

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293541** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.02.16

(22) Дата подачи заявки
2021.06.02

(51) Int. Cl. *C07K 14/55* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(54) **НОВЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ IL-2 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 20177974.1; 20202299.2; 63/116,102;
20216052.9; 21160477.2; 21162030.7

(32) 2020.06.03; 2020.10.16; 2020.11.19;
2020.12.21; 2021.03.03; 2021.03.11

(33) EP; EP; US; EP; EP; EP

(86) PCT/EP2021/064781

(87) WO 2021/245130 2021.12.09

(71) Заявитель:
**АСЦЕНДИС ФАРМА ОНКОЛОДЖИ
ДИВИЖН А/С (DK)**

(72) Изобретатель:
**Гуннарссон Нина, Малескис Матисс
(DK), Росен Давид Б. (US)**

(74) Представитель:
Квашнин В.П. (RU)

(57) Изобретение относится к последовательности белка IL-2 формулы Ala-SEQ A-Cys*-SEQ B (I), где SEQ A имеет по меньшей мере 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, SEQ B имеет по меньшей мере 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, Ala представляет собой остаток аланина и Cys* представляет собой остаток цистеина, к его конъюгатам и их применению для лечения рака.

A1

202293541

202293541

A1

НОВЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ IL-2 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к последовательности белка IL-2 формулы Ala – SEQ A – Cys* – SEQ B (I), где SEQ A имеет по меньшей мере 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO:1, SEQ B имеет по меньшей мере 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO:2, Ala представляет собой остаток аланина, и Cys* представляет собой остаток цистеина, к их конъюгатам и их применениям для лечения нарушений пролиферации клеток.

У здоровых людей иммунная система часто может различать здоровые клетки и раковые клетки. После идентификации данной клетки как раковой иммунная система обычно устраняет ее. Однако, когда иммунная система нарушена, например, при острых или хронических нарушениях или подавленном состоянии, рак может развиваться в результате неспособности ослабленной иммунной системы дифференцировать, а затем устранять раковые клетки. У пациента, страдающего раком, введение пациенту иммуномодулирующего белка может помочь активировать иммунную систему этого пациента, так что способность иммунной системы устранять раковые клетки увеличивается. У пациента, страдающего вирусной инфекцией, введение ему иммуномодулирующего белка может помочь активировать иммунную систему этого пациента, так что способность иммунной системы устранить вирусную инфекцию будет усилена. Точно так же даже у здорового пациента иммунный ответ на вакцину можно усилить добавлением таких иммуномодулирующих белков.

пациентов, страдающих некоторыми видами рака, является интерлейкин-2 (IL-2). IL-2 играет центральную роль в образовании, дифференцировке, выживании и гомеостазе иммунных эффекторных клеток. IL-2 синтезируется активированными CD4+ хелперными Т-клетками, и посредством дифференциального взаимодействия рецепторов IL-2 может модулировать иммунный ответ в сторону иммунитета или толерантности.

IL-2 действует путем связывания с рецепторами IL-2 (IL-2R). Ассоциация субъединиц α -(CD25), β -(CD122) и в общем γ -(γ c, CD132) приводит к образованию тримерного высокоаффинного IL-2R. Димерный промежуточный аффинный IL-2R $\beta\gamma$ состоит из β -и γ -субъединиц и связывает IL-2 с аффинностью в 50 раз ниже. CD25 не требуется для передачи сигналов IL-2, но обеспечивает высокую аффинность связывания

тримерного рецептора, тогда как β -и γ -субъединицы опосредуют передачу сигнала. IL-2R $\beta\gamma$ экспрессируется на NK-клетках, моноцитах, макрофагах, $\gamma\delta$ T-клетках и покоящихся CD4⁺ и CD8⁺ T-клетках, в то время как IL-2R $\alpha\beta\gamma$ транзистентно индуцируется на активированных T-и NK-клетках и конститутивно экспрессируется на T-регуляторных клетках, а также врожденных лимфоцитах 2 типа (ILC2), эозинофилах и эндотелиальных клетках. Способность IL-2 расширяться и активировать врожденные и адаптивные эффекторные клетки является основой его противоопухолевой активности.

У пациентов IL-2 может стимулировать противоопухолевую эффективность, характеризующуюся увеличением цитотоксических лимфоцитов, включая эффекторные T-и NK-клетки, при введении в высоких дозах (например, 600 000–720 000 МЕ/кг массы тела три раза в день в течение до 14 доз за цикл для человека). Предположительно во время этой терапии все T-клетки стимулируются IL-2 после введения высоких доз, и когда цикл терапии заканчивается, а также в более поздние моменты времени после любой индивидуальной дозы и снижения уровня в какой-то момент времени IL-2 станет ограничивающим, и T-регуляторные (Treg) клетки, экспрессирующие IL-2R $\alpha\beta\gamma$, будет превосходить эффекторные T-клетки, экспрессирующие IL-2R $\beta\gamma$ для оставшегося IL-2 дикого типа.

Однако противоопухолевый иммунитет IL-2 ограничен по дозе тяжелыми сердечно-сосудистыми, легочными, печеночными, желудочно-кишечными, неврологическими и гематологическими побочными эффектами, поэтому его назначают только пациентам в специализированных центрах. Многие из этих нежелательных явлений характеризуются синдромом сосудистой утечки (VLS), также известным как синдром капиллярной протечки. Существует несколько предполагаемых механизмов возникновения VLS, многие из которых включают взаимодействие между клетками, экспрессирующими IL-2 дикого типа и IL-2R $\alpha\beta\gamma$, такими как ILC2, эозинофилы и эндотелиальные клетки.

Эффекторные CD4⁺ T-клетки, CD8⁺ T-клетки, $\gamma\delta$ T-клетки, в частности V γ 9V δ 2 T-клетки, и NK-клетки, которые значительно усиливают противоопухолевый иммунный ответ, предпочтительно экспрессируют IL-2R $\beta\gamma$ форму IL-2R. Таким образом, можно ожидать, что введение соединений, которые связываются с и являются агонистами IL-2R $\beta\gamma$, будет усиливать иммунный ответ против опухолей (например, путем увеличения пролиферации и активности действия CD4⁺ T-клеток, CD8⁺ T-клеток, $\gamma\delta$ T-клеток, в частности V γ 9V δ 2 T-клеток, и NK-клеток).

Таким образом, введение селективных агонистов IL-2R $\beta\gamma$ (имеющих пониженное связывание или не имеющих связывание с IL-2R α или повышенное связывание с IL-2R $\beta\gamma$)

будет полезным для пациентов, страдающих определенными видами рака, поскольку ожидается, что это снизит системные побочные эффекты синдрома пропотевания жидкости из сосудов, такие как отек легких, обеспечивая улучшенное терапевтическое окно.

Одним из способов синтеза такого несимметричного IL-2, т.е. белка IL-2, который преимущественно связывается с IL-2R $\beta\gamma$, является мутация определенной аминокислоты, участвующей в связывании с IL-2R α , например, путем замены ее цистеином. Такой цистеин можно необязательно использовать для конъюгации с ним определенных фрагментов, что может еще больше усилить сдвиг не-IL-2R α связывания.

Однако получение белков, таких как IL-2, с дополнительным цистеином может быть проблематичным, поскольку такие белки могут иметь тенденцию к агрегации, и может быть трудно или невозможно обеспечить надлежащую ренатурацию такого белка с достаточным качеством и в достаточных количествах.

Поэтому задача настоящего изобретения состоит в по меньшей мере частичном преодолении вышеуказанного недостатка.

Эта задача решается посредством последовательности белка IL-2 формулы (I)

Ala – SEQ A – Cys* – SEQ B (I),

где

SEQ A имеет по меньшей мере 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO:1,

SEQ B имеет по меньшей мере 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO:2,

Ala представляет собой остаток аланина, и

Cys* представляет собой остаток цистеина.

Неожиданно было обнаружено, что добавление N-концевого остатка аланина значительно повышает выход, когда такой белок IL-2 экспрессируется в виде растворимого белка, например, в системе экспрессии млекопитающих или в системе экспрессии дрожжей, по сравнению с соответствующим IL-2 без такого N-концевого аланина. Цистеин, отмеченный звездочкой, может быть свободным цистеином, т. е. цистеином, в котором тиол не является частью дисульфидной связи, или он может быть связан с тиолсодержащим соединением, таким как цистеин, через дисульфидный мостик.

Такой IL-2 формулы (I) может представлять собой несимметричный IL-2.

В рамках настоящего изобретения используются термины, имеющие следующее значение.

В общем, термин «интерлейкин-2» или «IL-2» относится ко всем белкам IL-2, предпочтительно белкам видов млекопитающих, более предпочтительно белкам видов приматов и наиболее предпочтительно белкам человека, а также к их вариантам, аналогам, ортологам, гомологи и их производным и фрагментам, которые характеризуются тем, что играют центральную роль в генерации, выживании и гомеостазе лимфоцитов, и также включает встречающиеся в природе варианты IL-2, например, варианты сплайсинга или аллельные варианты. В контексте настоящего изобретения термины «интерлейкин-2» и «IL-2» относятся к белку, имеющему последовательность формулы (I).

В контексте настоящего изобретения термин «несимметричный IL-2» относится к модифицированному IL-2, в котором соотношение K_D указанного несимметричного IL-2 к IL-2R α и K_D указанного несимметричного IL-2 к IL-2R β выше соотношения K_D альдеслейкина согласно SEQ ID NO:15 к IL-2R α и K_D альдеслейкина к IL-2R β . Это описывается следующей формулой:

$$\frac{\text{Соотношение}_{\text{несимметричный IL-2}}}{\text{Соотношение}_{\text{альдеслейкин}}} > 1$$

где

$$\text{Соотношение}_{\text{несимметричный IL-2}} = \frac{K_D \text{ несимметричный IL-2 к IL-2R}\alpha}{K_D \text{ несимметричный IL-2 к IL-2}\beta}$$

$$\text{Соотношение}_{\text{альдеслейкин}} = \frac{K_D \text{ альдеслейкин к IL-2R}\alpha}{K_D \text{ альдеслейкин к IL-2}\beta}$$

где

« K_D несимметричного IL-2 к IL-2R α » представляет собой K_D несимметричного IL-2 к IL-2R α ,

« K_D несимметричного IL-2 к IL-2R β » представляет собой K_D несимметричного IL-2 к IL-2R β ,

« K_D альдеслейкин к IL-2R α » представляет собой K_D альдеслейкина к IL-2R α , и

« K_D альдеслейкин к IL-2R β » представляет собой K_D альдеслейкина к IL-2R β .

Альдеслейкин (SEQ ID NO:15) имеет следующую последовательность:

PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELKHL
QCLEEELKPLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF
LNRWITFSQSIISTLT

Аффинность/кинетика связывания, необходимая для определения K_D несимметричного IL-2 к IL-2R α , K_D несимметричного IL-2 к IL-2R β , K_D альдеслейкина к IL-2R α и K_D альдеслейкина к IL-2R β может быть оценена с использованием

поверхностного плазмонного резонанса (SPR), измеренного на приборе Biacore (GE Healthcare) следующим образом: поверхность для захвата Fc человека на чипе CM5 (или, альтернативно, C1 или CM4) получают ковалентным покрытием антителом против Fc человека, или альтернативно применяют чип с белком А. Затем на чипе иммобилизуют IL-2R β -Fc или IL2-R α -Fc. Для измерения аффинности/кинетических констант производят серийные разведения аналитов, начиная, например, от 1 до 2 мкМ или от 20 до 500 нМ для соединений IL-2. Каждый аналит подвергается воздействию модифицированного рецептором чипа в течение подходящего периода времени, например, от 1 до 30 минут, который может составлять, например, 2 минуты или может составлять 3 минуты, а затем смывают в течение подходящего периода времени, например, от 2 до 60 минут, что может составлять, например, 10 минут. Полученные кривые связывания из серии разведений соответствуют кинетической модели 1:1 для корреляции наблюдаемых единиц ответа (R) с константами скорости ассоциации и диссоциации, k_a и k_d :

$$R = \frac{k_a C R_{\max}}{k_a C + k_d} \times (1 - e^{-(k_a C + k_d)t})$$

где

t означает время,

C означает концентрацию аналита, и

R_{\max} означает максимальную связывающую способность поверхности.

При определении с помощью кинетической модели 1: 1 соотношение скоростей диссоциации и ассоциации дает равновесную константу диссоциации K_D .

В качестве альтернативы, полученные кривые связывания из серии разведений соответствуют модели взаимодействия в стационарном состоянии 1: 1, на основе которой вычисляют K_D для взаимодействия 1: 1 из графика уровней связывания в стационарном состоянии (R_{eq}) в зависимости от концентрации аналита (C):

$$R_{eq} = \frac{C \times R_{\max}}{K_D + C}$$

где

R_{eq} означает уровень связывания в стационарном состоянии,

C означает концентрацию аналита, и

R_{\max} означает максимальную связывающую способность поверхности.

Понятно, что не каждый метод расчета может быть возможным для каждой несимметричной молекулы IL-2. Если, например, реакции протекают слишком быстро, может оказаться невозможным использовать кинетическую модель 1: 1, а модель взаимодействия в стационарном состоянии 1: 1 может применяться. Если, например, не

достигается равновесие, может оказаться невозможным использовать модель взаимодействия 1: 1, а кинетическая модель 1: 1 может применяться.

В контексте настоящего изобретения термин «аффинность» относится к силе суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (таким как рецептор) и ее партнером по связыванию (таким как лиганд). Если не указано иное, в контексте настоящего изобретения «аффинность» относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1: 1 между членами пары связывания (например, между рецептором и лигандом). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно можно представить с помощью равновесной константы диссоциации (K_D), которая представляет собой отношение констант скорости диссоциации и ассоциации (k_d и k_a , соответственно), измеренных в состоянии равновесия. Таким образом, эквивалентные аффинности могут включать разные константы скорости, пока соотношение констант скорости остается неизменным. Аффинность можно измерить хорошо зарекомендовавшими себя методами, известными в данной области техники, включая описанные в настоящем документе.

В контексте настоящего изобретения термины « α -субъединица рецептора IL-2» и «IL-2R α » относятся к человеческому CD25.

В контексте настоящего изобретения термины « β -субъединица рецептора IL-2» и «IL-2R β » относятся к человеческому CD122.

В контексте настоящего изобретения термины « γ -субъединица рецептора IL-2» и «IL-2R γ » относятся к человеческому CD132.

В контексте настоящего изобретения термин «агонист паттерн-распознающего рецептора» («PRRA») относится к молекуле, которая связывается с и активирует один или несколько рецепторов, ассоциированных с иммунными клетками, которые распознают молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами (PAMP), или молекулярные паттерны, связанные с повреждениями (DAMP), приводящие к активации иммунных клеток и/или воспалительным ответам, вызванным патогенами или повреждениями. Паттерн-распознающие рецепторы обычно экспрессируются клетками врожденной иммунной системы, например, моноцитами, макрофагами, дендритными клетками (DC), нейтрофилами и эпителиальными клетками, а также клетками адаптивной иммунной системы.

В контексте настоящего изобретения термины «цитотоксический агент» и «химиотерапевтический агент» используются как синонимы и относятся к соединениям, которые токсичны для клеток, которые предотвращают клеточную репликацию или рост, что приводит к разрушению/гибели клеток. Примеры цитотоксических агентов включают

хемотерапевтические агенты и токсины, как, например, низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их синтетические аналоги и производные.

В контексте настоящего изобретения термины «ингибитор иммунных контрольных точек» и «антагонист иммунных контрольных точек» используются как синонимы и относятся к соединениям, которые влияют на функцию или ингибируют связывание лигандов, которые индуцируют передачу сигналов через рецепторы, экспрессируемые клеточной мембраной, которые ингибируют функцию воспалительных иммунных клеток при активации рецептора. Такие соединения могут, например, быть биологическими соединениями, такими как антитела, фрагменты антител, аффитела, аффилины, аффимеры, аффитины, альфамаб, альфатела, антикалины, авимеры, DARPins, Fynomers®, пептиды доменов Кунитца, монотела, nanoCLAMP, циклические пептиды, пептиды, антитела только тяжелой цепи, VHH-антитела или нанотела®, одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), природные или модифицированные лиганды или партнеры по связыванию для этих рецепторов или низкомолекулярные ингибиторы.

В контексте настоящего изобретения термин «иммуноактивирующий агонист» относится к соединениям, которые прямо или косвенно активируют рецепторы контрольных точек, экспрессируемые клеточной мембраной.

В контексте настоящего изобретения термин «агонист иммуноактивирующего рецептора» относится к соединениям, которые стимулируют функцию иммунных клеток при активации или ко-стимулирующей активации рецептора. Примеры таких стимулирующих рецепторов включают субъединицы CD3 CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 ζ (CD247), субъединицы Т-клеточного рецептора (TCR) TCR α , TCR β , TCR γ и TCR δ , цепи В-клеточного рецептора (BCR) или сигнальные единицы CD79a или CD79b, CD2, CD4, CD8, CD16, CD32a, CD64, CD27, CD28, CD134 (OX40), CD137 (41BB), CD244 (2B4), CD278 (ICOS), CD357 (GITR), CRACC(CS1), LFA-1, NKG2D, NKG2C, NKp30, NKp46, NKp44, NKp80, NTB-A, активирующую короткую форму KIR (KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DS1), CD40, SIRP- β , Dectin-1, Dectin-2, TREM1, TREM2, ILT1, ILT6, ILT7, ILT8, LIR-6, MDL1 и другие иммунные рецепторы, которые используют мотив активации на основе рецептора имунотирозина (ITAM) или индуцируют передачу сигналов через пути PI3K, JAK/STAT, MyD88, IRF, NF κ B или JNK/AP1. Многие мультиспецифические лекарственные средства являются типами агонистов иммуноактивирующих рецепторов.

В контексте настоящего изобретения термины «мультиспецифические» и «мультиспецифические лекарственные средства» относятся к соединениям, которые

одновременно связываются с двумя или более разными антигенами и могут опосредовать антагонистическую, агонистическую или специфическую антигенсвязывающую активность зависимым от мишени образом. В этом контексте термин «одновременно» не относится к временной или пространственной зависимости, а означает, что одно мультиспецифическое лекарственное средство способно связывать два или более антигена, находящихся либо в одном, либо в другом месте, в том же или другой момент времени.

В контексте настоящего изобретения термин «конъюгат антитело-лекарственное средство» (ADC) относится к соединениям, обычно состоящим из антитела, связанного с биологически активной цитотоксической нагрузкой, радиотерапевтического средства или другого лекарственного средства, предназначенного для доставки цитотоксических агентов в среду опухоли. ADC особенно эффективны для снижения опухолевой нагрузки без значительной системной токсичности и могут действовать для повышения эффективности иммунного ответа, индуцированного антителами ингибиторами контрольных точек.

В контексте настоящего изобретения термин «конъюгат антитело-адъювант» (AAC) относится к соединениям, состоящим из антитела, связанного с биологически активным адъювантом либо непосредственно, либо через линкер.

В контексте настоящего изобретения термин «адъювант» относится к веществу, которое усиливает иммунный ответ организма на антиген.

В контексте настоящего изобретения термин «boltbody» относится к конъюгату антитело-адъювант, содержащему (a) фрагмент антитела, содержащий (i) антигенсвязывающий домен и (ii) домен Fc, (b) фрагмент адъюванта и (c) линкер, содержащий группу этиленгликоля или остаток глицина, где каждый фрагмент адъюванта ковалентно связан с фрагментом антитела через линкер, причем этот линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым.

В контексте настоящего изобретения термин «радионуклеотиды» относится к радиоактивным изотопам, которые испускают ионизирующее излучение, приводящее к разрушению/гибели клеток. Радионуклеотиды, конъюгированные с нацеленными на опухоль носителями, называют «нацеленными радионуклеотидными терапевтическими средствами».

В контексте настоящего изобретения термин «ингибитор репарации поврежденных ДНК» относится к лекарственному средству, которое нацелено на элементы репарации поврежденных ДНК, как, например, например, CHK1, CHK2, ATM, ATR и PARP. Некоторые виды рака более восприимчивы к нацеливанию на эти пути из-за

существующих мутаций, как, например, пациенты с мутацией BRCA1 к ингибиторам PARP из-за концепции синтетической летальности.

В контексте настоящего изобретения термин «ингибитор метаболизма опухоли» относится к соединению, которое препятствует функции одного или нескольких ферментов, экспрессируемых в среде опухоли, которые продуцируют промежуточные продукты метаболизма, которые могут ингибировать функцию иммунных клеток.

В контексте настоящего изобретения термин «ингибитор протеинкиназы» относится к соединениям, которые ингибируют активность одной или нескольких протеинкиназ. Протеинкиназы представляют собой ферменты, фосфорилирующие белки, которые, в свою очередь, могут модулировать функцию белков. Понятно, что ингибитор протеинкиназы может нацеливаться на более чем одну киназу, и любая классификация ингибиторов протеинкиназы, используемая в настоящем документе, относится к основной или наиболее охарактеризованной мишени.

В контексте настоящего изобретения термин «агонист хемокинового рецептора и хемоаттрактантного рецептора» относится к соединениям, которые активируют хемокиновые или хемоаттрактантные рецепторы, подмножество рецепторов, связанных с G-белком, или G-белок-связанных-подобных рецепторов, которые экспрессируются на большом количестве клеток и в первую очередь участвует в контроле подвижности клеток (хемотаксис или хемотаксис). Эти рецепторы также могут участвовать в процессах, не связанных с миграцией клеток, например, в ангиогенезе, созревании клеток или воспалении.

