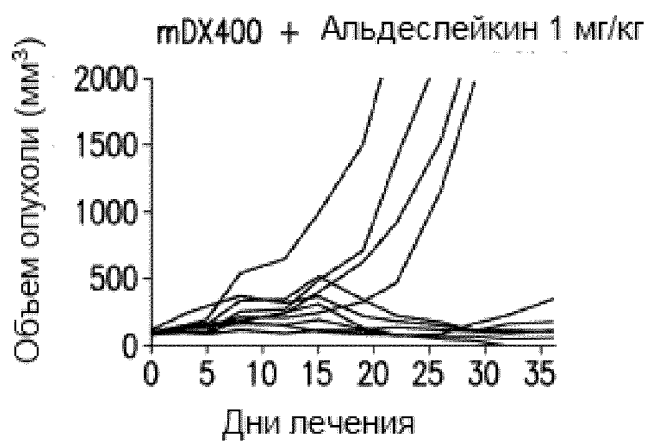
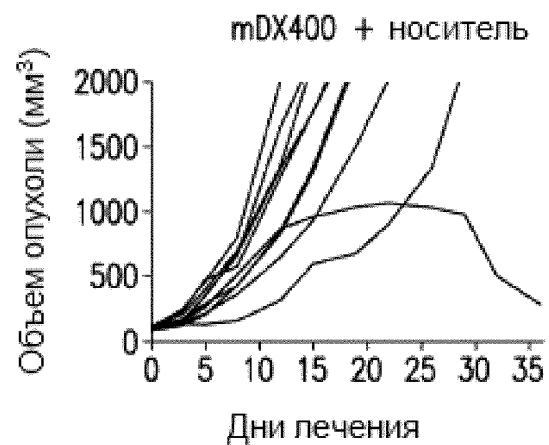
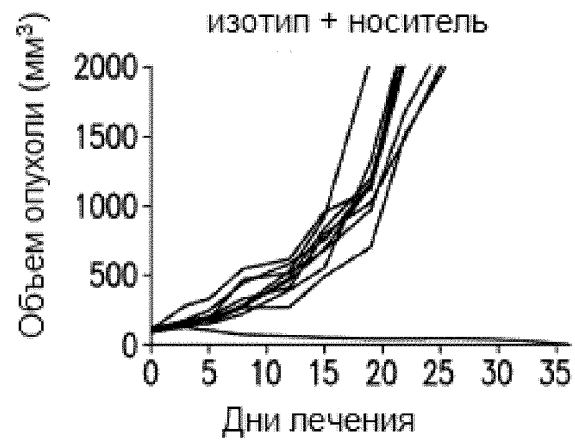
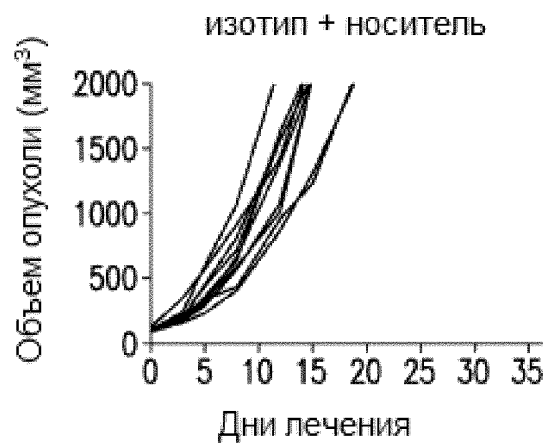
Объем опухоли  
 Эффективность CON1 10 мг/кг  
 +/- mDX400 в СТ26

- Isotype + носитель
- mDX400 (10) + носитель
- Isotype + CON1 (10)
- mDX400 (10) + CON1 (10)