В контексте настоящего изобретения термин «агонист цитокиновых рецепторов» относится к растворимым белкам, которые контролируют активацию и пролиферацию иммунных клеток. Цитокины включают, например, интерфероны, интерлейкины, лимфокины и фактор некроза опухоли.

В контексте настоящего изобретения термин «агонист рецептора смерти» относится к молекуле, которая способна индуцировать проапоптотическую передачу сигнала через один или несколько рецепторов смерти, как, например, DR4 (TRAIL-R1) или DR5 (TRAIL-R2). Агонист рецептора смерти может быть выбран из группы, состоящей из антител, лигандов смерти, цитокинов, векторов, экспрессирующих агонист рецептора смерти, пептидов, низкомолекулярных агонистов, клеток (например, стволовых клеток), экспрессирующих агонист рецептора смерти, и лекарственных средств, вызывающих экспрессию лигандов смерти.

В контексте настоящего изобретения термин «антигенпрезентирующая клетка» или «APC» относится к клетке, как, например, макрофаг, В-клетка или дендритная клетка,

которая презентует процессированные антигенные пептиды через молекулы МНС класса II к рецептору Т-клетки. на CD4 Т-клетках. APC может быть идентифицирована специалистом в данной области с использованием фенотипических методов, например, проточной цитометрии. Фенотипические маркеры, используемые для идентификации APC, различаются в зависимости от вида и ткани, но могут включать маркеры поверхности миелоидных или дендритных клеток (например, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD33, CD34, CD68, CD206, МНС-II, CD163, Ly6C, Ly6G, GR-1, F4/80) или В маркеры клеточной поверхности (например, CD19, CD20, B220).

В контексте настоящего изобретения термин «МНСII» относится к классу молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС), обычно обнаруживаемых только на антигенпрезентирующих клетках, как например, миелоидные клетки, дендритные клетки и В-клетки. МНСII презентует процессированные антигенные пептиды рецептору Т-клеток на Т-клетках CD4. Экспрессия МНСII может быть измерена специалистом в данной области техники с использованием методов профилирования экспрессии белков, например, проточной цитометрии. Изменения в экспрессии МНСII можно определить путем анализа изменений сигнала средней интенсивности флуоресценции МНСII или процента клеток, положительных для МНСII, в конкретной представляющей интерес субпопуляции клеток.

В контексте настоящего изобретения термин «Т-клетки» относится к типу иммунных клеток, играющих центральную роль в адаптивном иммунном ответе. Т-клетки отличаются от других иммунных клеток наличием на их клеточной поверхности рецептора Т-клеток $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ (TCR). Т-клетки также экспрессируют CD3 — белковый комплекс, критически важный для передачи сигналов TCR. $\alpha\beta$ Т-клетки можно разделить на CD4, CD8 или CD4/CD8 двойные негативные субпопуляции. Из-за высокой поверхностной плотности CD4 и CD8 на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, только CD4 и CD8 часто можно использовать для идентификации CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток соответственно. $\gamma\delta$ Т-клетки снабжены TCR, состоящим из γ -цепи и δ -цепи, который, как и $\alpha\beta$ TCR, является центральным для распознавания антигенов и клеточной активации. Этот TCR также используется для различения различных подмножеств $\gamma\delta$ Т-клеток, таких как V δ 1 и V δ 2. Т-клетки V δ 1 составляют меньшинство (<5%) и гетерогенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток с обеими анти- и провоспалительными функциями. Т-клетки V δ 2 представляют собой единую относительно гомогенную популяцию Т-клеток V γ 9V δ 2 (V δ 2), которые составляют ~ 95% $\gamma\delta$ Т-клеток в кровотоке. Благодаря уникальным свойствам их TCR и дополнительных врожденных иммунных рецепторов V δ 2 Т-клетки наделены мощными противоопухолевыми свойствами, которые можно использовать для иммунотерапии.

После активации через распознавание TCR родственного антигена, представленного молекулами МНС, Т-клетки могут созревать и делиться с образованием эффекторных Т-клеток или Т-клеток памяти. Т-клетки памяти представляют собой подмножество Т-клеток, которые ранее сталкивались с родственным им антигеном и реагировали на него. Такие Т-клетки могут распознавать патогенные антигены, такие как антигены, полученные из бактерий или вирусов, а также антигены, ассоциированные с раком. Т-клетки могут быть идентифицированы специалистом в данной области с использованием фенотипических методов, таких как проточная цитометрия. Фенотипические маркеры, используемые для идентификации Т-клеток, обычно консервативны у млекопитающих и включают CD3, TCR α , TCR β , TCR δ , CD4 и CD8. Фенотипические маркеры, используемые для идентификации Т-клеток памяти, могут различаться в зависимости от вида и ткани, но могут включать маркеры клеточной поверхности, такие как CD45RO, LY6C, CD44 и CD95.

В контексте настоящего изобретения термин «распространение эпитопа» относится к диверсификации эпитопной специфичности от исходного сфокусированного доминантного эпитоп-специфического иммунного ответа до субдоминантных и/или скрытых эпитопов на том же белке (внутримолекулярное распространение) или других белках (межмолекулярное распространение).

В контексте настоящего изобретения термин «индикаторная опухоль» относится к наиболее обширной области опухоли, т.е. к самому большому узлу в операционном образце.

В контексте настоящего изобретения термин «обратимое», «обратимо», «разлагаемое» или «разлагаемо» в отношении присоединения первого фрагмента ко второму фрагменту означает, что связь, которая соединяет указанный первый и второй фрагменты, может расщепляться в физиологических условиях, которые представляют собой водный буфер при pH 7.4, 37 °C, с периодом полужизни от одного часа до трех месяцев, как например, от одного часа до двух месяцев, от трех часов до одного месяца, от 12 часов до трех недель или от 24 часов до двух недель. Расщепление может быть ферментативным или неферментативным и осуществляется согласно определенным вариантам осуществления неферментативно. Соответственно, термин «стабильное» или «постоянное» в отношении присоединения первого фрагмента ко второму фрагменту означает, что связь, которая соединяет указанные первый и второй фрагменты, может расщепляться с периодом полужизни более трех месяцев в физиологических условиях.

В контексте настоящего изобретения термин «модифицирующий фрагмент» согласно определенным вариантам осуществления относится к заместителю или полимерному фрагменту.

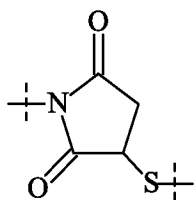
В контексте настоящего изобретения термин «дисульфидный мостик» относится к вставке фрагмента между двумя атомами серы дисульфидного мостика. Это достигается за счет использования реагента, который имеет указанный фрагмент между двумя функциональными группами, реагирующими с тиолами, и взаимодействия каждой функциональной группы, реагирующей с тиолом, с одним из атомов серы дисульфидного мостика, так что фрагмент вставляется между указанными атомами серы после predetermined восстановления дисульфидная связь. Если более чем один дисульфидный мостик присутствует в пептиде или белке, дисульфидный мостик может быть либо вставлен между атомами серы одного дисульфидного мостика, либо может быть вставлен между атомами серы из разных дисульфидных мостиков. Такой дисульфидный мостик может входить в состав природного пептида или белка или может быть введен искусственно, например, путем замены существующих аминокислотных фрагментов на фрагмент цистеина или путем добавления фрагмента цистеина в пептид или белок.

Как применяется в настоящей заявке, термин «реагент» означает химическое соединение, которое содержит по меньшей мере одну функциональную группу для реакции с функциональной группой другого химического соединения или лекарственного средства. Понятно, что лекарственное средство, содержащее функциональную группу (как например первичный или вторичный амин или гидроксильная функциональная группа) также представляет собой реагент.

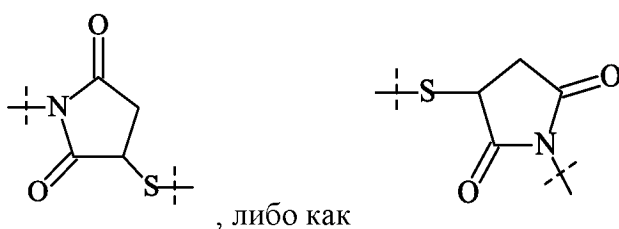
Как применяется в настоящей заявке, термин «фрагмент» означает часть молекулы, в которой отсутствует один или более атомов по сравнению с соответствующим реагентом. Если, например, реагент формулы «Н-Х-Н» реагирует с другим реагентом и становится частью продукта реакции, соответствующий фрагмент продукта реакции имеет структуру «Н-Х-» или «-Х-», где каждый «-» обозначает присоединение к другому фрагменту. Соответственно, фрагмент лекарственного средства высвобождается из пролекарства в качестве лекарственного средства.

Понятно, что если обеспечивается последовательность или химическая структура группы атомов, где группа атомов присоединяется к двум фрагментам или прерывает фрагмент, указанная последовательность или структура может быть присоединен к двум фрагментам в любой ориентации, если иного не указано. Например, фрагмент

«-C(O)N(R¹)-» может быть присоединен к двум фрагментам или прерывать фрагмент либо как «-C(O)N(R¹)-», либо как «-N(R¹)C(O)-». Подобным образом, фрагмент



может быть присоединен к двум фрагментам или может прерывать фрагмент либо как



Термин «замещенный», как применяется в настоящей заявке, означает, что один или более атомов водорода молекулы или фрагмента замещены другим атомом или группой атомов, которые обозначаются как «заместитель».

В контексте настоящего изобретения термин «замещенный» согласно определенным вариантам осуществления относится к фрагменту, выбранному из группы, состоящей из галогена, -CN, -COOR^{x1}, -OR^{x1}, -C(O)R^{x1}, -C(O)N(R^{x1}R^{x1a}), -S(O)₂N(R^{x1}R^{x1a}), -S(O)N(R^{x1}R^{x1a}), -S(O)₂R^{x1}, -S(O)R^{x1}, -N(R^{x1})S(O)₂N(R^{x1a}R^{x1b}), -SR^{x1}, -N(R^{x1}R^{x1a}), -NO₂, -OC(O)R^{x1}, -N(R^{x1})C(O)R^{x1a}, -N(R^{x1})S(O)₂R^{x1a}, -N(R^{x1})S(O)R^{x1a}, -N(R^{x1})C(O)OR^{x1a}, -N(R^{x1})C(O)N(R^{x1a}R^{x1b}), -OC(O)N(R^{x1}R^{x1a}), -T⁰, C₁₋₅₀ алкила, C₂₋₅₀ алкенила и C₂₋₅₀ алкинила, где -T⁰, C₁₋₅₀ алкил, C₂₋₅₀ алкенил и C₂₋₅₀ алкинил необязательно замещены одним или более -R^{x2}, которые являются одинаковыми или различными, и где C₁₋₅₀ алкил, C₂₋₅₀ алкенил и C₂₋₅₀ алкинил необязательно прерываются одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из -T⁰-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{x3})-, -S(O)₂N(R^{x3})-, -S(O)N(R^{x3})-, -S(O)₂-, -S(O)-, -N(R^{x3})S(O)₂N(R^{x3a})-, -S-, -N(R^{x3})-, -OC(OR^{x3})(R^{x3a})-, -N(R^{x3})C(O)N(R^{x3a})-, и -OC(O)N(R^{x3})-,

-R^{x1}, -R^{x1a}, -R^{x1b} независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из -H, -T⁰, C₁₋₅₀ алкила, C₂₋₅₀ алкенила, и C₂₋₅₀ алкинила, где -T⁰, C₁₋₅₀ алкил, C₂₋₅₀ алкенил и C₂₋₅₀ алкинил необязательно замещены одним или более -R^{x2}, которые являются одинаковыми или различными, и где C₁₋₅₀ алкил, C₂₋₅₀ алкенил и C₂₋₅₀ алкинил необязательно прерываются одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из -T⁰-, -

$C(O)O-$, $-O-$, $-C(O)-$, $-C(O)N(R^{x3})-$, $-S(O)_2N(R^{x3})-$, $-S(O)N(R^{x3})-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)-$, $-N(R^{x3})S(O)_2N(R^{x3a})-$, $-S-$, $-N(R^{x3})-$, $-OC(OR^{x3})(R^{x3a})-$, $-N(R^{x3})C(O)N(R^{x3a})-$ и $-OC(O)N(R^{x3})-$,

каждый T^0 независимо выбран из группы, состоящей из фенила, нафтила, инденила, инданила, тетралина, C_{3-10} циклоалкила, 3-10-ти членного гетероциклила и 8-11-ти членного гетеробифидциклила, где каждый T^0 необязательно независимо замещен одним или более $-R^{x2}$, которые являются одинаковыми или различными,

каждый $-R^{x2}$ независимо выбран из группы, состоящей из галогена, $-CN$, оксо ($=O$), $-COOR^{x4}$, $-OR^{x4}$, $-C(O)R^{x4}$, $-C(O)N(R^{x4}R^{x4a})$, $-S(O)_2N(R^{x4}R^{x4a})$, $-S(O)N(R^{x4}R^{x4a})$, $-S(O)_2R^{x4}$, $-S(O)R^{x4}$, $-N(R^{x4})S(O)_2N(R^{x4a}R^{x4b})$, $-SR^{x4}$, $-N(R^{x4}R^{x4a})$, $-NO_2$, $-OC(O)R^{x4}$, $-N(R^{x4})C(O)R^{x4a}$, $-N(R^{x4})S(O)_2R^{x4a}$, $-N(R^{x4})S(O)R^{x4a}$, $-N(R^{x4})C(O)OR^{x4a}$, $-N(R^{x4})C(O)N(R^{x4a}R^{x4b})$, $-OC(O)N(R^{x4}R^{x4a})$ и C_{1-6} алкила, где C_{1-6} алкил необязательно замещен одним или более галогенами, которые являются одинаковыми или различными,

каждый $-R^{x3}$, $-R^{x3a}$, $-R^{x4}$, $-R^{x4a}$, $-R^{x4b}$ независимо выбран из группы, состоящей из $-H$ и C_{1-6} алкила, где C_{1-6} алкил необязательно замещен одним или более галогенами, которые являются одинаковыми или различными.

Согласно определенным вариантам осуществления, максимум 6 $-H$ атомов необязательно замещенной молекулы независимо замещены заместителем, например, 5 $-H$ атомов независимо замещены заместителем, 4 $-H$ атома независимо замещены заместителем, 3 $-H$ атома независимо замещены заместителем, 2 $-H$ атома независимо замещены заместителем, или 1 $-H$ атом замещен заместителем.

В контексте настоящего изобретения термин «жирная кислота» относится к насыщенной или ненасыщенной одноосновной карбоновой кислоте, имеющей алифатический хвост, который может включать от 4 до 28 атомов углерода. Жирная кислота может быть насыщенной или ненасыщенной, линейной или разветвленной. Термин «вариант жирной кислоты» относится к модифицированной жирной кислоте, в которой определенные атомы углерода могут быть заменены другими атомами или группами атомов и которая может быть замещена.

Используемый в контексте настоящего изобретения термин «пептид» относится к цепи, состоящей по меньшей мере из 2 и до 50 аминокислотных мономерных фрагментов, связанных пептидными (амидными) связями. Термин «пептид» также включает пептидомиметики, такие как D-пептиды, пептоиды или бета-пептиды, и охватывает такие пептидомиметические цепи, содержащие до и включая 50 мономерных фрагментов.

В контексте настоящего изобретения термин «белок» относится к цепи, состоящей из более чем 50 аминокислотных мономерных фрагментов, которые также могут

называться «аминокислотными остатками», связанных пептидными связями, в которой согласно определенным вариантам осуществления не более 12000 аминокислотных мономеров связаны пептидными связями, как например не более чем 10000 аминокислотных мономерных фрагментов, не более чем 8000 аминокислотных мономерных фрагментов, не более чем 5000 аминокислотных мономерных фрагментов или не более чем 2000 аминокислотных мономерных фрагментов.

Как применяется в настоящей заявке термин «около» в комбинации с числовым значением применяется для указания на диапазон в интервале и включая числовое значение плюс и минус не более 25% от указанного числового значения, более согласно определенным вариантам осуществления не более 20% от указанного значения и наиболее согласно определенным вариантам осуществления не более 10% от указанного значения. Например, фраза «около 200» применяется для обозначения диапазона в интервале и включая 200 +/-25%, т.е. в интервале и включая 150 -250, согласно определенным вариантам осуществления 200 +/-20%, т.е. в интервале и включая 160 -240, и согласно определенным вариантам осуществления в интервале и включая 200 +/-10%, т.е. в интервале и включая 180-220. Понятно, что процент, приведенный как «около 50%» не означает «50% +/-25%», т.е. в интервале и включая 25 -75%, но «около 50%» означает в интервале и включая 37,5 – 62,5%, т.е. плюс и минус 25% от числового значения, которое равно 50.

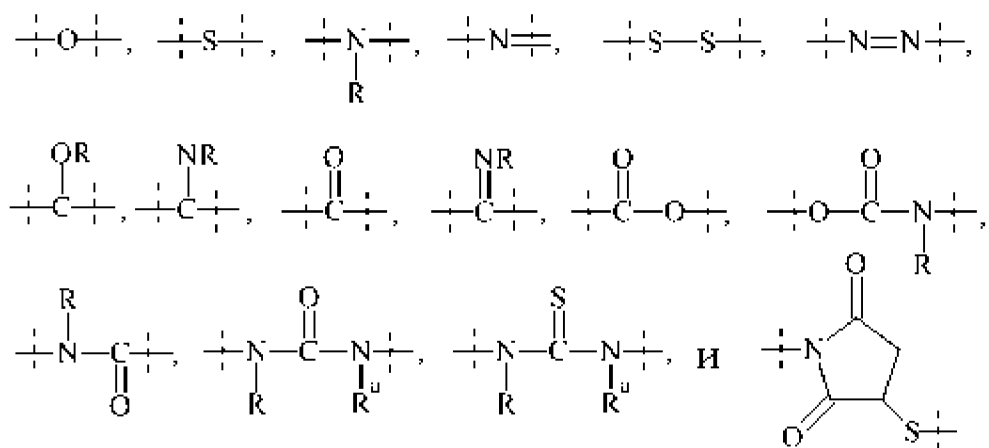
Как применяется в настоящей заявке, термин «полимер» означает молекулу, содержащую повторяющиеся структурные единицы, т.е. мономеры, связанные химическими связями линейным, кольцевым, разветвленным, сшитым или дендримерным образом или их комбинацией, которая может быть синтетического или биологического происхождения или комбинацией обоих. Понятно, что полимер может также содержать одну или более других химических групп и/или фрагментов, таких как, например, одна или более функциональные группы. Согласно определенным вариантам осуществления, растворимый полимер имеет молекулярную массу, равную по меньшей мере 0.5 кДа, например, молекулярную массу, равную по меньшей мере 1 кДа, молекулярную массу, равную по меньшей мере 2 кДа, молекулярную массу, равную по меньшей мере 3 кДа, или молекулярную массу, равную по меньшей мере 5 кДа. Если полимер является растворимым, он согласно определенным вариантам осуществления имеет молекулярную массу, равную самое большее 1000 кДа, как например самое большее 750 кДа, как например самое большее 500 кДа, как например самое большее 300 кДа, как например самое большее 200 кДа, как например самое большее 100 кДа. Понятно, что для нерастворимых полимеров, как например гидрогели, нет значимых диапазонов

молекулярной массы. Понятно, что белок также представляет собой полимер, в котором аминокислоты являются повторяющимися структурными единицами, даже если боковые цепи каждой аминокислоты могут быть разными.

Как применяется в настоящей заявке, термин «полимерный» означает реагент или фрагмент, содержащий один или более полимеров или полимерных фрагментов. Полимерный реагент или фрагмент может необязательно также содержать один или более других фрагментов, которые согласно определенным вариантам осуществления выбирают из группы, состоящей из:

- C₁₋₅₀ алкила, C₂₋₅₀ алкенила, C₂₋₅₀ алкинила, C₃₋₁₀ циклоалкила, 3-10-ти членного гетероциклила, 8-11-ти членного гетеробикаклила, фенила, нафтила, инданила, инданила и тетралинила, и

- связей, выбранных из группы, содержащей



где

пунктирные линии обозначают присоединение к оставшейся части фрагмента или реагента, и

-R и R^a независимо друг от друга выбирают из группы, состоящей из -H, метила, этила, n-пропила, изопропила, n-бутила, изобутила, втор-бутила, трет-бутила, n-пентила, 2-метилбутила, 2,2-диметилпропила, n-гексила, 2-метилпентила, 3-метилпентила, 2,2-диметилбутила, 2,3-диметилбутила и 3,3-диметилпропила.

Специалист в данной области понимает, что продукты полимеризации, полученные из реакции полимеризации, не все имеют одинаковую молекулярную массу, а скорее имеют молекулярно-массовое распределение. Следовательно, диапазоны молекулярных масс, молекулярные массы, диапазоны количества мономеров в полимере и количества мономеров в полимере, как применяется в настоящей заявке, относятся к среднечисловой молекулярной массе и среднему числу мономеров, т.е. к среднему арифметическому

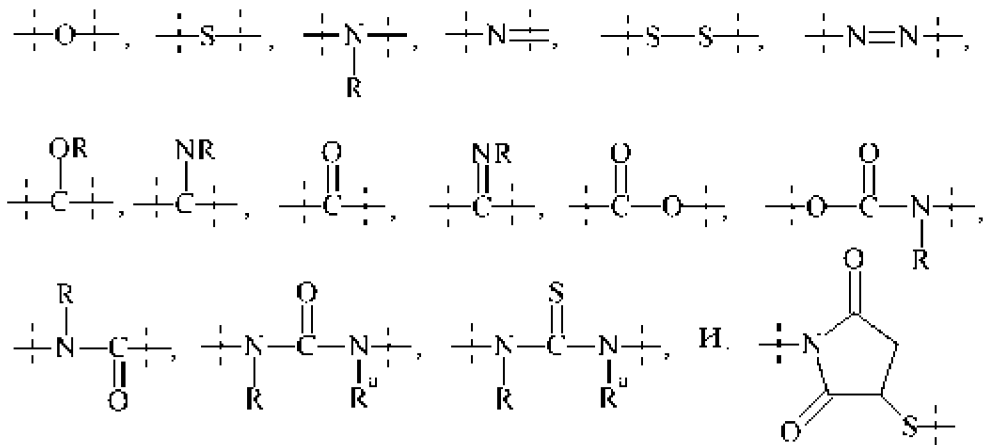
молекулярной массы полимера или полимерного фрагмента и среднему арифметическому числу мономеров полимера или полимерного фрагмента.

Соответственно, в полимерном фрагменте, содержащем «х» мономерных единиц, любое целое число, приведенное для «х», поэтому соответствует арифметическому среднему числу мономеров. Любой диапазон целых чисел, приведенный для «х», обеспечивает диапазон целых чисел, в котором лежит арифметическое среднее число мономеров. Целое число для «х», приведенное как «около х», означает, что арифметические средние числа мономеров лежат в диапазоне целых чисел $x \pm 25\%$, более предпочтительно $x \pm 20$ и наиболее предпочтительно $x \pm 10\%$.

Как применяется в настоящей заявке, термин «среднечисловая молекулярная масса» означает обычное среднее арифметическое молекулярных масс отдельных полимеров.

Как применяется в настоящей заявке, термин «на основе ПЭГ» в отношении фрагмента или реагента означает, что указанный фрагмент или реагент содержит ПЭГ. Согласно определенным вариантам осуществления, фрагмент или реагент на основе ПЭГ содержит по меньшей мере 10% (мас./мас.) ПЭГ, как например по меньшей мере 20% (мас./мас.) ПЭГ, как например по меньшей мере 30% (мас./мас.) ПЭГ, как например по меньшей мере 40% (мас./мас.) ПЭГ, как например по меньшей мере 50% (мас./мас.), как например по меньшей мере 60 (мас./мас.) ПЭГ, как например по меньшей мере 70% (мас./мас.) ПЭГ, как например по меньшей мере 80% (мас./мас.) ПЭГ, как например по меньшей мере 90% (мас./мас.) ПЭГ, как например по меньшей мере 95%. Оставшиеся массовые проценты фрагмента или реагента на основе ПЭГ составляют другие фрагменты, которые согласно определенным вариантам осуществления выбраны из следующих фрагментов и связей:

- C_{1-50} алкила, C_{2-50} алкенила, C_{2-50} алкинила, C_{3-10} циклоалкила, 3-10-ти членного гетероциклила, 8-11-ти членного гетеробифиделила, фенила, нафтила, инденила, инданила и тетралинила, и
- связей, выбранных из группы, содержащей



где

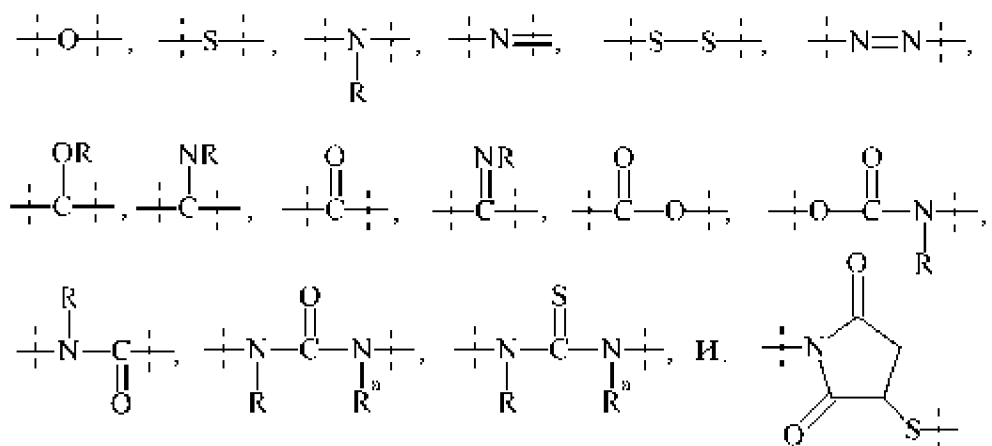
пунктирные линии обозначают присоединение к оставшейся части фрагмента или реагента, и

-R и R^a независимо друг от друга выбирают из группы, состоящей из -H, метила, этила, n-пропила, изопропила, n-бутила, изобутила, втор-бутила, трет-бутила, n-пентила, 2-метилбутила, 2,2-диметилпропила, n-гексила, 2-метилпентила, 3-метилпентила, 2,2-диметилбутила, 2,3-диметилбутила и 3,3-диметилпропила.

Термин «на основе гиалуроновой кислоты» применяется соответствующим образом.

Как применяется в настоящей заявке, термин «на основе ПЭГ, содержащий по меньшей мере X% ПЭГ» в отношении фрагмента или реагента означает, что указанный фрагмент или реагент содержит по меньшей мере X% (мас./мас.) единиц этиленгликоля (-CH₂CH₂O-), где единицы этиленгликоля могут быть расположены блочным, чередующимся образом или могут быть расположены случайным образом в фрагменте или реагенте, и предпочтительно все единицы этиленгликоля указанного фрагмента или реагента присутствуют в одном блоке, оставшиеся массовые проценты фрагмента или реагента на основе ПЭГ составляют другие фрагменты, предпочтительно выбранные из следующих фрагментов и связей:

- C₁₋₅₀ алкила, C₂₋₅₀ алкенила, C₂₋₅₀ алкинила, C₃₋₁₀ циклоалкила, 3-10-ти членного гетероциклила, 8-11-ти членного гетеробикаклила, фенила, нафтила, инденила, инданила и тетралина, и
- связей, выбранных из группы, содержащей



где

пунктирные линии обозначают присоединение к оставшейся части фрагмента или реагента, и

-R и R^a независимо друг от друга выбирают из группы, состоящей из -H, метила, этил, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила, трет-бутила, н-пентила, 2-метилбутила, 2,2-диметилпропила, н-гексила, 2-метилпентила, 3-метилпентила, 2,2-диметилбутила, 2,3-диметилбутила и 3,3-диметилпропила.

Термин «на основе гиалуроновой кислоты, содержащая по меньшей мере X% гиалуроновая кислота» применяется соответствующим образом.

В контексте настоящего изобретения термин «гидрогель» означает гидрофильную или амфифильную полимерную сеть, состоящую из гомополимеров или сополимеров, которая нерастворима из-за наличия гидрофобных взаимодействий, водородных связей, ионных взаимодействий и/или ковалентных химических поперечных связей. Согласно определенным вариантам осуществления гидрогель является нерастворимым из-за присутствия ковалентных химических поперечных связей. В общем, сшивки обеспечивают структуру и физическую целостность сети.

Термин «прерванный» означает, что фрагмент вставлен между двумя атомами углерода или – если вставка находится на одном из концов фрагмента– между атомом углерода или гетероатомом и атомом водорода.

Как применяется в настоящей заявке, термин «C₁₋₄ алкил» сам по себе или в комбинации означает неразветвленный или разветвленный алкильный фрагмент, имеющий от 1 до 4 атомов углерода. Если присутствует на конце молекулы, примерами неразветвленного или разветвленного C₁₋₄ алкила являются метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор.-бутил и трет.-бутил. Когда два фрагмента молекулы связаны C₁₋₄ алкилом, примерами таких C₁₋₄ алкильных групп являются -CH₂-, -CH₂-CH₂-,

-CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-. Каждый водород C₁₋₄ алкильного углерода может необязательно быть замещен заместителем, как определено выше. Необязательно, C₁₋₄ алкил может быть прерван одной или более фрагментами, как определено далее.

Как применяется в настоящей заявке, термин «C₁₋₆ алкил» сам по себе или в комбинации означает неразветвленный или разветвленный алкильный фрагмент, имеющий от 1 до 6 атомов углерода. Если присутствует на конце молекулы, примерами неразветвленных или разветвленных C₁₋₆ алкильных групп являются метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор.-бутил, трет-бутил, н-пентил, 2-метилбутил, 2,2-диметилпропил, н-гексил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 2,2-диметилбутил, 2,3-диметилбутил и 3,3-диметилпропил. Когда два фрагмента молекулы связаны C₁₋₆ алкильной группой, примерами таких C₁₋₆ алкильных групп являются -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH(C₂H₅)-и C(CH₃)₂-. Каждый атом водорода при C₁₋₆ атоме углерода может необязательно быть замещен заместителем, как определено выше. Необязательно, C₁₋₆ алкил может быть прерван одним или более фрагментами, как определено далее.

Соответственно, «C₁₋₁₀ алкил», «C₁₋₂₀ алкил» или «C₁₋₅₀ алкил» означает алкильную цепь, имеющую от 1 до 10, от 1 до 20 или от 1 до 50 атомов углерода, соответственно, где каждый атом водорода при C₁₋₁₀, C₁₋₂₀ или C₁₋₅₀ атоме углерода может необязательно быть замещен заместителем, как определено выше. Необязательно, C₁₋₁₀ или C₁₋₅₀ алкил может быть прерван одним или более фрагментами, как определено далее.

Как применяется в настоящей заявке, термин «C₂₋₆ алкенил» сам по себе или в комбинации означает неразветвленный или разветвленный углеводородный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод, имеющий от 2 до 6 атомов углерода. Если присутствует на конце молекулы, примерами являются CH=CH₂, -CH=CH-CH₃, -CH₂-CH=CH₂, -CH=CHCH₂-CH₃ и -CH=CH-CH=CH₂. Когда два фрагмента молекулы связаны C₂₋₆ алкенильной группой, тогда примером такого C₂₋₆ алкенила является -CH=CH-. Каждый атом водорода C₂₋₆ алкенильного фрагмента может необязательно быть замещен заместителем, как определено выше. Необязательно, C₂₋₆ алкенил может быть прерван одним или более фрагментами, как определено далее.

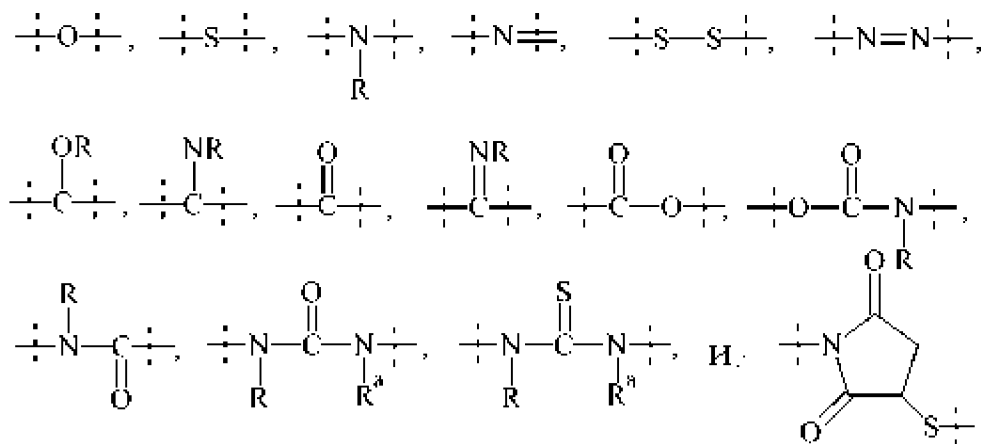
Соответственно, термин «C₂₋₁₀ алкенил», «C₂₋₂₀ алкенил» или «C₂₋₅₀ алкенил» сам по себе или в комбинации означает неразветвленный или разветвленный углеводородный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод, имеющий от 2 до 10, от 2 до 20 или от 2 до 50 атомов углерода. Каждый атом водорода C₂₋₁₀ алкенильной, C₂₋₂₀ алкенильной или C₂₋₅₀ алкенильной группы может необязательно быть

замещен заместителем, как определено выше. Необязательно, C_{2-10} алкенил, C_{2-20} алкенил или C_{2-50} алкенил может быть прерван одним или более фрагментами, как определено далее.

Как применяется в настоящей заявке, термин « C_{2-6} алкинил» сам по себе или в комбинации означает неразветвленный или разветвленный углеводородный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод, имеющий от 2 до 6 атомов углерода. Если присутствует на конце молекулы, примерами являются $-C\equiv CH$, $-CH_2-C\equiv CH$, $CH_2-CH_2-C\equiv CH$ и $CH_2-C\equiv C-CH_3$. Когда два фрагмента молекулы связаны алкинильной группой, тогда примером является $-C\equiv C-$. Каждый атом водорода C_{2-6} алкинильной группы может необязательно быть замещен заместителем, как определено выше. Необязательно, могут присутствовать одна или более двойных связей. Необязательно, C_{2-6} алкинил может быть прерван одним или более фрагментами, как определено далее.

Соответственно, как применяется в настоящей заявке, термин « C_{2-10} алкинил», « C_{2-20} алкинил» и « C_{2-50} алкинил» сам по себе или в комбинации означает неразветвленный или разветвленный углеводородный фрагмент, содержащий по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод, имеющий от 2 до 10, от 2 до 20 или от 2 до 50 атомов углерода, соответственно. Каждый атом водорода C_{2-10} алкинильной, C_{2-20} алкинильной или C_{2-50} алкинильной группы может необязательно быть замещен заместителем, как определено выше. Необязательно, могут присутствовать одна или более двойных связей. Необязательно, C_{2-10} алкинил, C_{2-20} алкинил или C_{2-50} алкинил может быть прерван одним или более фрагментами, как определено далее.

Как упомянуто выше, C_{1-4} алкил, C_{1-6} алкил, C_{1-10} алкил, C_{1-20} алкил, C_{1-50} алкил, C_{2-6} алкенил, C_{2-10} алкенил, C_{2-20} алкенил, C_{2-50} алкенил, C_{2-6} алкинил, C_{2-10} алкинил, C_{2-20} алкенил или C_{2-50} алкинил может необязательно быть прерван одним или более фрагментами, которые предпочтительно выбирают из группы, состоящей из



где

пунктирные линии обозначают присоединение к оставшейся части фрагмента или реагента, и

-R и R^a независимо друг от друга выбирают из группы, состоящей из -H, метила, этила, пропила, бутила, пентила и гексила.

Как применяется в настоящей заявке, термин «С₃₋₁₀ циклоалкил» означает циклическую алкильную цепь, имеющую от 3 до 10 атомов углерода, которая может быть насыщенной или ненасыщенной, например, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил, циклооктил, циклононил или циклодецил. Каждый атом водорода С₃₋₁₀ циклоалкильного углерода может быть замещен заместителем, как определено выше. Термин «С₃₋₁₀ циклоалкил» также включает мостиковые бициклы, такие как норборнан или норборнен.

Термин «8-30-членный карбополициклил» или «8-30-членный карбополицикл» означает циклический фрагмент из двух или более колец с 8 -30 кольцевыми атомами, где два соседних кольца разделяют по мере один кольцевой атом, и которая может содержать до максимального числа двойных связей (ароматическое или неароматическое кольцо, которое является полностью насыщенным, частично ненасыщенным или ненасыщенным). Предпочтительно 8-30-членный карбополициклил означает циклический фрагмент из двух, трех, четырех или пяти колец, более предпочтительно двух, трех или четырех колец.

Как применяется в настоящей заявке, термин «3-10-членный гетероциклил» или «3-10-членный гетероцикл» означает кольцо с 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 кольцевыми атомами, которое может содержать до максимального числа двойных связей (ароматическое или неароматическое кольцо, которое является полностью насыщенным, частично ненасыщенным или ненасыщенным), где по меньшей мере от одного кольцевого атома до

четырёх кольцевых атомов замещены гетероатомом, выбранным из группы, состоящей из серы (включая $-S(O)-$, $-S(O)_2-$), кислорода и азота (включая $=N(O)-$), и где кольцо связано с остатком молекулы через атом углерода или азота. Примеры 3-10-членных гетероциклов включают, но без ограничения к этому, азиридин, оксиран, тиран, азиридин, оксирен, тиирен, азетидин, оксетан, тиетан, фуран, тиофен, пиррол, пирролин, имидазол, имидазолин, пиразол, пиразолин, оксазол, оксазолин, изоксазол, изоксазолин, тиазол, тиазолин, изотиазол, изотиазолин, тиadiaзол, тиadiaзолин, тетрагидрофуран, тетрагидротиофен, пирролидин, имидазолидин, пиразолидин, оксазолидин, изоксазолидин, тиазолидин, изотиазолидин, тиadiaзолидин, сульфолан, пиран, дигидропиран, тетрагидропиран, имидазолидин, пиридин, пиридазин, пиразин, пиримидин, пиперазин, пиперидин, морфолин, тетразол, триазол, триазазолин, тетразолидин, диазепан, азепин или гомопиперазин. Каждый атом водорода 3-10-членного гетероциклила или 3-10-членной гетероциклической группы может быть замещен заместителем, как определено далее.

Как применяется в настоящей заявке, термин «8-11-членный гетеробициклил» или «8-11-членный гетеробицикл» означает гетероциклический фрагмент из двух колец с 8-11 кольцевыми атомами, где по меньшей мере один кольцевой атом разделен между двумя кольцами, и который содержит до максимального числа двойных связей (ароматическое или неароматическое кольцо, которое является полностью насыщенным, частично ненасыщенным или ненасыщенным), где по меньшей мере от одного кольцевого атома до шести кольцевых атомов замещены гетероатомом, выбранным из группы, состоящей из серы (включая $-S(O)-$, $-S(O)_2-$), кислорода и азота (включая $=N(O)-$), и где кольцо связано с остатком молекулы через атом углерода или азота. Примерами 8-11-членного гетеробицикла являются индол, индолин, бензофуран, бензотиофен, бензоксазол, бензизоксазол, бензотиазол, бензизотиазол, бензимидазол, бензимидазолин, хинолин, хиназолин, дигидрохиназолин, хинолин, дигидрохинолин, тетрагидрохинолин, декагидрохинолин, изохинолин, декагидроизохинолин, тетрагидроизохинолин, дигидроизохинолин, бензазепин, пурин или птеридин. Термин 8-11-членный гетеробицикл также включает спиро-структуры из двух циклов, такие как 1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]декан или мостиковые гетероциклы, такие как 8-аза-бицикло[3.2.1]октан. Каждый атом водорода 8-11-членного гетеробициклила или 8-11-членного гетеробицикла может быть замещен заместителем, как определено далее.

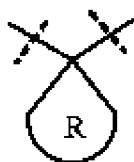
Подобным образом, термин «8-30-членный гетерополициклил» или «8-30-членный гетерополицикл» означает гетероциклический фрагмент из более чем двух колец с 8-30 кольцевыми атомами, предпочтительно тремя, четырьмя или пятью кольцами, где два

соседних кольца разделяют по мере один кольцевой атом, и который может содержать до максимального числа двойных связей (ароматическое или неароматическое кольцо, которое является полностью насыщенным, частично ненасыщенным или ненасыщенным), где по меньшей мере от одного кольцевого атома до 10 кольцевых атомов замещены гетероатомом, выбранным из группы, состоящей из серы (включая $-S(O)-$, $-S(O)_2-$), кислорода и азота (включая $=N(O)-$), и где кольцо связано с остатком молекулы через атом углерода или азота.

Понятно, что фраза «пара R^x/R^y , соединяется вместе с атомом, к которому они присоединены, с образованием C_{3-10} циклоалкила или 3-10-членного гетероциклила» в отношении фрагмента структуры

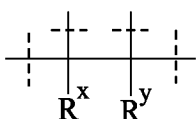


означает, что R^x и R^y образуют следующую структуру:

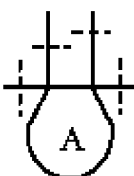


где R представляет собой C_{3-10} циклоалкил или 3-10-членный гетероциклил.

Также понятно, что фраза «пара R^x/R^y , соединяется вместе с атомом, к которому они присоединены, с образованием кольца A» в отношении фрагмента структуры



означает, что R^x и R^y образуют следующую структуру:



Как применяется в настоящей заявке, «галоген» означает фтор, хлор, бром или иод. В общем предпочтительно, что галогеном является фтор или хлор.

Как применяется в настоящей заявке, термин «функциональная группа» означает группу атомов, которая может реагировать с другими группами атомов. Функциональные группы включают, но без ограничения к этому, следующие группы: карбоновая кислота ($-(C=O)OH$), первичный и вторичный амин ($-NH_2$, $-NH-$), малеимид, тиол ($-SH$), сульфоновая кислота ($-(O=S=O)OH$), карбонат, карбамат ($-O(C=O)N<$), гидроксил ($-OH$),

альдегид ($-(C=O)H$), кетон ($-(C=O)-$), гидразин ($>N-N<$), изоцианат, изотиоцианат, фосфорная кислота ($-O(P=O)OH$), фосфоновая кислота ($-O(P=O)OH$), галоацетил, алкилгалогенид, акрилоил, арилфторид, гидроксиламин, дисульфид, сульфонамиды, серная кислота, винилсульфон, винилкетон, диазоалкан, оксиран и азиридин.