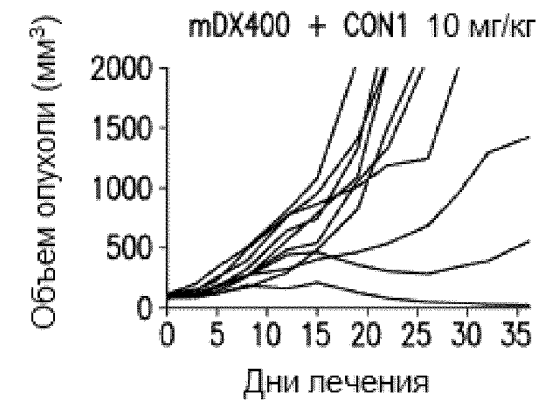
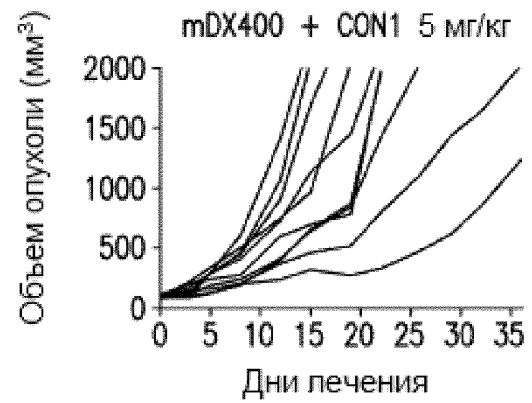
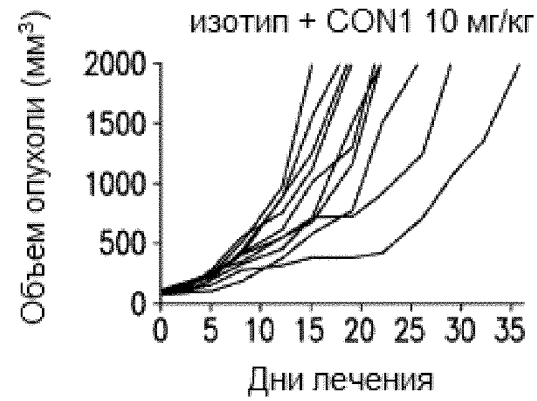
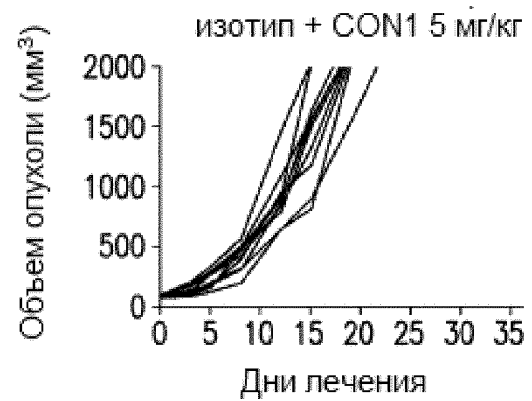


Лечение	Доза (мг/кг)	День 15 TG1%	CR/PR
Изотип (Iso) + носитель			
<b>Mdx400 + носитель</b>		<b>25</b>	
iso + CON1	10	49	
mDX400 + CON1	10	69	1PR

Фиг. 16С

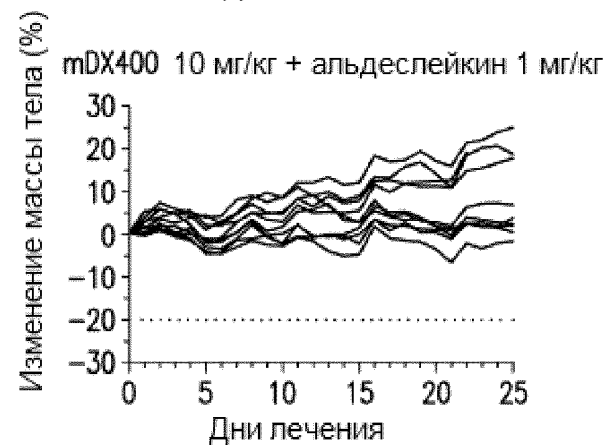
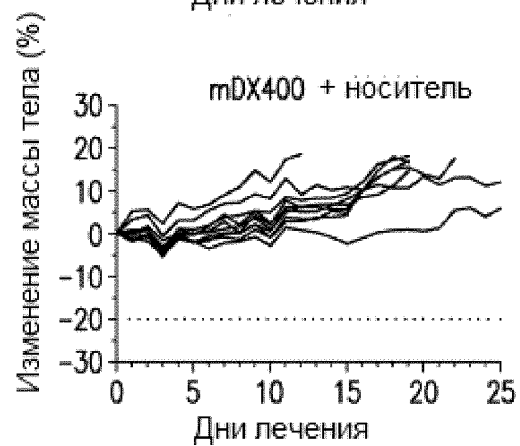
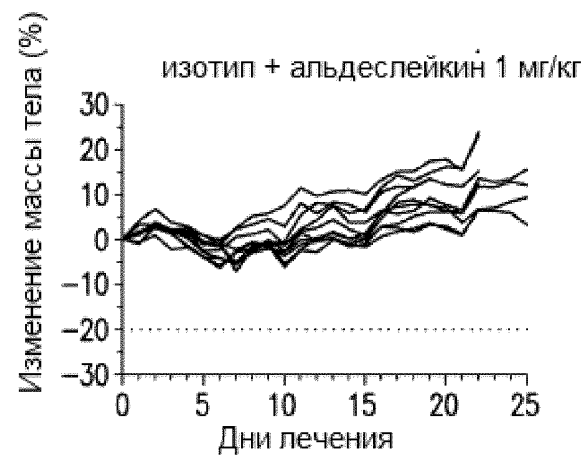
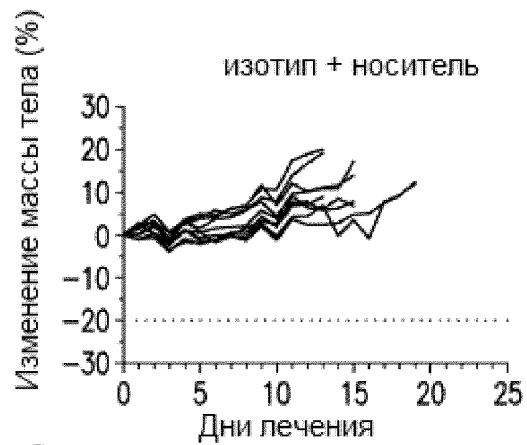