В случае, если белки или конъюгаты II-2 согласно настоящему изобретению содержат одну или более кислотных или основных групп, изобретение также включает их соответствующие фармацевтически или токсикологически приемлемые соли, в частности их фармацевтически применимые соли. Таким образом, белки или конъюгаты II-2 согласно настоящему изобретению, содержащие кислотные группы, могут использоваться в соответствии с настоящим изобретением, например, в виде солей щелочных металлов, солей щелочноземельных металлов или солей аммония. Более точные примеры таких солей включают соли натрия, соли калия, соли кальция, соли магния или соли с аммиаком или органическими аминами, как например, этиламин, этаноламин, триэтаноламин или аминокислоты. Белки или конъюгаты II-2 согласно настоящему изобретению, содержащие одну или более основных групп, т.е. групп, которые могут быть протонированы, могут присутствовать и использоваться согласно настоящему изобретению в форме их аддитивных солей с неорганическими или органическими кислотами. Примеры подходящих кислот включают хлорид водорода, бромид водорода, фосфорную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, метансульфо кислоту, п-толуолсульфо кислоту, нафталинсульфо кислоту, щавелевую кислоту, уксусную кислоту, винную кислоту, молочную кислоту, салициловую кислоту, бензойную кислоту, муравьиную кислоту, пропионовую кислоту, пивалоиловую кислоту, диэтилуксусную кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, пимелиновую кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, сульфаминовую кислоту, фенилпропионовую кислоту, глюконовую кислоту, аскорбиновую кислоту, изоникотиновую кислоту, лимонную кислоту, адипиновую кислоту и другие кислоты, известные квалифицированным специалистам в данной области. Специалистам в данной области техники известно превращение основной группы в катион, такие как алкилирование аминной группы с получением положительно заряженной аммониевой группы и соответствующего противоиона соли. Если белки или конъюгаты II-2 согласно настоящему изобретению одновременно содержат кислотные и основные группы, настоящее изобретение также включает, помимо упомянутых солевых форм, внутренние соли или бетаины (цвиттерионы). Соответствующие соли могут быть получены обычными методами, которые известны специалисту в данной области, например, контактированием этих пролекарств с органической или неорганической кислотой или

основанием в растворителе или диспергаторе, или путем анионного или катионного обмена с другими солями. Настоящее изобретение также включает все соли белков или конъюгатов IL-2 согласно настоящему изобретению, которые из-за низкой физиологической совместимости не подходят напрямую для использования в фармацевтических препаратах, но которые могут использоваться, например, в качестве промежуточных продуктов для химических реакций или для приготовления фармацевтически приемлемых солей.

Термин «фармацевтически приемлемый» означает вещество, которое не наносит вред при введении пациенту и предпочтительно одобрено надзорным органом, таким как ЕМЕА (Европа) и/или FDA (США) и/или любым другим национальным надзорным органом для применения в отношении животных, как например, человека.

Как применяется в настоящей заявке, термин «эксципиент» относится к разбавителю, вспомогательному средству или носителю, совместно с которым вводится терапевтическое средство, как например лекарственное средство или пролекарство. Такой фармацевтический эксципиент может представлять собой стерильную жидкость, такую как вода и масла, включая жидкости нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, включая, но без ограничения к этому, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, сезамовое масло и тому подобное. Вода является предпочтительным эксципиентом, когда фармацевтическая композиция вводится перорально. Соляной раствор и водный раствор декстрозы являются предпочтительными наполнителями, когда фармацевтическая композиция вводится внутривенно. Соляные растворы и водные растворы декстрозы и глицерина предпочтительно применяются в качестве жидких эксципиентов для инъеклируемых растворов. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, маннит, трегалозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицерин моностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобное. Композиция при желании может содержать также небольшие количества увлажняющих или эмульгирующих средств, рН-буферных средств, таких как, например, ацетат, сукцинат, трис, карбонат, фосфат, HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфокислота, MES (2-(N-морфолин)этансульфокислота) или может содержать детергенты, такие как Tween, полочсамеры, полочсамины, CHAPS, Igepal, или аминокислоты, такие как, например, глицин, лизин или гистидин. Такие фармацевтические композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, препаратов с замедленным высвобождением и тому подобное. Фармацевтическая композиция может иметь вид суппозитория, с

традиционными связующими средствами и эксципиентами, такими как триглицериды. Препарат для перорального введения может содержать стандартные эксципиенты, такие как фармацевтические марки маннита, лактозы, крахмала, стеарата магния, сахарина натрия, целлюлозы, карбоната магния и т.д. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество лекарственного средства или биологически активного фрагмента, вместе с подходящим количеством эксципиента, так чтобы получилась форма, подходящая для введения пациенту. Композиция должна соответствовать способу введения.

В общем термин «содержит» или «содержащий» также охватывает «состоит из» или «состоящий из».

SEQ A формулы (I) имеет по меньшей мере 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO:1. SEQ ID NO:1 имеет следующую последовательность:

PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT

SEQ B формулы (I) имеет по меньшей мере 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO:2. SEQ ID NO:2 имеет следующую последовательность:

MLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL
ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

Если не указано иное, все приведенные здесь положения аминокислот основаны на SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2 соответственно.

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A содержит два аминокислотных изменений по сравнению с SEQ ID NO:1. Согласно определенным вариантам осуществления последовательность SEQ A содержит одно аминокислотное изменение по сравнению с SEQ ID NO:1. Такое изменение аминокислоты может быть делецией аминокислоты, добавлением аминокислоты или заменой одной аминокислоты на другую аминокислоту, т.е. мутацией. Такой мутацией также может быть замена протеиногенной аминокислоты на непротеиногенную аминокислоту или на D-стереоизомеры протеиногенной аминокислоты.

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:1, содержащую одну аминокислотную замену в положении K34. Согласно определенным вариантам осуществления такой заменой аминокислоты является замена одной аминокислоты, в данном случае лизина, на другую аминокислоту, которая согласно определенным вариантам осуществления выбрана из группы, состоящей из аланина, цистеина, глицина, серина, треонина, глутамина, глутаминовой кислоты, аспарагин и аспарагиновой кислоты. Согласно определенным вариантам осуществления указанная замена аминокислоты в положении K34 выбрана из

группы, состоящей из K34A (SEQ ID NO:3), K34C (SEQ ID NO:4), K34G (SEQ ID NO:5), K34S (SEQ ID NO:6), K34T (SEQ ID NO:7), K34Q (SEQ ID NO:8), K34E (SEQ ID NO:9), K34N (SEQ ID NO:10) и K34D (SEQ ID NO:11). Соответственно, согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO: 3: PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPALT. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:4: PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPCLT. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:5: PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPGLT. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:6: PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPSLT. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:7: PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPTLT. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:8: PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPQLT. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:9: PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPELT. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:10: PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPNLT. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:11: PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPDLT. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:1.

Неожиданно было обнаружено, что введение аминокислотной замены в положение K34 SEQ A улучшает растворимость и рефолдинг белка IL-2 формулы (I).

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит от 1 до 5 аминокислотных изменений по сравнению с SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит от 1 до 4 аминокислотных изменений по сравнению с SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит пять аминокислотных изменений по сравнению с SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит четыре аминокислотных изменений по сравнению с SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит три аминокислотных изменений по сравнению с SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит два аминокислотных изменений по сравнению с SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит аминокислотную замену по сравнению с SEQ

ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ В содержит аминокислотную замену по сравнению с SEQ ID NO:2. Такое изменение аминокислоты может быть делецией аминокислоты, добавлением аминокислоты или заменой одной аминокислоты на другую аминокислоту, т.е. мутацией. Такой мутацией также может быть замена протеиногенной аминокислоты на непротеиногенную аминокислоту или на D-стереоизомеры протеиногенных аминокислот.

Согласно определенным вариантам осуществления указанные 1-4 аминокислотные изменения замещают аминокислоту на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, цистеина, глицина, серина, треонина, глутамина, глутаминовой кислоты и аспарагина. Согласно определенным вариантам осуществления указанные 1-4 аминокислотные изменения замещают аминокислоту на аланин. Согласно определенным вариантам осуществления указанные 1-4 аминокислотные изменения замещают аминокислоту на цистеин. Согласно определенным вариантам осуществления указанные 1-4 аминокислотные изменения замещают аминокислоту на глицин. Согласно определенным вариантам осуществления указанные 1-4 аминокислотные изменения замещают аминокислоту на серин. Согласно определенным вариантам осуществления указанные 1-4 аминокислотные изменения замещают аминокислоту на треонин. Согласно определенным вариантам осуществления указанные 1-4 аминокислотные изменения замещают аминокислоту на глутамин. Согласно определенным вариантам осуществления указанные 1-4 аминокислотные изменения замещают аминокислоту на глутаминовую кислоту. Согласно определенным вариантам осуществления указанные 1-4 аминокислотные изменения замещают аминокислоту на аспарагин.

Согласно определенным вариантам осуществления указанные 1-4 аминокислотные изменения выбраны из аминокислотных замен, происходящих в положении, выбранном из группы, состоящей из M1, T3, F4, K5, F6, Y7, E24, E30, L34 и C87 последовательности SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления одно из указанных 1-4 аминокислотных изменений происходит в положении M1 последовательности SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления одно из указанных 1-4 аминокислотных изменений происходит в положении T3 последовательности SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления одно из указанных 1-4 аминокислотных изменений происходит в положении F4 последовательности SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления одно из указанных 1-4 аминокислотных изменений происходит в положении K5 последовательности SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления одно из указанных 1-4 аминокислотных изменений происходит в положении F6 последовательности SEQ ID

NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления одно из указанных 1-4 аминокислотных изменений происходит в положении Y7 последовательности SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления одно из указанных 1-4 аминокислотных изменений происходит в положении E24 последовательности SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления одно из указанных 1-4 аминокислотных изменений происходит в положении E30 последовательности SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления одно из указанных 1-4 аминокислотных изменений происходит в положении L34 последовательности SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления одно из указанных 1-4 аминокислотных изменений происходит в положении C87 последовательности SEQ ID NO:2.

Согласно определенным вариантам осуществления указанные 1-4 аминокислотные изменения выбраны из группы, состоящей из M1A, M1C, M1G, M1S, M1T, M1Q, M1E, M1N, T3A, T3C, T3G, T3S, T3Q, T3E, T3N, F4A, F4C, F4G, F4S, F4T, F4Q, F4E, F4N, K5A, K5C, K5G, K5S, K5T, K5Q, K5E, K5N, F6A, F6C, F6G, F6S, F6T, F6Q, F6E, F6N, Y7A, Y7C, Y7G, Y7S, Y7T, Y7Q, Y7E, Y7N, E24A, E24C, E24G, E24S, E24T, E24Q, E24N, E30A, E30C, E30G, E30S, E30T, E30Q, E24N, L34A, L34C, L34G, L34S, L34T, L34Q, L34E, L34N, C87A, C87G, C87S, C87T, C87Q, C87E и C87N, на основе последовательности SEQ ID NO:2. Понятно, что термин «M1A» означает, что метионин в положении 1 заменен аланином, и что другие термины используются соответственно. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию M1A. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию M1C. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию M1G. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию M1S. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию M1T. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию M1Q. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию M1E. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию M1N. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию T3A. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию T3C. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию T3G. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию T3S. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию T3Q. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию T3E. Согласно определенным вариантам осуществления SEQ B содержит мутацию T3N. Согласно определенным

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:1 и SEQ B имеет последовательность SEQ ID NO:2. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:13:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTCMLTFKGYMPKKATELK
HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV
EFLNRWITFCQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:1 и SEQ B имеет последовательность SEQ ID NO:12. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:14:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTCMLTFKGYMPKKATELK
HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV
EFLNRWITFSQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:3 и SEQ B имеет последовательность SEQ ID NO:2. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:22:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPALTCMLTFKGYMPKKATELK
HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV
EFLNRWITFCQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:3 и SEQ B имеет последовательность SEQ ID NO:12. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:23:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPALTCMLTFKGYMPKKATELK
HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV
EFLNRWITFSQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:4 и SEQ B имеет последовательность SEQ ID NO:2. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:24:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPCLTCMLTFKGYMPKKATELKH
LQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE
FLNRWITFCQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:4 и SEQ B имеет последовательность SEQ ID NO:12. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:25:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPCLTCMLTFKFYMPKKATELKH
LQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE
FLNRWITFSQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ А имеет последовательность SEQ ID NO:5 и SEQ В имеет последовательность SEQ ID NO:2. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:26:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPGLTCMLTFKFYMPKKATELK
HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV
EFLNRWITFCQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ А имеет последовательность SEQ ID NO:5 и SEQ В имеет последовательность SEQ ID NO:12. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:27:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPGLTCMLTFKFYMPKKATELK
HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV
EFLNRWITFSQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ А имеет последовательность SEQ ID NO:6 и SEQ В имеет последовательность SEQ ID NO:2. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:28:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPSLTCMLTFKFYMPKKATELKH
LQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE
FLNRWITFCQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ А имеет последовательность SEQ ID NO:6 и SEQ В имеет последовательность SEQ ID NO:12. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:29:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPSLTCMLTFKFYMPKKATELKH
LQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE
FLNRWITFSQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ А имеет последовательность SEQ ID NO:7 и SEQ В имеет последовательность SEQ ID NO:2. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:30:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPTLTCMLTFKFYMPKKATELKH
LQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE
FLNRWITFCQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ А имеет последовательность SEQ ID NO:7 и SEQ В имеет последовательность SEQ ID NO:12. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:31:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPTLTCMLTFKIFYMPKKATELKH
LQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE
FLNRWITFSQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ А имеет последовательность SEQ ID NO:8 и SEQ В имеет последовательность SEQ ID NO:2. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:32:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPQLTCMLTFKIFYMPKKATELK
HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV
EFLNRWITFCQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ А имеет последовательность SEQ ID NO:8 и SEQ В имеет последовательность SEQ ID NO:12. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:33:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPQLTCMLTFKIFYMPKKATELK
HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV
EFLNRWITFSQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ А имеет последовательность SEQ ID NO:9 и SEQ В имеет последовательность SEQ ID NO:2. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:34:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPELTCMLTFKIFYMPKKATELKH
LQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE
FLNRWITFCQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ А имеет последовательность SEQ ID NO:9 и SEQ В имеет последовательность SEQ ID NO:12. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:35:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPELTCMLTFKIFYMPKKATELKH
LQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE
FLNRWITFSQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ А имеет последовательность SEQ ID NO:10 и SEQ В имеет последовательность SEQ ID NO:2. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:36:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPNLTCMLTFKFYMPKKATELK
HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV
EFLNRWITFCQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ А имеет последовательность SEQ ID NO:10 и SEQ В имеет последовательность SEQ ID NO:12. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:37:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPNLTCMLTFKFYMPKKATELK
HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV
EFLNRWITFSQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ А имеет последовательность SEQ ID NO:11 и SEQ В имеет последовательность SEQ ID NO:2. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:38:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPDLTCMLTFKFYMPKKATELK
HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV
EFLNRWITFCQSIISTLT

Согласно определенным вариантам осуществления SEQ А имеет последовательность SEQ ID NO:11 и SEQ В имеет последовательность SEQ ID NO:12. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:39:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPDLTCMLTFKFYMPKKATELK
HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIV
EFLNRWITFSQSIISTLT

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к олигонуклеотидной последовательности, кодирующей белок IL-2 формулы (I). Такая олигонуклеотидная последовательность может быть выбрана из группы, состоящей из последовательностей ДНК, РНК и кДНК. Согласно определенным вариантам осуществления олигонуклеотид последовательность является ДНК последовательностью. Согласно определенным вариантам осуществления олигонуклеотид последовательность является РНК последовательностью. Согласно определенным вариантам осуществления олигонуклеотид последовательность является кДНК последовательностью. Согласно определенным вариантам осуществления олигонуклетид, кодирующий белок IL-2 формулы (I) предназначена для экспрессии в прокариотической системе, в эукариотической системе или в бесклеточной системе. Согласно определенным вариантам осуществления олигонуклетидная последовательность, кодирующая белок IL-2 формулы (I) предназначена для экспрессии в прокариотической системе. Согласно определенным вариантам осуществления олигонуклетидная последовательность, кодирующая белок IL-2

формулы (I) предназначена для экспрессии в эукариотической системе. Согласно определенным вариантам осуществления олигонуклеотидная последовательность, кодирующая белок IL-2 формулы (I) предназначена для экспрессии в бесклеточной системе.

Согласно определенным вариантам осуществления олигонуклеотидная последовательность, кодирующая белок IL-2 формулы (I) предназначена для экспрессии в прокариотической, такой как бактериальная система, выбранная из группы, состоящей из *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., как например, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium* sp., как например, *Corynebacterium glutamicum*, и *Pseudomonas fluorescens*. Согласно определенным вариантам осуществления такой олигонуклеотид представляет собой последовательность ДНК в форме плазмиды.

Согласно определенным вариантам осуществления олигонуклеотидная последовательность, кодирующая белок IL-2 формулы (I) предназначена для экспрессии в эукариотической, такой как эукариотическая система, выбранная из группы, включающей дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris*, нитевидные грибы, как например, *Aspergillus*, *Trichoderma* или *Myceliophthora thermophila*, бакуловирус-инфицированные клетки, такие как бакуловирус-инфицированные клетки насекомых, такие как штаммы Sf9, Sf21, Hi-5, или бакуловирус-инфицированные клетки млекопитающих, такие как HeLa, клетки эмбриональной почки человека HEK 293 или клетки яичника китайского хомячка (CHO); системы млекопитающих, такие как лимфобластоидная миелома мыши (например, клетки NS0), фибробласты мыши (например, клетки NIH3T3), клетки CHO и полностью человеческие клетки, такие как клетки HEK 293, эмбриональные клетки сетчатки человека (такие как Ret.C6 Crucell) и клетки амниоцитов человека (такие как Glycotop и CEVEC); и нелитические системы экспрессии клеток насекомых, такие как клетки Sf9, Sf21, Hi-5, клетки Schneider 2 или клетки Schneider 3. Согласно определенным вариантам осуществления олигонуклеотидная последовательность, кодирующая белок IL-2 формулы (I) предназначен для экспрессии в системе млекопитающих. Согласно определенным вариантам осуществления олигонуклеотидная последовательность, кодирующая белок IL-2 формулы (I) имеет последовательность SEQ ID NO:17. Согласно определенным вариантам осуществления такой олигонуклеотид представляет собой последовательность ДНК в форме плазмиды. Согласно определенным вариантам осуществления плаزمиды имеет последовательность SEQ ID NO:20.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу экспрессии рекомбинантного белка IL-2 формулы (I), включающему: а) культивирование клеток-

хозяев, экспрессирующих один или несколько генов, кодирующих белок IL-2 формулы (I); и б) отделение указанного представляющего интерес рекомбинантного белка IL-2 от культуры клеток-хозяев.

Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой прокариотические клетки, такие как бактериальные клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева выбраны из группы, состоящей из *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., как например, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium* sp., как например, *Corynebacterium glutamicum*, и *Pseudomonas fluorescens*. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой *Escherichia coli*. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой *Bacillus* sp. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой *Corynebacterium* sp. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой *Pseudomonas fluorescens*.

Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой эукариотические клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева выбраны из группы, включающей дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris*, нитевидные грибы, как например, *Aspergillus*, *Trichoderma* или *Myceliophthora thermophila*, бакуловирус-инфицированные клетки, такие как бакуловирус-инфицированные клетки насекомых, такие как штаммы Sf9, Sf21, Hi-5, или бакуловирус-инфицированные клетки млекопитающих, такие как HeLa, клетки эмбриональной почки человека HEK 293 или клетки яичника китайского хомячка (CHO); системы млекопитающих, такие как лимфобластоидная миелома мыши (например, клетки NS0), фибробласты мыши (например, клетки NIH3T3), клетки CHO и полностью человеческие клетки, такие как клетки HEK 293, эмбриональные клетки сетчатки человека (такие как Per.C6 Cell) и клетки амниоцитов человека (такие как Glycotop и CEVEC); и нелитические системы экспрессии клеток насекомых, такие как клетки Sf9, Sf21, Hi-5, клетки Schneider 2 или клетки Schneider 3. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой дрожжевые клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки *Saccharomyces cerevisiae*. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки *Pichia pastoris*. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки нитевидных грибов. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки вида *Aspergillus*. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки вида *Trichoderma*. Согласно определенным вариантам

осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки *Myceliophthora thermophila*. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой бакуловирус-инфицированные клетки, как например, бакуловирус-инфицированные клетки насекомых или бакуловирус-инфицированные клетки млекопитающих. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой бакуловирус-инфицированные Sf9 клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой бакуловирус-инфицированные Sf21 клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки бакуловирус-инфицированного штамма Hi-5. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой бакуловирус-инфицированные HeLa клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой бакуловирус-инфицированные клетки почки человека. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой бакуловирус-инфицированные Sf9 клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой бакуловирус-инфицированные СНО клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки млекопитающих. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой лимфобластоидные клетки миеломы мыши. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой мышинные фибробластные клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой СНО клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой НЕК 293 клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой ретинальные эмбриональные клетки человека. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки амиоцитов человека. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой мышинные фибробластные клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой нелитические системы экспрессии клеток насекомых. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой Sf9 клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой Sf21 клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой Hi-5 клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой Schneider 2 клетки. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева представляют собой Schneider 3 клетки.

Понятно, что на основе используемых клеток-хозяев белок IL-2 формулы (I) может включать посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование, в частности *O*-связанное и *N*-связанное гликозилирование. Хотя это прямо не упоминается, понятно, что белок IL-2 формулы (I) может содержать такие посттрансляционные модификации и что такие модифицированные белки IL-2 также охватываются настоящим изобретением. Одним из примеров такой посттрансляционной модификации является *O*-связанное гликозилирование треонина в положении 2 SEQ ID NO:1, когда белок IL-2 формулы (I) экспрессируется клетками CHO. *O*-связанный гликан может представлять собой, например, N1 (NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)GalNAc-ol) или N2 (NeuAc(a2-3)Gal(b1-3)(NeuAc(a2-6))GalNAc-ol), где NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминную кислоту (сиаловую кислоту), Gal представляет собой галактозу и GalNAc-ol представляет собой ацетилгалактозаминит. Белок IL-2 формулы (I) может согласно определенным вариантам осуществления содержать по меньшей мере один *O*-связанный N1 гликан, по меньшей мере один *O*-связанный N2 гликан, комбинацию по меньшей мере одного *O*-связанного N1 и по меньшей мере одного *O*-связанного N2 гликана или может быть негликозилированным. Согласно определенным вариантам осуществления белок IL-2 формулы (I) содержит по меньшей мере один, как например, один, *O*-связанный N1 гликан. Согласно определенным вариантам осуществления белок IL-2 формулы (I) содержит по меньшей мере один, как например, один, *O*-связанный N2 гликан. Согласно определенным вариантам осуществления белок IL-2 формулы (I) содержит комбинацию по меньшей мере одного, как например, одного, *O*-связанного N1 гликана и по меньшей мере одного, как например, одного, *O*-связанного N2 гликана. Согласно определенным вариантам осуществления белок IL-2 формулы (I) является негликозилированным. Соотношение гликанов N1 к N2 может составлять, например, 1:1.

Согласно определенным вариантам осуществления белок IL-2 формулы (I) экспрессируется в эукариотических клетках, как например, CHO клетках, и по меньшей мере 80% N-концевых концов, которые соответствуют аминокислотам 1 - 8, являются *O*-гликозилированными. Согласно выборному варианту осуществления белок IL-2 формулы (I) экспрессируется в эукариотических клетках, таких как клетки CHO, и по меньшей мере 90% N-концевых концов, которые соответствуют аминокислотам 1 - 8, являются *O*-гликозилированными

Неожиданно было обнаружено, что использование эукариотической системы экспрессии, такой как клетки CHO, приводило к улучшению растворимости и секреции белка IL-2 формулы (I). Было обнаружено, что экспрессия в клетках CHO приводит к эффективному *O*-гликозилированию N-конца (аминокислоты 1 - 8) белка IL-2 формулы

(I). Такое O-гликозилирование может оказывать положительное влияние на растворимость и секрецию, предотвращая агрегацию белка и обеспечивая правильную секрецию.

Согласно определенным вариантам осуществления белок II-2 формулы (I) экспрессируется преимущественно в нерастворимой форме, такой как, например, тельца включения. Согласно определенным вариантам осуществления белок II-2 формулы (I) представляет собой экспрессируется в виде растворимого белка. Преимущество экспрессии белка II-2 формулы (I) в виде растворимого белка состоит в том, что не требуется стадия ренатурации. Такой растворимый белок может оставаться внутри клетки или он может выделяться в среду культивирования или, в случае грамотрицательных бактерий, в периплазматическое пространство.

Присутствие свободного неспаренного цистеина в последовательности белка создает проблемы для рекомбинантной продукции, будь то выбор стратегии, основанной на тельцах включения, или стратегии растворимой секреции.

Соответственно, согласно определенным вариантам осуществления белок II-2 формулы (I) продуцируется в тельцах включения. Такой способ экспрессии дополнительно включает стадию солубилизации нерастворимого белка и стадию рефолдинга *in vitro*. Для достижения правильного образования дисульфидных мостиков во время рефолдинга обычно полезно начинать с солубилизованного развернутого белка без каких-либо существующих дисульфидных мостиков. Соответственно, согласно определенным вариантам осуществления способ дополнительно включает добавление восстанавливающего агента во время солубилизации.

Типичной задачей во время рефолдинга белка, содержащего свободный цистеин, является достижение правильного образования дисульфидного мостика между предполагаемой парой (парами) цистеина при сохранении свободного неспаренного цистеина в свободной, восстановленной форме.

Согласно определенным вариантам осуществления белок II-2 формулы (I) продуцируется путем секреции растворимого белка II-2. При экспрессии белка, содержащего свободный неспаренный цистеин, в растворимой секретлируемой форме, полученный в результате секретлируемый правильно уложенный мономерный белок часто несет дополнительное тиолсодержащее соединение, такое как цистеин, связанное со своим свободным неспаренным цистеином через дисульфидный мостик, также называемый «цистеиновый кэппинг». Таким образом, одной из стадий в способе синтеза белок II-2 формулы (I) в растворимой форме посредством секреции является необязательное кэппирование свободного цистеина. Кэппирование цистеином может происходить внеклеточно после секреции представляющего интерес белка с

тиолсодержащим соединением, таким как цистеин, цистин или глутатион, происходящим из среды культивирования в качестве субстрата для образования дисульфидных мостиков. Альтернативно, это может происходить внутриклеточно, и в этом случае тиолсодержащее соединение, такое как цистеин, используемое для кэппирования, возникает в результате метаболизма клеток, такого как метаболизм аминокислот.

В качестве побочного продукта свободные цистеины в интересующем белке могут реагировать с образованием дисульфидных мостиков между молекулами, что приводит к образованию димеров представляющего интерес белка. Количество правильно уложенного мономера, кэппированного тиолсодержащим соединением, таким как цистеин, может быть увеличено посредством оптимизации условий культивирования клеток, например, посредством изменения концентрации цистина, окисленной димерной формы цистеина, в среде. Также возможно получить кэппирование свободного цистеина глутатионом, а не цистеином, путем изменения концентрации глутатиона в среде. Соответственно, согласно определенным вариантам осуществления белок II-2 формулы (I) кэппирован цистеином. Согласно определенным вариантам осуществления белок II-2 формулы (I) кэппирован глутатионом.

Дисульфидно-связанные высокомолекулярные агрегаты и мультимеры часто образуются при экспрессии белка, содержащего свободный цистеин. Кроме того, может происходить неправильное образование дисульфидных связей между непредусмотренными парами цистеина (меж- и внутримолекулярными), т.е. «скремблирование» дисульфидных связей. Скремблирование дисульфидных мостиков и образование агрегатов и мультимеров во время секреции можно уменьшить, например, за счет оптимизации последовательности лидерной или сигнальной последовательности, используемой для направления секреции, или выбора совершенно другой лидерной последовательности за счет увеличения экспрессии фолдинговых шаперонов и ферментов протеиндисульфидизомеразы, путем экспрессии фолдинговых шаперонов и ферментов протеиндисульфидизомеразы из других организмов, путем экспрессии синтетических фолдинговых шаперонов и протеиндисульфидизомераз, путем изменения температуры, путем добавления короткоцепочечных жирных кислот в среду культивирования или путем добавления антиоксидантов в сред.

Проблемы, описанные выше в отношении секреции белков, содержащих свободный цистеин, часто приводят к низкому выходу правильно свернутого, кэппированного цистеином мономерного белка, секретлируемого в среду.

Одним из способов увеличения выхода представляющего интерес секретлируемого белка является улучшение механизма отщепления сигнальной или лидерной

последовательности, направляющей белок для секреции. Правильная обработка сигнальной или лидерной последовательности является решающим этапом пути секреции, поскольку она высвобождает N-конец зрелого секретируемого белка и обычно требуется для достижения эффективной секреции. Неполное расщепление сигнальной или лидерной последовательности обычно приводит к внутриклеточному накоплению белка, хотя в некоторых случаях может секретироваться и не полностью процессированный продукт.

В большинстве систем экспрессии секреция управляется сигнальным пептидом секреции, который сливается с N-концом секретируемого белка и отщепляется специфическими процессирующими ферментами клетки-хозяина до или во время секреции. Соответственно, белок IL-2 формулы (I) представляет собой вариант осуществления, экспрессируемый с сигнальным пептидом секреции, который отщепляется специфическими процессирующими ферментами клетки-хозяина до или во время секреции.

В системах экспрессии млекопитающих сигнальный пептид представляет собой согласно определенным вариантам осуществления сигнальный пептид любого природного секретируемого белка. Согласно определенным вариантам осуществления сигнальный пептид для систем экспрессии млекопитающих согласно определенным вариантам осуществления, таким образом, представляет собой сигнальный пептид природного секретируемого белка. Согласно определенным вариантам осуществления сигнальный пептид для систем экспрессии млекопитающих представляет собой неприродный синтетический сигнальный пептид, секвенирование которого разработано *in silico* или экспериментально установлено, что он эффективно управляет секрецией.

В *E. coli* сигнальная последовательность, направляющая белок к периплазматической секреции, может быть сигнальным пептидом любой бактерии, естественным образом секретируемым в периплазму. Согласно определенным вариантам осуществления сигнальный пептид для экспрессии белка IL-2 формулы (I) в *E. coli* выбран из группы, состоящей из *phoA*, *dsbA*, *gIII*, *mal*, *OmpA*, *OmpC*, *OmpT*, *pelB*, *torA*, *torT*, *EOX*, *STII*, *SfmC*, *lamB*, *MglB*, *MmAp* и *tolB*. Согласно определенным вариантам осуществления сигнальный пептид представляет собой неприродную последовательность, разработанную *in silico* или экспериментально обнаруженную для эффективного управления секрецией.

В системах экспрессии дрожжей, таких как *S. cerevisiae* и *Pichia pastoris*, лидерная последовательность, направляющая экспрессию, может содержать сигнальную последовательность и пропептид, причем сигнальная последовательность направляет белок, секретируемый в ER, и отщепляется вместе с транспортом в ER, и пропептид отщепляется в аппарате Гольджи ферментом Kex2 перед секрецией в среду для роста.

Лидерная последовательность может быть лидерной последовательностью естественно секретируемого фермента или феромона. Таким образом, в соответствии с предполагаемым вариантом осуществления лидерная последовательность белка IL-2 формулы (I) для экспрессии в системе экспрессии дрожжей выбрана из группы, состоящей из лидерной последовательности Альфа, лидерной последовательности *SUC2* и лидерной последовательности *VOA1* фактора скрещивания *S. cerevisiae*. Согласно определенным вариантам осуществления лидерная последовательность получена из секретируемого белка других дрожжей или нитевых грибов, или это может быть неприродная лидерная последовательность, разработанная *in silico*, или это может быть лидерная последовательность, которая, как было установлено экспериментально, эффективно управляет укладкой и секрецией. Лидерная последовательность также может быть экспериментально идентифицирована из большой библиотеки лидерных последовательностей, например, включающей множество комбинаций случайных аминокислотных замен.

Правильное расщепление сигнальной или лидерной последовательности эндогенными процессирующими ферментами клетки-хозяина зависит от последовательности аминокислот, следующих непосредственно за сайтом расщепления, которые составляют N-конец зрелого процессированного и секретируемого рекомбинантного белка. В дополнение к специфической N-концевой аминокислотной последовательности представляющего интерес белка доступность N-конца представляющего интерес свернутого белка может влиять на эффективность процессинга сигнальной последовательности или лидера. Например, скрытый N-конец может быть недоступен для процессинговой протеазы и, следовательно, будет проблематичным для стратегии секреции.

Используя модели прогнозирования, построенные на имеющихся экспериментальных данных, можно рассчитать вероятность расщепления определенной аминокислотной последовательности сигнальным пептидазным комплексом. Такие инструменты доступны онлайн, позволяя специалисту в данной области предсказать вероятность правильного процессинга сигнального пептида у эукариот и бактерий. В системах экспрессии дрожжей лидерная последовательность обычно включает как сигнальную последовательность, расщепляемую сигнальным пептидазным комплексом в ER, так и пропептид, расщепляемый фуриновой протеазой Kex2 в Golgi. Сайт узнавания Kex2, KR, хорошо консервативен среди субстратов Kex2 у разных видов дрожжей. Известно, что отрицательно заряженные аминокислоты сверхпредставлены в положениях

P1', P2' и P4' субстратов Kex2. Однако потенциальное расщепление с помощью Kex2 обычно требует экспериментального изучения в каждом конкретном случае.

Специалистам в данной области техники хорошо известно, что правильная обработка сигнальной или лидерной последовательности является одной из нескольких характеристик, необходимых для эффективной секреции правильно свернутого и растворимого белка. Примерами важных признаков являются адекватные скорости транскрипции и трансляции, ко- или посттрансляционная транслокация в ER, фолдинг и образование правильных дисульфидных мостиков в ER и везикулярный транспорт из клетки. Поэтому экспериментальная проверка любого компьютерного предсказания эффективности секреции имеет существенное значение.

Известно, что внутриклеточное накопление неправильно свернутого или агрегированного белка может негативно повлиять на физиологию клетки-хозяина, потенциально индуцируя стрессовые реакции и вызывая снижение скорости роста и приспособленности клеток. Следовательно, предотвращение внутриклеточного накопления за счет улучшения обработки сигнальной или лидерной последовательности может привести к увеличению скорости роста, плотности клеток и продуктивности клеточной массы, что положительно влияет на общую продуктивность представляющего интерес белка. Кроме того, более приспособленная клеточная линия с большей вероятностью будет стабильно работать в разных масштабах и условиях культивирования и лучше справляться с нарушениями процесса. Кроме того, специалисты в данной области обычно признают, что клеточные линии с нормальной скоростью роста и приспособленностью клеток имеют меньший риск нестабильности, чем клеточные линии со сниженной скоростью роста и приспособленностью клеток в результате эффектов экспрессии трансгена, таких как внутриклеточное накопление продукта. Для клеточной линии со сниженной скоростью роста, обусловленной экспрессией трансгена, возникновение события, снижающего экспрессию трансгена (например, событие молчания гена, мутация или выпетливание трансгена посредством прямой повторной рекомбинации), приводит к конкурентному преимуществу в росте. Клетки со сниженной экспрессией быстро вытесняют другие клетки в популяции, все еще экспрессирующие трансген на высоких уровнях, что приводит к нестабильному фенотипу экспрессии.

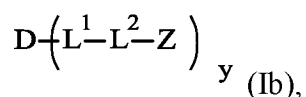
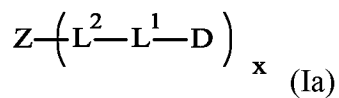
Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева, экспрессирующие один или несколько генов, кодирующих белок П-2 формулы (I), могут содержать один или несколько генов, кодирующих белок П-2 формулы (I), в своем геноме.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к конъюгату, содержащему один или несколько белков II-2 формулы (I).

Согласно определенным вариантам осуществления указанный конъюгат содержит фрагмент M_{mod} , конъюгированный с цистеином, отмеченным звездочкой, в белке II-2 формулы (I). Необязательно, дополнительные фрагменты M_{mod} могут быть конъюгированы с белком II-2 формулы (I) в других положениях, где дополнительные фрагменты M_{mod} могут быть одинаковыми или различными. Присоединение такого дополнительного фрагмента M_{mod} может быть при N-конце, C-конце, при аминокислотной боковой цепи или во внутреннем положении белка II-2. Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого дополнительного фрагмента M_{mod} происходит при N-конце белка II-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого дополнительного фрагмента M_{mod} происходит при C-конце белка II-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого дополнительного фрагмента M_{mod} происходит во внутреннем положении фрагмента II-2, как например, при аминокислотной боковой цепи белка II-2 формулы (I). Если более одного дополнительного фрагмента M_{mod} присоединяется к белку II-2 формулы (I), присоединение может происходить в любой комбинации сайтов связывания, выбранных из группы, состоящей из N-конца, C-конца и внутреннего сайта. Варианты осуществления M_{mod} раскрыты в настоящем документе. Необязательно, один или несколько фрагментов $-L^1-L^2-Z$ могут быть конъюгированы с фрагментом M_{mod} , где $-L^1-$, $-L^2-$ и Z определены в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления один или несколько фрагментов $-L^1-L^2-Z$ конъюгированы с фрагментом M_{mod} , который конъюгирован с цистеином, отмеченным звездочкой, в формуле (I).

Конкретные варианты осуществления M_{mod} раскрыты в настоящем документе.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат представляет собой конъюгат II-2 или его фармацевтически приемлемую соль формулы (Ia) или (Ib)



где

-D содержит белок II-2 формулы (I),

$-L^1-$ представляет собой линкерный фрагмент, ковалентно и обратимо присоединенный к -D,

$-L^2$ - представляет собой химическую связь или представляет собой спейсерный фрагмент,

$-Z$ представляет собой полимерный фрагмент или фрагмент замещенной жирной кислоты,

x представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16, и

y представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 2, 3, 4 и 5.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгаты формулы (Ia) и (Ib) высвобождают несимметричный фрагмент П-2 или несимметричный белок П-2 формулы (I), где соотношение $\text{Соотношение}_{\text{несимметричный П-2}}$ и $\text{Соотношение}_{\text{алдеслейкин}}$ составляет более 1, предпочтительно более 2, предпочтительно более 3, предпочтительно более 4 и даже более предпочтительно более 5. Согласно определенным вариантам осуществления соотношение $\text{Соотношение}_{\text{несимметричный П-2}}$ и $\text{Соотношение}_{\text{алдеслейкин}}$ составляет более 10, более 20, более 50, более 70, более 100 или более 150.

Согласно определенным вариантам осуществления $-D$ формулы (Ia) или (Ib) содержит модифицирующий фрагмент M_{mod} , конъюгированный с тиолом остатка цистеина, отмеченного звездочкой, в белке П-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления такой фрагмент M_{mod} является стабильным, конъюгированным с тиолом остатка цистеина, отмеченного звездочкой, в белке П-2 формулы (I). Необязательно, $-D$ может содержать один или несколько дополнительных фрагментов M_{mod} , стабильно конъюгированных с $-D$, которые могут быть одинаковыми или различными фрагментами M_{mod} . Необязательно, один или несколько дополнительных фрагментов $-L^1-L^2-Z$ конъюгированы с M_{mod} .

Согласно одному варианту осуществления M_{mod} является заместителем. Предпочтительно, такой заместитель имеет молекулярную массу в интервале от 15 Да до 1 кДа.

Такой фрагмент M_{mod} согласно одному варианту осуществления может быть введен в виде дисульфидного мостика, такого как дисульфидный мостик, образованный между тиоловыми группами двух остатков цистеина, один из которых представляет собой цистеин, отмеченный звездочкой в формуле (I). Другой цистеиновый остаток дисульфидной мостиковой связи может быть природным цистеиновым остатком. Согласно определенным вариантам осуществления такой другой цистеин не встречается в природе, но был добавлен или вставлен в белок П-2 формулы (I) или заменен встречающимся в природе аминокислотным остатком белка П-2 формулы (I). Способы

получения таких дисульфидных мостиков раскрыты в Jones et al. (J. Am. Chem. Soc., 2012, 134 (3), pp 1847-1852), WO2011/018611, WO2011/018612 и WO2011/018613.

Согласно другому варианту осуществления M_{mod} представляет собой полимерный фрагмент. Такой полимерный фрагмент может включать линейный, разветвленный или мультиразветвленный полимер. Согласно определенным вариантам осуществления полимер представляет собой линейный полимер. Согласно другому варианту осуществления полимер представляет собой разветвленный полимер. Такой разветвленный полимер предпочтительно имеет одну, две, три, четыре или пять точек разветвления. Из каждой точки разветвления предпочтительно выходят две, три или четыре полимерные цепи. Согласно другому варианту осуществления полимер представляет собой мультиразветвленный полимер. Такой мультиразветвленный полимер предпочтительно имеет 3, 4, 5, 6, 7 или 8 полимерных цепей.

Если M_{mod} представляет собой полимерный фрагмент, такой полимерный фрагмент согласно определенным вариантам осуществления имеет молекулярную массу в интервале от 0.5 кДа до 1000 кДа, как например, от 1 кДа до 1000 кДа, как например, от 2 кДа до 500 кДа, от 3 кДа до 200 кДа, от 5 кДа до 120 кДа или от 7 до 40 кДа. Согласно одному варианту осуществления такой полимер имеет молекулярную массу около 0.5 кДа. Согласно одному варианту осуществления такой полимер имеет молекулярную массу около 1 кДа. Согласно одному варианту осуществления такой полимер имеет молекулярную массу около 2 кДа. Согласно одному варианту осуществления такой полимер имеет молекулярную массу около 3 кДа. Согласно одному варианту осуществления такой полимер имеет молекулярную массу около 4 кДа. Согласно одному варианту осуществления такой полимер имеет молекулярную массу около 5 кДа. Согласно одному варианту осуществления такой полимер имеет молекулярную массу около 7.5 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу около 10 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу около 15 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу около 20 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу около 30 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу около 40 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу около 50 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу около 70 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу около 80 кДа. Согласно другому

варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу около 90 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу около 100 кДа. Согласно одному варианту осуществления такой полимер имеет молекулярную массу 0.5 кДа. Согласно одному варианту осуществления такой полимер имеет молекулярную массу 1 кДа. Согласно одному варианту осуществления такой полимер имеет молекулярную массу 2 кДа. Согласно одному варианту осуществления такой полимер имеет молекулярную массу 3 кДа. Согласно одному варианту осуществления такой полимер имеет молекулярную массу 4 кДа. Согласно одному варианту осуществления такой полимер имеет молекулярную массу 5 кДа. Согласно одному варианту осуществления такой полимер имеет молекулярную массу 7.5 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу 10 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу 15 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу 20 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу 30 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу 40 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу 50 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу 70 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу 80 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу 90 кДа. Согласно другому варианту осуществления такой полимерный фрагмент имеет молекулярную массу 100 кДа.