Фиг. 17А

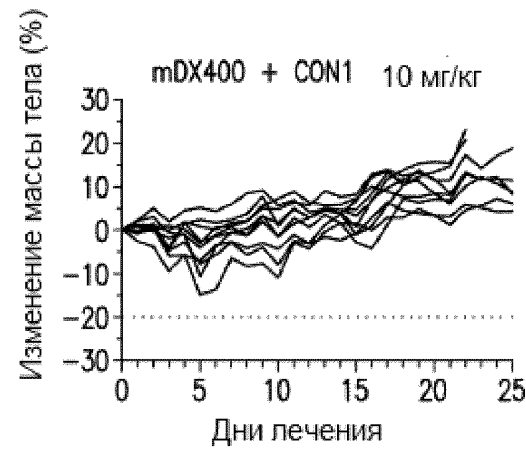
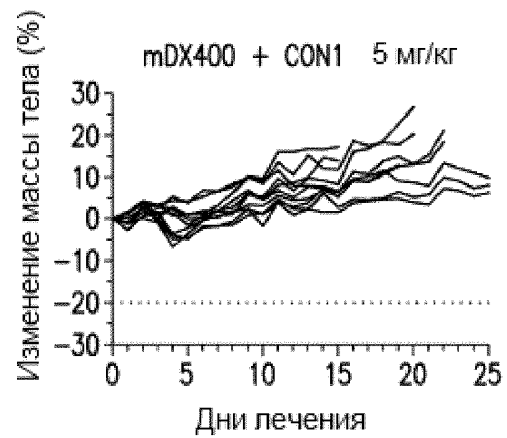
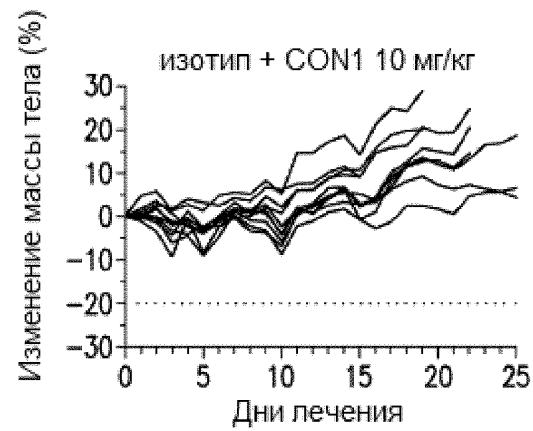
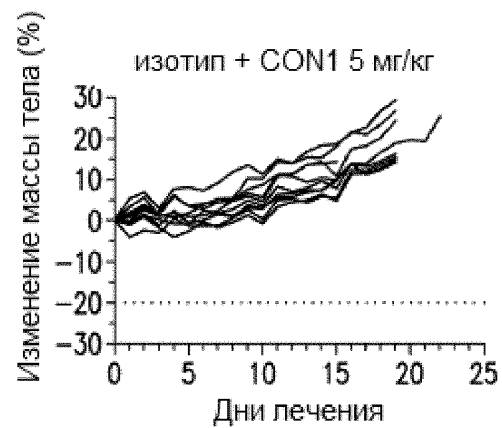


Фиг. 17В





Фиг. 18А



Фиг. 18В