Если M_{mod} представляет собой полимерный фрагмент, такой полимерный фрагмент согласно определенным вариантам осуществления содержит полимер, выбранный из группы, состоящей из 2-метакрилоил-оксиэтила фосфоилхолинов, поли(акриловых кислот), поли(акрилатов), поли(акриламидов), поли(алкилокси) полимеров, поли(амидов), поли(амидоаминов), поли(аминокислот), поли(ангидридов), поли(аспартамидов), поли(масляных кислот), поли(гликолевых кислот), полибутилентерефталатов, поли(капролактонов), поли(карбонатов), поли(цианоакрилатов), поли(диметилакриламидов), поли(сложных эфиров), поли(этиленов), поли(этиленгликолей), поли(этиленоксидов), поли(этилфосфатов), поли(этилоксазолинов), поли(гликолевых кислот), поли(гидроксиэтилакрилатов), поли(гидроксиэтил-оксазолинов), поли(гидроксипропил метакрилатов), поли(гидроксипропил-оксазолинов), поли(иминокарбонатов), поли(молочных кислот),

поли(сополимеров молочных и гликолевых кислот), поли(метакриламидов), поли(метакрилатов), поли(метилоксазолинов), поли(органофосфазенов), поли(ортосложных эфиров), поли(оксазолинов), поли(пропиленгликолей), поли(силоксанов), поли(уретанов), поли(виниловых спиртов), поли(виниламинов), поли(винилметиловых простых эфиров), поли(винилпирролидонов), силиконов, целлюлоз, карбометилцеллюлоз, гидроксипропил метилцеллюлоз, хитинов, хитозанов, декстранов, декстринов, желатинов, гиалуроновых кислот и производных, функционализированных гиалуроновых кислот, маннанов, пектинов, рамногалактуронанов, крахмалов, гидроксиалкил крахмалов, гидроксиэтил крахмалов и других полимеров на основе углеводов, ксиланов и их сополимеров.

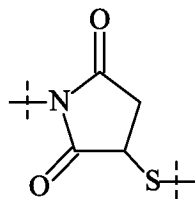
Согласно одному варианту осуществления M_{mod} представляет собой полимер на основе ПЭГ.

Согласно другому варианту осуществления M_{mod} представляет собой полимер на основе гиалуроновой кислоты.

Согласно другому варианту осуществления M_{mod} содержит пептидный или белковый фрагмент, который может быть химически конъюгирован в белком IL-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления Предпочтительно, этот пептидный или белковый фрагмент M_{mod} не представляет собой составляющую IL-2 или фрагмент IL-2.

M_{mod} в форме пептидного или белкового фрагмента может представлять собой фрагмент синтетического или природного белка или его часть, или вариант. Примеры не-IL-2 фрагментов включают альбумин; домены антител, такие как домены Fc или антигенсвязывающие домены иммуноглобулинов; СТР и CD25; каждый либо в их природной форме, либо как вариант или составляющая.

Присоединение M_{mod} к белку IL-2 формулы (I) может быть через стабильную связь. Согласно определенным вариантам осуществления связь между белком IL-2 формулы (I) и молекулой M_{mod} осуществляется через амид. Согласно определенным вариантам осуществления связь между белком IL-2 формулы (I) и молекулой M_{mod} осуществляется



через фрагмент

Конъюгат согласно настоящему изобретению может содержать фрагмент M_{mod} , конъюгированный с цистеином, отмеченным звездочкой, в белке IL-2 формулы (I) и

может необязательно содержать один или несколько дополнительных фрагментов M_{mod} , конъюгированных с белком IL-2 формулы (I).

Присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} может быть при протеиногенном или непротеиногенном аминокислотном остатке белка IL-2. Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при протеиногенной аминокислоте. Такой протеиногенный аминокислотный остаток согласно определенным вариантам осуществления выбран из группы, состоящей из цистеина, метионина, гистидина, лизина, триптофана, серина, треонина, тирозина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глутамина и аргинина. Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при непротеиногенной аминокислоте. В этом случае подразумевается, что такой непротеиногенный аминокислотный остаток искусственно введен в белок IL-2 формулы (I). Такой непротеиногенный аминокислотный остаток может быть любым непротеиногенным аминокислотным остатком, имеющим функциональную группу, доступную для конъюгирования M_{mod} с белком IL-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления такая непротеиногенная аминокислота содержит функциональную группу в своей боковой цепи, выбранную из группы, состоящей из карбонила, карбонильных производных, таких как карбонилподобные, меченые карбонильные и защищенные карбонильные группы, азида, оксима и гидроксиламина.

Согласно определенным вариантам осуществления такой непротеиногенной аминокислотой является непротеиногенная аминокислота, как описано в WO 2006/069246A2, причем непротеиногенные аминокислоты включены в настоящий документ посредством ссылки. Согласно определенным вариантам осуществления непротеиногенная аминокислота имеет структуру, описанную в формуле (I) в [00265] - [00283], формулы (XXX) в [00284], формулы (XXX-A) в [00285], формулы (XXX-B) в [00286], формулы (XXXI) в [00287], формулы (XXXI-A) в [00288], формулы (XXXI-B) в [00289], формулы (XXXII) в [00290], формулы (XXXII-A) в [00291], формулы (XXXII-B) в [00292], формулы (XXXX) в [00293], формулы (XXXXI) в [00294], формулы (XXXXII) в ошибочно обозначенном абзаце [0100], то есть абзац между [00294] и [00295], формулы (XXXXIII) в [00295] и [00296], формулы (XIV) в [00302] - [00305], формулы (XV) в [00306] и [00307], формулы (XI) в [00310] - [00312], формулы (XII) в [00313], формулы (XII) в [00314] и [00315], формулы (XIV) в [00316], формулы (XVI) в [00317], формулы (XVI) в [00318] и [00319], формулы (XVIII) в [00320] и [00321], или формулы (XXIX) в

[00530] в WO2006/069246A2, непротеиногенные аминокислоты, раскрытые в которых, включены в настоящий документ посредством ссылки.

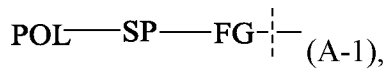
Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при лизиновом остатке фрагмента II-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при треониновом остатке фрагмента II-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при сериновом остатке фрагмента II-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при тирозиновом остатке фрагмента II-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при гистидиновом остатке фрагмента II-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при триптофановом остатке фрагмента II-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при остатке аспарагиновой кислоты фрагмента II-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при остатке глутаминовой кислоты фрагмента II-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при аргининовом остатке фрагмента II-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при цистеиновом остатке фрагмента II-2 формулы (I) отличен от отмеченного звездочкой. Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при метиониновом остатке фрагмента II-2 формулы (I). Согласно определенным вариантам осуществления присоединение такого одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при глутаминовом остатке фрагмента II-2 формулы (I).

Понятно, что согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению может иметь такой один или несколько дополнительных фрагментов M_{mod} , присоединенных к более чем одному типу аминокислотного остатка, например, к дополнительному цистеину и лизину.

Согласно определенным вариантам осуществления присоединение по меньшей мере одного из таких одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит в положении аминокислоты белка IL-2 формулы (I), о котором известно, что оно участвует в связывании с IL-2R α . Таким образом, согласно определенным вариантам осуществления, присоединение по меньшей мере одного из таких одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} приводит к снижению аффинности белка IL-2 формулы (I) к IL-2R $\alpha\beta$ по сравнению с альдеслейкином, т.е. приводит к несимметричному фрагменту IL-2. Согласно определенным вариантам осуществления присоединение по меньшей мере одного из таких одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит в положении, выбранном из группы, состоящей из K34 последовательности SEQ ID NO:1, M1 последовательности SEQ ID NO:2, T3 последовательности SEQ ID NO:2, F4 последовательности SEQ ID NO:2, K5 последовательности SEQ ID NO:2, F6 последовательности SEQ ID NO:2, Y7 последовательности SEQ ID NO:2, E24 последовательности SEQ ID NO:2, E30 последовательности SEQ ID NO:2, L34 последовательности SEQ ID NO:2, M1 последовательности SEQ ID NO:12, T3 последовательности SEQ ID NO:12, F4 последовательности SEQ ID NO:12, K5 последовательности SEQ ID NO:12, F6 последовательности SEQ ID NO:12, Y7 последовательности SEQ ID NO:12, E24 последовательности SEQ ID NO:12, E30 последовательности SEQ ID NO:12 и L34 последовательности SEQ ID NO:12. Согласно определенным вариантам осуществления присоединение по меньшей мере одного из таких одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит в положении, выбранном из группы, состоящей из F4 последовательности SEQ ID NO:2, Y7 последовательности SEQ ID NO:2, E24 последовательности SEQ ID NO:2, E30 последовательности SEQ ID NO:2 и L34 последовательности SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления присоединение по меньшей мере одного из таких одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит в положении, выбранном из группы, состоящей из F4 последовательности SEQ ID NO:12, Y7 последовательности SEQ ID NO:12, E24 последовательности SEQ ID NO:12, E30 последовательности SEQ ID NO:12 и L34 последовательности SEQ ID NO:12. Согласно определенным вариантам осуществления присоединение по меньшей мере одного из таких одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при K34 последовательности SEQ ID NO:1. Согласно определенным вариантам осуществления присоединение по меньшей мере одного из таких одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при M1 последовательности SEQ ID NO:2. Согласно определенным вариантам осуществления присоединение по меньшей мере одного из

таких одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при E24 последовательности SEQ ID NO:12. Согласно определенным вариантам осуществления присоединение по меньшей мере одного из таких одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при E30 последовательности SEQ ID NO:12. Согласно определенным вариантам осуществления присоединение по меньшей мере одного из таких одного или нескольких дополнительных фрагментов M_{mod} происходит при L34 последовательности SEQ ID NO:12.

Согласно определенным вариантам осуществления M_{mod} имеет формулу (A-1)



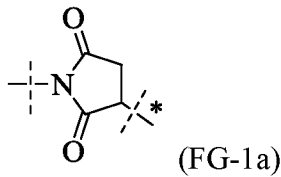
где

-FG- представляет собой связь,

-SP- представляет собой спейсерный фрагмент, и

-POL представляет собой полимер.

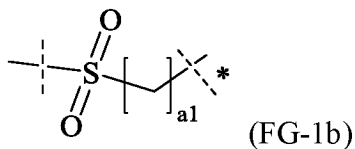
Согласно определенным вариантам осуществления -FG- формулы (A-1) имеет формулу (FG-1a)



где

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому серы цистеина, отмеченного звездочкой, в формуле (I) и неотмеченная пунктирная линия показывает присоединение -SP-.

Согласно определенным вариантам осуществления -FG- формулы (A-1) имеет формулу (FG-1b)



где

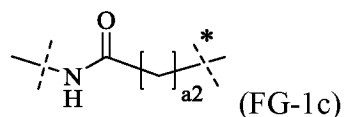
пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому серы цистеина, отмеченного звездочкой, в формуле (I),

неотмеченная пунктирная линия показывает присоединение к -SP-, и

a_1 выбрано из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20.

Согласно определенным вариантам осуществления a1 формулы (FG-1b) представляет собой целое число в интервале 1 - 8. Согласно определенным вариантам осуществления a1 формулы (FG-1b) представляет собой целое число в интервале 1 - 6. Согласно определенным вариантам осуществления a1 формулы (FG-1b) представляет собой целое число в интервале 1 - 4. Согласно определенным вариантам осуществления a1 формулы (FG-1b) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления a1 формулы (FG-1b) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления a1 формулы (FG-1b) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления a1 формулы (FG-1b) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления a1 формулы (FG-1b) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления a1 формулы (FG-1b) представляет собой 6.

Согласно определенным вариантам осуществления -FG- формулы (A-1) имеет формулу (FG-1c)



где

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому серы цистеина, отмеченного звездочкой, в формуле (I),

неотмеченная пунктирная линия показывает присоединение к -SP-, и

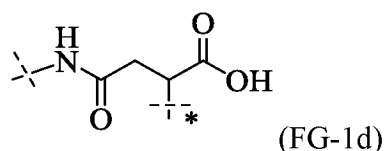
a2 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20.

Согласно определенным вариантам осуществления a2 формулы (FG-1c) представляет собой целое число в интервале 1 - 8. Согласно определенным вариантам осуществления a2 формулы (FG-1c) представляет собой целое число в интервале 1 - 6. Согласно определенным вариантам осуществления a2 формулы (FG-1c) представляет собой целое число в интервале 1 - 4. Согласно определенным вариантам осуществления a2 формулы (FG-1c) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления a2 формулы (FG-1c) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления a2 формулы (FG-1c) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления a2 формулы (FG-1c) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления a2 формулы (FG-1c) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления a2 формулы (FG-1c) представляет собой 6.

Согласно определенным вариантам осуществления M_{mod} конъюгируют с остатком цистеина, отмеченным звездочкой в формуле (I), посредством реакции тиола указанного цистеина с малеимидной функциональной группой, приводящей к образованию связи согласно структуре FG-1a. Образовавшееся тиосукцинимидное кольцо может подвергнуться ретро-реакции Михаэля, которая может вызвать высвобождение M_{mod} . Эту реакцию можно свести к минимуму или избежать, подвергая соединение, содержащее такой тиосукцинимид или его производное, такое как бромированный тиосукцинимид, условиям, которые приводят к гидролизу, что приводит к раскрытию пятичленного кольца. Полученный линейный простой тиоэфир значительно более стабилен, что снижает риск высвобождения M_{mod} . В то время как гидролиз тиосукцинимидов происходит медленно при кислотном pH, он значительно быстрее при нейтральном или щелочном pH и повышенной температуре. Было обнаружено, что инкубация при повышенном pH и повышенной температуре в течение нескольких часов приводит к образованию связей, как показано в формулах (FG-1d) и (FG-1e), что приводит к стабильной связи M_{mod} с цистеиновым остатком, отмеченным звездочкой, в формуле (I).

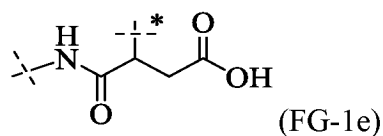
Согласно определенным вариантам осуществления конъюгаты, содержащие фрагмент M_{mod} , инкубируют при повышенном pH, таком как pH 9, и повышенной температуре, такой как 25 °C, в течение нескольких часов, таких как по меньшей мере 10 часов или по меньшей мере 12 часов.

Соответственно, согласно определенным вариантам осуществления -FG- формулы (A-1) имеет формулу (FG-1d)



где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому серы цистеина, отмеченного звездочкой, в формуле (I) и неотмеченная пунктирная линия показывает присоединение -SP-.

Соответственно, согласно определенным вариантам осуществления -FG- формулы (A-1) имеет формулу (FG-1e)



где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому серы цистеина, отмеченного звездочкой, в формуле (I) и неотмеченная пунктирная линия показывает присоединение -SP-.

Согласно определенным вариантам осуществления -SP- формулы (А-1) выбрано из группы, состоящей из C_{1-50} алкила, C_{2-50} алкенила и C_{2-50} алкинила, где C_{1-50} алкил, C_{2-50} алкенил и C_{2-50} алкинил необязательно замещены одним или несколькими R^9 , которые являются одинаковыми или различными, и где C_{1-50} алкил, C_{2-50} алкенил и C_{2-50} алкинил необязательно прерываются одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из -T-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{10})-, -S(O)₂N(R^{10})-, -S(O)N(R^{10})-, -S(O)₂-, -S(O)-, -N(R^{10})S(O)₂N(R^{10a})-, -S-, -N(R^{10})-, -OC(OR¹⁰)(R^{10a})-, -N(R^{10})C(O)N(R^{10a})- и -OC(O)N(R^{10})-,

каждый T независимо выбран из группы, состоящей из фенила, нафтила, инденила, инданила, тетралина, C_{3-10} циклоалкила, 3-10-ти членного гетероцикла, 8-11-ти членного гетеробифидиала, 8-30-ти членного карбополицикла и 8-30-ти членного гетерополицикла, где каждый T независимо необязательно замещен одним или несколькими R^9 , которые являются одинаковыми или различными,

каждый $-R^9$ независимо выбран из группы, состоящей из галогена, -CN, оксо (=O), -COOR¹¹, -OR¹¹, -C(O)R¹¹, -C(O)N(R^{11} R^{11a}), -S(O)₂N(R^{11} R^{11a}), -S(O)N(R^{11} R^{11a}), -S(O)₂R¹¹, -S(O)R¹¹, -N(R^{11})S(O)₂N(R^{11a} R^{11b}), -SR¹¹, -N(R^{11} R^{11a}), -NO₂, -OC(O)R¹¹, -N(R^{11})C(O)R^{11a}, -N(R^{11})S(O)₂R^{11a}, -N(R^{11})S(O)R^{11a}, -N(R^{11})C(O)OR^{11a}, -N(R^{11})C(O)N(R^{11a} R^{11b}), -OC(O)N(R^{11} R^{11a}) и C_{1-6} алкил, где C_{1-6} алкил независимо замещен одним или несколькими галогенами, которые являются одинаковыми или различными, и

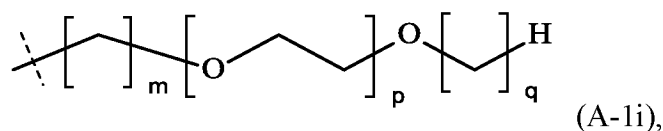
каждый $-R^{10}$, $-R^{10a}$, $-R^{11}$, $-R^{11a}$ и $-R^{11b}$ независимо выбран из группы, состоящей из -H и C_{1-6} алкила, где C_{1-6} алкил независимо необязательно замещен одним или несколькими галогенами, которые являются одинаковыми или различными.

Согласно определенным вариантам осуществления -SP- формулы (А-1) представляет собой C_{1-20} алкил, где C_{1-20} алкил необязательно замещен одним или несколькими $-R^9$, и где C_{1-20} алкил необязательно прерывается одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из -O-, -C(O)N(R^{10})-, -S(O)₂-, -S(O)-, -S-, -N(R^{10})-, -OC(OR¹⁰)(R^{10a})-, -N(R^{10})C(O)N(R^{10a})- и -OC(O)N(R^{10})-, где каждый $-R^9$ выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкила, и каждый $-R^{10}$ и $-R^{10a}$ независимо выбран из группы, состоящей из -H и C_{1-6} алкила.

Согласно определенным вариантам осуществления -SP- формулы (А-1) представляет собой C_{1-10} алкил, где C_{1-10} алкил необязательно замещен одним или несколькими $-R^9$, и где C_{1-10} алкил необязательно прерывается одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из -O-, -C(O)N(R^{10})-, -S(O)₂-, -S(O)-, -S-, -N(R^{10})-, -OC(OR¹⁰)(R^{10a})-, -N(R^{10})C(O)N(R^{10a})- и -OC(O)N(R^{10})-, где каждый $-R^9$ выбран из

группы, состоящей из C₁₋₆ алкила, и каждый -R¹⁰ и -R^{10a} независимо выбран из группы, состоящей из -H и C₁₋₆ алкила.

Согласно определенным вариантам осуществления -POL формулы (A-1) представляет собой полимер на основе ПЭГ. Согласно определенным вариантам осуществления -POL имеет формулу (A-1i)



где

пунктирная линия показывает присоединение к -SP-,

m представляет собой 0 или 1,

p представляет собой целое число в интервале от 12 до 22700, и

q выбрано из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

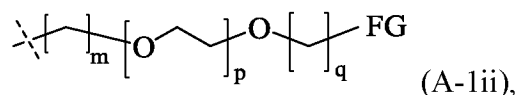
Согласно определенным вариантам осуществления m формулы (A-1i) представляет собой 0. Согласно определенным вариантам осуществления m формулы (A-1i) представляет собой 1.

Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой целое число в интервале от 23 до 227000, как например, от 45 до 11300, или от 69 до 4540, или от 114 до 2700. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой около 12. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой около 23. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой около 46. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой около 68. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой около 90. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой около 112. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой около 170. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой около 227. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой около 340. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой около 450. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой около 680. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой около 900. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой около 1130. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-1i) представляет собой около 1350. Согласно определенным вариантам

осуществления р формулы (A-1i) представляет собой около 1590. Согласно определенным вариантам осуществления р формулы (A-1i) представляет собой около 1800. Согласно определенным вариантам осуществления р формулы (A-1i) представляет собой около 2045. Согласно определенным вариантам осуществления р формулы (A-1i) представляет собой около 2275.

Согласно определенным вариантам осуществления q формулы (A-1i) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления q формулы (A-1i) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления q формулы (A-1i) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления q формулы (A-1i) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления q формулы (A-1i) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления q формулы (A-1i) представляет собой 6.

Согласно определенным вариантам осуществления -POL формулы (A-1) имеет формулу (A-1ii)



где

пунктирная линия показывает присоединение к -SP-,

FG представляет собой функциональную группу,

m представляет собой 0 или 1,

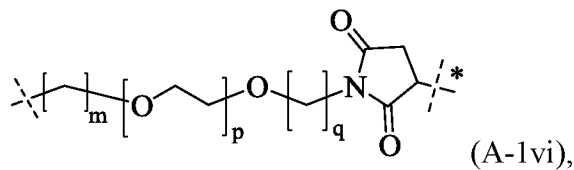
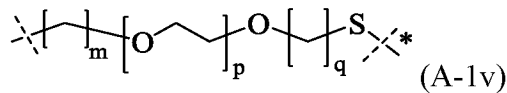
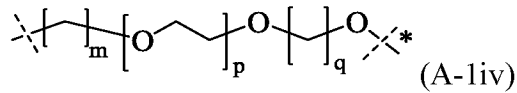
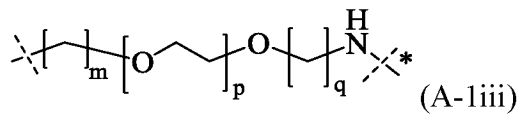
p представляет собой целое число в интервале от 12 до 22700, и

q выбрано из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

Если фрагмент M_{mod} формулы (A-1) должен быть конъюгирован с дополнительными фрагментами, такими как один или более фрагментов $-L^1-L^2-Z$, предпочтительно, если фрагмент -POL заканчивается функциональной группой. Подразумевается, что если -POL имеет формулу (A-1ii), такое соединение является реагентом, и что после конъюгирования такого одного или более фрагментов, таких как один или более фрагментов $-L^1-L^2-Z$, с функциональной группой указанного реагента, FG более не присутствует, но образует связь с подходящей функциональной группой, присутствующей в форме реагента одного или более дополнительных фрагментов.

Также понятно, что также другие сайты присоединения для фрагментов, подлежащих конъюгированию с M_{mod} , таких как фрагменты $-L^1-L^2-Z$, могут быть возможны.

Если дополнительный фрагмент, такой как фрагмент $-L^1-L^2-Z$, конъюгирован с M_{mod} через фрагмент $-POL$ формулы (A-1), фрагмент $-POL$ может иметь формулы (A-1iii), (A-1iv), (A-1v) или (A-1vi)



где

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к другому фрагменту, такому как фрагмент $-L^1-L^2-Z$,

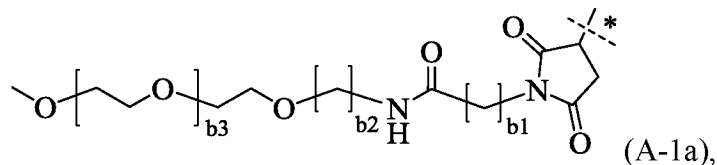
неотмеченная пунктирная линия показывает присоединение к $-SP-$, и

m , p и q имеют значения, как определено в формуле (A-1i).

Согласно определенным вариантам осуществления дополнительный фрагмент, такой как фрагмент $-L^1-L^2-Z$, конъюгирован с M_{mod} через фрагмент $-POL$ формулы (A-1), с получением фрагмента $-POL$ формулы (A-1iii). Согласно определенным вариантам осуществления дополнительный фрагмент, такой как фрагмент $-L^1-L^2-Z$, конъюгирован с M_{mod} через фрагмент $-POL$ формулы (A-1), с получением фрагмента $-POL$ формулы (A-1iv). Согласно определенным вариантам осуществления дополнительный фрагмент, такой как фрагмент $-L^1-L^2-Z$, конъюгирован с M_{mod} через фрагмент $-POL$ формулы (A-1), с получением фрагмента $-POL$ формулы (A-1v). Согласно определенным вариантам осуществления дополнительный фрагмент, такой как фрагмент $-L^1-L^2-Z$, конъюгирован с M_{mod} через фрагмент $-POL$ формулы (A-1), с получением фрагмента $-POL$ формулы (A-1vi).

Согласно определенным вариантам осуществления $-POL$ формулы (A-1) представляет собой полимер на основе гиалуроновой кислоты.

Согласно определенным вариантам осуществления M_{mod} имеет формулу (A-1a)



где

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому серы цистеина, отмеченного звездочкой, в формуле (I),

b1 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20,

b2 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20, и

b3 представляет собой целое число в интервале от 12 до 22700.

Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1a) представляет собой целое число в интервале 1 - 8. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1a) представляет собой целое число в интервале 1 - 6. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1a) представляет собой целое число в интервале 1 - 4. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1a) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1a) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1a) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1a) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1a) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1a) представляет собой 6.

Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1a) представляет собой целое число в интервале 1 - 8. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1a) представляет собой целое число в интервале 1 - 6. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1a) представляет собой целое число в интервале 1 - 4. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1a) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1a) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1a) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1a) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1a) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1a) представляет собой 6.

Согласно определенным вариантам осуществления b3 формулы (A-1a) представляет собой целое число в интервале от 23 до 227000, как например, от 45 до 11300, или от 69 до 4540, или от 114 до 2700. Согласно определенным вариантам

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому серы цистеина, отмеченного звездочкой, в формуле (I),

c1 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20,

c2 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20, и

c3 представляет собой целое число в интервале от 12 до 22700.

Согласно определенным вариантам осуществления c1 формулы (A-1b) представляет собой целое число в интервале 1 - 8. Согласно определенным вариантам осуществления c1 формулы (A-1b) представляет собой целое число в интервале 1 - 6. Согласно определенным вариантам осуществления c1 формулы (A-1b) представляет собой целое число в интервале 1 - 4. Согласно определенным вариантам осуществления c1 формулы (A-1b) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления c1 формулы (A-1b) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления c1 формулы (A-1b) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления c1 формулы (A-1b) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления c1 формулы (A-1b) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления c1 формулы (A-1b) представляет собой 6.

Согласно определенным вариантам осуществления c2 формулы (A-1b) представляет собой целое число в интервале 1 - 8. Согласно определенным вариантам осуществления c2 формулы (A-1b) представляет собой целое число в интервале 1 - 6. Согласно определенным вариантам осуществления c2 формулы (A-1b) представляет собой целое число в интервале 1 - 4. Согласно определенным вариантам осуществления c2 формулы (A-1b) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления c2 формулы (A-1b) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления c2 формулы (A-1b) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления c2 формулы (A-1b) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления c2 формулы (A-1b) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления c2 формулы (A-1b) представляет собой 6.

Согласно определенным вариантам осуществления c3 формулы (A-1b) представляет собой целое число в интервале от 23 до 227000, как например, от 45 до 11300, или от 69 до 4540, или от 114 до 2700. Согласно определенным вариантам осуществления c3 формулы (A-1b) представляет собой около 12. Согласно определенным

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому серы цистеина, отмеченного звездочкой, в формуле (I),

d_1 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20,

d_2 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20, и

d_3 представляет собой целое число в интервале от 12 до 22700.

Согласно определенным вариантам осуществления d_1 формулы (A-1c) представляет собой целое число в интервале 1 - 8. Согласно определенным вариантам осуществления d_1 формулы (A-1c) представляет собой целое число в интервале 1 - 6. Согласно определенным вариантам осуществления d_1 формулы (A-1c) представляет собой целое число в интервале 1 - 4. Согласно определенным вариантам осуществления d_1 формулы (A-1c) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления d_1 формулы (A-1c) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления d_1 формулы (A-1c) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления d_1 формулы (A-1c) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления d_1 формулы (A-1c) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления d_1 формулы (A-1c) представляет собой 6.

Согласно определенным вариантам осуществления d_2 формулы (A-1c) представляет собой целое число в интервале 1 - 8. Согласно определенным вариантам осуществления d_2 формулы (A-1c) представляет собой целое число в интервале 1 - 6. Согласно определенным вариантам осуществления d_2 формулы (A-1c) представляет собой целое число в интервале 1 - 4. Согласно определенным вариантам осуществления d_2 формулы (A-1c) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления d_2 формулы (A-1c) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления d_2 формулы (A-1c) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления d_2 формулы (A-1c) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления d_2 формулы (A-1c) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления d_2 формулы (A-1c) представляет собой 6.

Согласно определенным вариантам осуществления d_3 формулы (A-1c) представляет собой целое число в интервале от 23 до 227000, как например, от 45 до 11300, или от 69 до 4540, от 114 до 2700 или от 160 до 900. Согласно определенным вариантам осуществления d_3 формулы (A-1c) представляет собой около 12. Согласно

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому серы цистеина, отмеченного звездочкой, в формуле (I),

b1 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20,

b2 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20, и

b3 представляет собой целое число в интервале от 12 до 22700.

Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1d) представляет собой целое число в интервале 1 - 8. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1d) представляет собой целое число в интервале 1 - 6. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1d) представляет собой целое число в интервале 1 - 4. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1d) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1d) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1d) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1d) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1d) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1d) представляет собой 6.

Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1d) представляет собой целое число в интервале 1 - 8. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1d) представляет собой целое число в интервале 1 - 6. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1d) представляет собой целое число в интервале 1 - 4. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1d) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1d) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1d) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1d) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1d) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1d) представляет собой 6.

Согласно определенным вариантам осуществления b3 формулы (A-1d) представляет собой целое число в интервале от 23 до 227000, как например, от 45 до 11300, или от 69 до 4540, или от 114 до 2700. Согласно определенным вариантам осуществления b3 формулы (A-1d) представляет собой около 12. Согласно определенным

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому серы цистеина, отмеченного звездочкой, в формуле (I),

b1 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20,

b2 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20, и

b3 представляет собой целое число в интервале от 12 до 22700.

Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой целое число в интервале 1 - 8. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой целое число в интервале 1 - 6. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой целое число в интервале 1 - 4. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 6.

Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1e) представляет собой целое число в интервале 1 - 8. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1e) представляет собой целое число в интервале 1 - 6. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1e) представляет собой целое число в интервале 1 - 4. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1e) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1e) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1e) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1e) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1e) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления b2 формулы (A-1e) представляет собой 6.

Согласно определенным вариантам осуществления b3 формулы (A-1e) представляет собой целое число в интервале от 23 до 227000, как например, от 45 до 11300, или от 69 до 4540, или от 114 до 2700. Согласно определенным вариантам осуществления b3 формулы (A-1e) представляет собой около 12. Согласно определенным

представляет собой около 170. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 2, b2 формулы (A-1e) представляет собой 3 и b3 формулы (A-1e) представляет собой около 227. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 2, b2 формулы (A-1e) представляет собой 3 и b3 формулы (A-1e) представляет собой около 340. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 2, b2 формулы (A-1e) представляет собой 3 и b3 формулы (A-1e) представляет собой около 450.

Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 2, b2 формулы (A-1e) представляет собой 2 и b3 формулы (A-1e) представляет собой около 12. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 2, b2 формулы (A-1e) представляет собой 2 и b3 формулы (A-1e) представляет собой около 23. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 2, b2 формулы (A-1e) представляет собой 2 и b3 формулы (A-1e) представляет собой около 46. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 2, b2 формулы (A-1e) представляет собой 2 и b3 формулы (A-1e) представляет собой около 68. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 2, b2 формулы (A-1e) представляет собой 2 и b3 формулы (A-1e) представляет собой около 90. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 2, b2 формулы (A-1e) представляет собой 2 и b3 формулы (A-1e) представляет собой около 112. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 2, b2 формулы (A-1e) представляет собой 2 и b3 формулы (A-1e) представляет собой около 170. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 2, b2 формулы (A-1e) представляет собой 2 и b3 формулы (A-1e) представляет собой около 227. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 2, b2 формулы (A-1e) представляет собой 2 и b3 формулы (A-1e) представляет собой около 340. Согласно определенным вариантам осуществления b1 формулы (A-1e) представляет собой 2, b2 формулы (A-1e) представляет собой 2 и b3 формулы (A-1e) представляет собой около 450.

Во множестве конъюгатов II-2, фрагмент M_{mod} присутствует в виде смеси, содержащей фрагменты формулы (A-1d) и (A-1e). Это означает, что определенный процент конъюгатов II-2 конъюгирован с фрагментом M_{mod} формулы (A-1d) и определенный процент конъюгирован с фрагментом M_{mod} формулы (A-1e). Необязательно, определенный процент конъюгатов II-2 конъюгирован с фрагментом M_{mod} формулы (A-1a). Понятно, что в таких конъюгатах II-2 не происходит гидролиза

тиосукцинимидного кольца. Такое множество конъюгатов II-2 может присутствовать, например, в фармацевтической композиции, содержащей такие конъюгаты II-2.

Во множестве конъюгатов II-2 фрагмент M_{mod} согласно определенным вариантам осуществления присутствует в виде смеси, где по меньшей мере 70% фрагментов M_{mod} имеют формулу (A-1d) и (A-1e). Во множестве конъюгатов II-2 фрагмент M_{mod} согласно определенным вариантам осуществления присутствует в виде смеси, где по меньшей мере 80% фрагментов M_{mod} имеют формулу (A-1d) и (A-1e). Во множестве конъюгатов II-2 фрагмент M_{mod} согласно определенным вариантам осуществления присутствует в виде смеси, где по меньшей мере 90% фрагментов M_{mod} имеют формулу (A-1d) и (A-1e).

Во множестве конъюгатов II-2 фрагмент M_{mod} присутствует в виде смеси, содержащей фрагменты формулы (A1-a), (A-1d) и (A-1e). Во множестве конъюгатов II-2 фрагмент M_{mod} присутствует в виде смеси, содержащей фрагменты формулы (A1-a), (A-1d) и (A-1e), где по меньшей мере 70% M_{mod} имеют формулу (A-1d) и (A-1e). Во множестве конъюгатов II-2 фрагмент M_{mod} присутствует в виде смеси, содержащей фрагменты формулы (A1-a), (A-1d) и (A-1e), где по меньшей мере 80% M_{mod} имеют формулу (A-1d) и (A-1e). Во множестве конъюгатов II-2 фрагмент M_{mod} присутствует в виде смеси, содержащей фрагменты формулы (A1-a), (A-1d) и (A-1e), где по меньшей мере 90% M_{mod} имеют формулу (A-1d) и (A-1e).

Конъюгат II-2 формулы (Ia) или (Ib) содержит по меньшей мере один ковалентно и обратимо присоединенный полимерный фрагмент и/или фрагмент замещенный жирной кислоты -Z.

Добавление такого, по меньшей мере, одного ковалентно и обратимо присоединенного полимерного фрагмента и/или фрагмента замещенного жирной кислоты приводит к увеличению периода полувыведения из кровотока фрагмента II-2 формулы (I) сверх продления, обеспечиваемого необязательно присутствующим фрагментом M_{mod} , а его обратимое присоединение обеспечивает достаточную фармацевтическую активность.

Согласно одному варианту осуществления конъюгат II-2 имеет формулу (Ia) и содержит один фрагмент -Z, который представляет собой замещенную жирную кислоту или полимерный фрагмент. Согласно одному варианту осуществления -Z представляет собой замещенную жирную кислоту. Согласно другому варианту осуществления -Z представляет собой полимерный фрагмент.

Согласно другому варианту осуществления конъюгат II-2 имеет формулу (Ib) и содержит два фрагмента -Z, которые могут быть одинаковыми или различными. Согласно одному варианту осуществления оба фрагмента -Z представляют собой замещенную жирную кислоту, которые могут быть одинаковыми или различными. Согласно другому

варианту осуществления оба фрагмента $-Z$ представляют собой полимерный фрагмент, которые могут быть одинаковыми или различными. Согласно другому варианту осуществления один фрагмент $-Z$ представляет собой замещенную жирную кислоту, а другой фрагмент $-Z$ представляет собой полимерный фрагмент.

Согласно другому варианту осуществления конъюгат II-2 of имеет формулу (Ib) и содержит три фрагмента $-Z$, которые могут быть одинаковыми или различными. Согласно одному варианту осуществления все три фрагмента $-Z$ представляют собой замещенную жирную кислоту, которые могут быть одинаковыми или различными. Согласно другому варианту осуществления все три фрагмента $-Z$ представляют собой полимерный фрагмент, которые могут быть одинаковыми или различными. Согласно другому варианту осуществления один или два фрагмента $-Z$ представляют собой замещенную жирную кислоту, а оставшийся фрагмент/фрагменты $-Z$ представляет собой/ представляют собой полимерный фрагмент.

Согласно другому варианту осуществления конъюгат II-2 имеет формулу (Ib) и содержит четыре фрагмента $-Z$, которые могут быть одинаковыми или различными. Согласно одному варианту осуществления все четыре фрагмента $-Z$ представляют собой замещенную жирную кислоту, которые могут быть одинаковыми или различными. Согласно другому варианту осуществления все четыре фрагмента $-Z$ представляют собой полимерный фрагмент, которые могут быть одинаковыми или различными. Согласно другому варианту осуществления один, два или три фрагмента $-Z$ представляют собой замещенную жирную кислоту, а оставшийся фрагмент/фрагменты $-Z$ представляет собой/ представляют собой полимерный фрагмент.

Если $-Z$ формулы (Ia) или (Ib) представляет собой фрагмент замещенной жирной кислоты, он предпочтительно представляет собой фрагмент замещенной жирной кислоты, раскрытый в WO 2005/027978 A2 и WO 2014/060512 A1, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Если $-Z$ формулы (Ia) или (Ib) представляет собой полимерный фрагмент, такой полимерный фрагмент имеет согласно определенным вариантам осуществления молекулярную массу в интервале от 1 кДа до 1000 кДа, как например, от 2 кДа до 500 кДа, от 3 кДа до 200 кДа, от 5 кДа до 120 кДа, от 10 кДа до 100 кДа или от 15 кДа до 80кДа. Согласно одному варианту осуществления $-Z$ представляет собой полимерный фрагмент, имеющий молекулярную массу около 2 кДа. Согласно другому варианту осуществления $-Z$ представляет собой полимерный фрагмент, имеющий молекулярную массу около 5 кДа. Согласно другому варианту осуществления $-Z$ представляет собой полимерный фрагмент, имеющий молекулярную массу около 10 кДа. Согласно другому варианту

Согласно определенным вариантам осуществления -Z формулы (Ia) или (Ib) представляет собой полимерный фрагмент, содержащий полимер, выбранный из группы, состоящей из 2-метакрилоил-оксиэтила фосфоилхолинов, поли(акриловых кислот), поли(акрилатов), поли(акриламидов), поли(алкилокси) полимеров, поли(амидов), поли(амидоаминов), поли(аминокислот), поли(ангидридов), поли(аспартамидов), поли(масляных кислот), поли(гликолевых кислот), полибутилентерефталатов, поли(капролактонов), поли(карбонатов), поли(цианоакрилатов), поли(диметилакриламидов), поли(сложных эфиров), поли(этиленов), поли(этиленгликолей), поли(этиленоксидов), поли(этилфосфатов), поли(этилоксазолинов), поли(гликолевых кислот), поли(гидроксиэтилакрилатов), поли(гидроксиэтил-оксазолинов), поли(гидроксипропил метакрилатов), поли(гидроксипропил-оксазолинов), поли(иминокарбонатов), поли(молочных кислот), поли(сополимеров молочных и гликолевых кислот), поли(метакриламидов), поли(метакрилатов), поли(метилоксазолинов), поли(органофосфазенов), поли(ортосложных эфиров), поли(оксазолинов), поли(пропиленгликолей), поли(силоксанов), поли(уретанов), поли(виниловых спиртов), поли(виниламинов), поли(винилметиловых простых эфиров), поли(винилпирролидонов), силиконов, целлюлоз, карбометилцеллюлоз, гидроксипропил метилцеллюлоз, хитинов, хитозанов, декстранов, декстринов, желатинов, гиалуроновых кислот и производных, функционализированных гиалуроновых кислот, маннанов, пектинов, рамногалактуронанов, крахмалов, гидроксиалкил крахмалов, гидроксиэтил крахмалов и других полимеров на основе углеводов, ксиланов и их сополимеров.

Согласно одному варианту осуществления -Z формулы (Ia) или (Ib) представляет собой пептидный или белковый фрагмент. Предпочтительно, такой пептидный или белковый фрагмент не представляет собой II-2-фрагмент или его составляющую. Такой пептидный или белковый фрагмент -Z может быть химически конъюгирован с -D через $-L^1-L^2$ -или может быть трансляционно конъюгирован с -D через обратимый линкерный фрагмент $-L^1$ -, в этом случае $-L^1$ -представляет собой пептидный или белковый фрагмент, и $-L^2$ -предпочтительно представляет собой химическую связь. Согласно определенным вариантам осуществления такой пептидный или белковый фрагмент -Z химически конъюгирован с -D через $-L^1-L^2$ -. Согласно другому варианту осуществления такой пептидный или белковый фрагмент -Z трансляционно слита с -D через обратимый линкерный фрагмент $-L^1$ -, в этом случае $-L^1$ -представляет собой пептидный или белковый фрагмент, и $-L^2$ -предпочтительно представляет собой химическую связь. Понятно, что такой пептидный или белковый обратимый линкерный фрагмент $-L^1$ -может быть

ферментативно или ферментативно расщепляемым. Для усиления ферментативного расщепления $-L^1$ -может содержать сайт распознавания протеазы.

Если $-Z$ формулы (Ia) или (Ib) представляет собой пептидный или белковый фрагмент, он предпочтительно выбран из группы, состоящей из фрагментов, содержащих карбоксил-терминальный пептид хорионического гонадотропина, как описано в US 2012/0035101 A1, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки; альбуминовых фрагментов; фрагментов белка случайной спирали и фрагментов Fc-слитого белка.

Согласно определенным вариантам осуществления $-Z$ формулы (Ia) или (Ib) содержит пептидный или белковый фрагмент случайной спирали.

Согласно определенным вариантам осуществления такой пептидный или белковый фрагмент случайной спирали содержит по меньшей мере 25 аминокислотных остатка и самое большее 2000 аминокислотных остатков, как например, 30 аминокислотных остатков - 1500 аминокислотных остатков или 50 - 500 аминокислотных остатков.

Согласно определенным вариантам осуществления $-Z$ формулы (Ia) или (Ib) содержит белковый фрагмент случайной спирали, в котором по меньшей мере 80%, как например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, от общего числа аминокислот, образующих указанный белковый фрагмент случайной спирали выбраны из аланина и пролина. Согласно определенным вариантам осуществления по меньшей мере 10%, но менее 75%, как например, менее 65% от общего числа аминокислотных остатков такого случайного белкового фрагмента являются остатками пролина. Согласно определенным вариантам осуществления такой белковый фрагмент случайной спирали является таким, как описано в WO 2011/144756 A1, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Согласно определенным вариантам осуществления $-Z$ содержит по меньшей мере один фрагмент, выбранный из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 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:51 и SEQ ID NO:61, как раскрыто в WO2011/144756. Фрагмент, содержащий такой белковый фрагмент случайной спирали, содержащий аланин, серин и пролин, обозначается как "РА" или "РА фрагмент".

Соответственно, согласно одному варианту осуществления $-Z$ формулы (Ia) или (Ib) содержит фрагмент РА.

Согласно определенным вариантам осуществления -Z формулы (Ia) или (Ib) содержит белковый фрагмент случайной спирали, в котором по меньшей мере 80%, как например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% от общего числа аминокислот, образующих указанный белковый фрагмент случайной спирали, выбраны из аланина, серина и пролина. Согласно определенным вариантам осуществления по меньшей мере 4%, но менее 40% от общего числа аминокислотных остатков такого случайного белкового фрагмента являются остатками пролина. Согласно определенным вариантам осуществления такой белковый фрагмент случайной спирали является таким, как описано в WO 2008/155134 A1, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Согласно определенным вариантам осуществления -Z содержит по меньшей мере один фрагмент, выбранный из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54 и SEQ ID NO:56, как раскрыто в WO 2008/155134 A1. Фрагмент, содержащий такой белковый фрагмент случайной спирали, содержащий аланин, серин и пролин, обозначается как "PAS" или "PAS фрагмент".

Соответственно, согласно одному варианту осуществления -Z формулы (Ia) или (Ib) содержит фрагмент PAS.

Согласно определенным вариантам осуществления -Z формулы (Ia) или (Ib) содержит белковый фрагмент случайной спирали, в котором по меньшей мере 80%, как например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% от общего числа аминокислот, образующих указанный белковый фрагмент случайной спирали выбраны из аланина, глицина, серина, треонина, глутамата и пролина. Согласно определенным вариантам осуществления такой белковый фрагмент случайной спирали является таким, как описано в WO 2010/091122 A1, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки. Согласно определенным вариантам осуществления -Z содержит по меньшей мере один фрагмент, выбранный из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO:182, SEQ ID NO:183, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:185, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:187, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:189, SEQ ID NO:190, SEQ ID NO:191, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:198, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:200, SEQ ID NO:201, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:203, SEQ ID

NO:204, SEQ ID NO:205, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208, SEQ ID NO:209, SEQ ID NO:210, SEQ ID NO:211, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:213, SEQ ID NO:214, SEQ ID NO:215, SEQ ID NO:216, SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, SEQ ID NO:220, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:759, SEQ ID NO:760, SEQ ID NO:761, SEQ ID NO:762, SEQ ID NO:763, SEQ ID NO:764, SEQ ID NO:765, SEQ ID NO:766, SEQ ID NO:767, SEQ ID NO:768, SEQ ID NO:769, SEQ ID NO:770, SEQ ID NO:771, SEQ ID NO:772, SEQ ID NO:773, SEQ ID NO:774, SEQ ID NO:775, SEQ ID NO:776, SEQ ID NO:777, SEQ ID NO:778, SEQ ID NO:779, SEQ ID NO:1715, SEQ ID NO:1716, SEQ ID NO:1718, SEQ ID NO:1719, SEQ ID NO:1720, SEQ ID NO:1721 и SEQ ID NO:1722, как раскрыто в WO2010/091122A1. Фрагмент, содержащий такой белковый фрагмент случайной спирали, содержащий аланин, глицин, серин, треонин, глутамат и пролин, будет упоминаться как «XTEN» или «XTEN фрагмент».

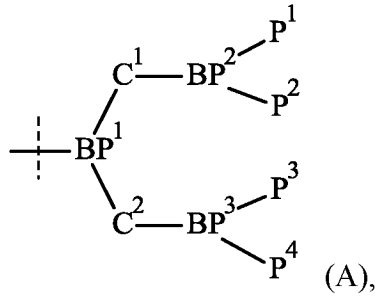
Соответственно, согласно определенным вариантам осуществления -Z формулы (Ia) или (Ib) содержит фрагмент XTEN.

Согласно определенным вариантам осуществления -Z формулы (Ia) или (Ib) представляет собой полимер на основе гиалуроновой кислоты.

Согласно определенным вариантам осуществления -Z формулы (Ia) или (Ib) представляет собой фрагмент на основе ПЭГ, такую как линейный, разветвленный или многоцепочечный фрагмент на основе ПЭГ. Согласно определенным вариантам осуществления -Z представляет собой разветвленный фрагмент на основе ПЭГ, как например, разветвленный фрагмент на основе ПЭГ, имеющий одну, две, три, четыре, пять или шесть точек разветвления. Согласно определенным вариантам осуществления -Z представляет собой разветвленный фрагмент на основе ПЭГ, имеющий одну, две или три точки разветвления. Согласно определенным вариантам осуществления -Z представляет собой разветвленный фрагмент на основе ПЭГ, имеющий одну точку разветвления. Согласно определенным вариантам осуществления -Z представляет собой разветвленный фрагмент на основе ПЭГ, имеющий две точки разветвления. Согласно определенным вариантам осуществления -Z представляет собой разветвленный фрагмент на основе ПЭГ, имеющий три точки разветвления.

Каждая точка разветвления предпочтительно независимо выбрана из группы, состоящей из $-N<$, $-CH<$ и $>C<$.

Согласно определенным вариантам осуществления -Z формулы (Ia) или (Ib) содержит фрагмент формулы (A)



где

$-BP^1<$, $-BP^2<$, $-BP^3<$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из $-N<$ и $-C(R^8)<$,

$-R^8$ выбрано из группы, состоящей из $-H$, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила и C_{2-6} алкинила,

$-P^1$, $-P^2$, $-P^3$, $-P^4$ независимо друг от друга представляют собой цепь на основе ПЭГ, содержащую по меньшей мере 40% ПЭГ и имеющую молекулярную массу в интервале от 3 до 40 кДа,

$-C^1-$, $-C^2-$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из C_{1-50} алкила, C_{2-50} алкенила и C_{2-50} алкинила, где C_{1-50} алкил, C_{2-50} алкенил и C_{2-50} алкинил необязательно замещены одним или несколькими $-R^9$, которые являются одинаковыми или различными, и где C_{1-50} алкил, C_{2-50} алкенил и C_{2-50} алкинил необязательно прерываются одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из $-T-$, $-C(O)O-$, $-O-$, $-C(O)-$, $-C(O)N(R^{10})-$, $-S(O)_2N(R^{10})-$, $-S(O)N(R^{10})-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)-$, $-N(R^{10})S(O)_2N(R^{10a})-$, $-S-$, $-N(R^{10})-$, $-OC(OR^{10})(R^{10a})-$, $-N(R^{10})C(O)N(R^{10a})-$ и $-OC(O)N(R^{10})-$,

каждый T независимо выбран из группы, состоящей из фенила, нафтила, инденила, инданила, тетралина, C_{3-10} циклоалкил, 3-10-ти членного гетероциклила, 8-11-ти членного гетеробициклила, 8-30-ти членного карбополициклила и 8-30-ти членного гетерополициклила, где каждый T независимо необязательно замещен одним или несколькими $-R^9$, которые являются одинаковыми или различными,

каждый $-R^9$ независимо выбран из группы, состоящей из галогена, $-CN$, оксо ($=O$), $-COOR^{11}$, $-OR^{11}$, $-C(O)R^{11}$, $-C(O)N(R^{11}R^{11a})$, $-S(O)_2N(R^{11}R^{11a})$, $-S(O)N(R^{11}R^{11a})$, $-S(O)_2R^{11}$, $-S(O)R^{11}$, $-N(R^{11})S(O)_2N(R^{11a}R^{11b})$, $-SR^{11}$, $-N(R^{11}R^{11a})$, $-NO_2$, $-OC(O)R^{11}$, $-N(R^{11})C(O)R^{11a}$, $-N(R^{11})S(O)_2R^{11a}$, $-N(R^{11})S(O)R^{11a}$, $-N(R^{11})C(O)OR^{11a}$, $-N(R^{11})C(O)N(R^{11a}R^{11b})$, $-OC(O)N(R^{11}R^{11a})$ и C_{1-6} алкил, где C_{1-6} алкил независимо замещен одним или несколькими галогенами, которые являются одинаковыми или различными, и

каждый $-R^{10}$, $-R^{10a}$, $-R^{11}$, $-R^{11a}$ и $-R^{11b}$ независимо выбран из группы, состоящей из $-H$ и C_{1-6} алкил, где C_{1-6} алкил независимо необязательно замещен одним или несколькими галогенами, которые являются одинаковыми или различными.

Согласно определенным вариантам осуществления $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$, $-P^4$ независимо друг от друга представляют собой цепь на основе ПЭГ, содержащую по меньшей мере 50% ПЭГ и имеющую молекулярную массу в интервале от 3 до 40 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$, $-P^4$ независимо друг от друга представляют собой цепь на основе ПЭГ, содержащую по меньшей мере 60% ПЭГ и имеющую молекулярную массу в интервале от 3 до 40 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$, $-P^4$ независимо друг от друга представляют собой цепь на основе ПЭГ, содержащую по меньшей мере 70% ПЭГ и имеющую молекулярную массу в интервале от 3 до 40 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$, $-P^4$ независимо друг от друга представляют собой цепь на основе ПЭГ, содержащую по меньшей мере 80% ПЭГ и имеющую молекулярную массу в интервале от 3 до 40 кДа.

Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$ формулы (A) независимо друг от друга находится в интервале от 5 до 30 кДа, как например от 5 до 25 кДа или от 8 до 20 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$ может составлять около 5 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$ может составлять около 7 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ and $-P^4$ может составлять около 10 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$ может составлять около 12 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$ может составлять около 15 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$ может составлять около 20 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$ может составлять около 25 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$ может составлять около 30 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$ может составлять 7 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$ может составлять 10 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$ может составлять 12 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$

может составлять 15 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$ может составлять 20 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$ может составлять 25 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления молекулярная масса фрагмента $-P^1$, $-P^2$, $-P^3$ и $-P^4$ может составлять 30 кДа.

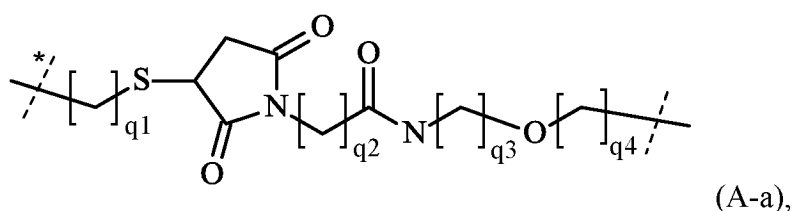
Согласно определенным вариантам осуществления P^1 , P^2 , P^3 и P^4 формулы (A) имеют одну и ту же структуру.

Согласно определенным вариантам осуществления BP^1 формулы (A) представляет собой $-N<$.

Согласно определенным вариантам осуществления BP^2 и BP^2 формулы (A) имеют одну и ту же структуру. Согласно определенным вариантам осуществления BP^2 и BP^2 формулы (A) оба представляют собой $-CH<$.

Согласно определенным вариантам осуществления C^1 и C^2 формулы (A) имеют одну и ту же структуру. Согласно определенным вариантам осуществления C^1 и C^2 формулы (A) представляют собой C_{1-50} алкил, прерывающийся одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из $-O-$, $-C(O)N(R^{10})$ -и 3-10-ти членного гетероцикла; где 3-10-ти членный гетероцикл имеет в качестве заместителя по меньшей мере один оксо ($=O$).

Согласно определенным вариантам осуществления $-C^1$ - и $-C^2$ - формулы (A) имеют формулу (A-a)



где

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к BP^1 ,

неотмеченная пунктирная линия показывает присоединение к BP^2 или BP^3 , соответственно,

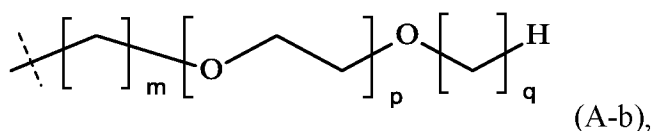
q_1 выбрано из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8,

q_2 выбрано из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, и 5,

q_3 выбрано из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8, и

q_4 выбрано из группы, состоящей из 1, 2 и 3.

Согласно определенным вариантам осуществления q_1 формулы (A-a) выбрано из группы, состоящей из 4, 5, 6, 7, и 8. Согласно определенным вариантам осуществления q_1



где

пунктирная линия показывает присоединение к остальной части -Z,

m представляет собой 0 или 1,

p представляет собой целое число в интервале от 70 до 900, и

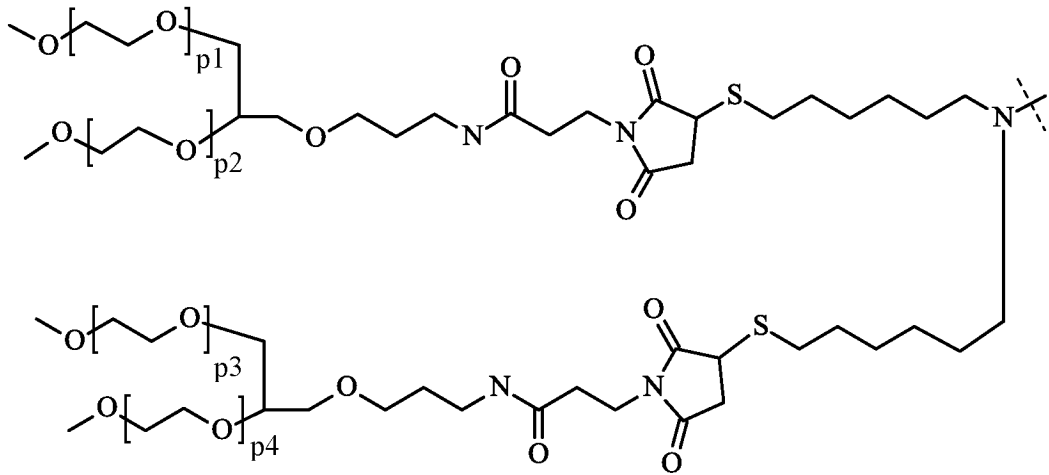
q выбрано из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

Согласно определенным вариантам осуществления m формулы (A-b) представляет собой 0. Согласно определенным вариантам осуществления m формулы (A-b) представляет собой 1.

Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-b) представляет собой целое число в интервале от 115 до 680. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-b) представляет собой целое число в интервале от 115 до 560. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-b) представляет собой целое число в интервале от 185 до 450. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-b) представляет собой около 115. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-b) представляет собой около 160. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-b) представляет собой около 225. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-b) представляет собой около 270. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-b) представляет собой около 340. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-b) представляет собой около 450. Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (A-b) представляет собой около 560.

Согласно определенным вариантам осуществления q формулы (A-b) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления q формулы (A-b) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления q формулы (A-b) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления q формулы (A-b) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления q формулы (A-b) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления q формулы (A-b) представляет собой 6.

Согласно определенным вариантам осуществления -Z формулы (Ia) или (Ib) содержит фрагмент формулы (A-c):



(A-

с),

где

p_1 , p_2 , p_3 , p_4 независимо друг от друга представляют собой целое число в интервале от 70 до 900.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 формулы (А-с) представляет собой целое число в интервале от 115 до 680. Согласно определенным вариантам осуществления p_1 формулы (А-с) представляет собой целое число в интервале от 115 до 560. Согласно определенным вариантам осуществления p_1 формулы (А-с) представляет собой целое число в интервале от 185 до 450. Согласно определенным вариантам осуществления p_1 формулы (А-с) представляет собой целое число в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления p_1 формулы (А-с) представляет собой около 115. Согласно определенным вариантам осуществления p_1 формулы (А-с) представляет собой около 160. Согласно определенным вариантам осуществления p_1 формулы (А-с) представляет собой около 225. Согласно определенным вариантам осуществления p_1 формулы (А-с) представляет собой около 270. Согласно определенным вариантам осуществления p_1 формулы (А-с) представляет собой около 340. Согласно определенным вариантам осуществления p_1 формулы (А-с) представляет собой около 450. Согласно определенным вариантам осуществления p_1 формулы (А-с) представляет собой около 560.

Согласно определенным вариантам осуществления p_2 формулы (А-с) представляет собой целое число в интервале от 115 до 680. Согласно определенным вариантам осуществления p_2 формулы (А-с) представляет собой целое число в интервале от 115 до 560. Согласно определенным вариантам осуществления p_2 формулы (А-с) представляет собой целое число в интервале от 185 до 450. Согласно определенным вариантам осуществления p_2 формулы (А-с) представляет собой целое число в интервале от 220 до

вариантам осуществления р4 формулы (А-с) представляет собой около 340. Согласно определенным вариантам осуществления р4 формулы (А-с) представляет собой около 450. Согласно определенным вариантам осуществления р4 формулы (А-с) представляет собой около 560.

Согласно определенным вариантам осуществления р1, р2, р3 формулы (А-с) и р4 являются идентичными. Согласно определенным вариантам осуществления р1, р2, р3 и р4 в интервале от 220 до 240.

Согласно одному варианту осуществления -Z формулы (Ia) или (Ib) представляет собой фрагмент, как раскрыто в WO 2012/02047 A1, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно другому варианту осуществления -Z формулы (Ia) или (Ib) представляет собой фрагмент, как раскрыто в WO 2013/024048 A1, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат, содержащий один или несколько белков П-2 формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, содержит множество фрагментов -D, которые представляют собой указанные белки П-2 формулы (I), конъюгированные через по меньшей мере один фрагмент $-L^1-L^2-$ с по меньшей мере одним фрагментом Z' , где фрагмент $-L^1-$ конъюгирован с -D через обратимую связь, и где фрагмент $-L^2-$ конъюгирован с Z' , где $-L^1-$ и $-L^2-$ имеют значения, как определено для формулы (Ia) и (Ib), и где Z' представляет собой нерастворимый в воде гидрогель.

Согласно определенным вариантам осуществления такой гидрогель Z' содержит полимер, выбранный из группы, состоящей из 2-метакрилоил-оксиэтила фосфоилхолинов, поли(акриловых кислот), поли(акрилатов), поли(акриламидов), поли(алкилокси) полимеров, поли(амидов), поли(амидоаминов), поли(аминокислот), поли(ангидридов), поли(аспартамидов), поли(масляных кислот), поли(гликолевых кислот), полибутилентерефталатов, поли(капролактонов), поли(карбонатов), поли(цианоакрилатов), поли(диметилакриламидов), поли(сложных эфиров), поли(этиленов), поли(этиленгликолей), поли(этиленоксидов), поли(этилфосфатов), поли(этилоксазолинов), поли(гликолевых кислот), поли(гидроксиэтилакрилатов), поли(гидроксиэтил-оксазолинов), поли(гидроксипропил метакрилатов), поли(гидроксипропил-оксазолинов), поли(иминокарбонатов), поли(молочных кислот), поли(сополимеров молочных и гликолевых кислот), поли(метакриламидов), поли(метакрилатов), поли(метилоксазолинов), поли(органофосфазенов), поли(ортосложных эфиров), поли(оксазолинов), поли(пропиленгликолей),

поли(силоксанов), поли(уретанов), поли(виниловых спиртов), поли(виниламинов), поли(винилметиловых простых эфиров), поли(винилпирролидонов), силиконов, целлюлоз, карбометилцеллюлоз, гидроксипропил метилцеллюлоз, хитинов, хитозанов, декстранов, декстринов, желатинов, гиалуроновых кислот и производных, функционализированных гиалуроновых кислот, маннанов, пектинов, рамногалактуронанов, крахмалов, гидроксилкил крахмалов, гидроксиэтил крахмалов и других полимеров на основе углеводов, ксиланов и их сополимеров.

Согласно определенным вариантам осуществления Z' представляет собой гидрогель на основе поли(алкиленгликоля) или на основе гиалуроновой кислоты.

Согласно определенным вариантам осуществления Z' представляет собой гидрогель на основе поли(алкиленгликоля).

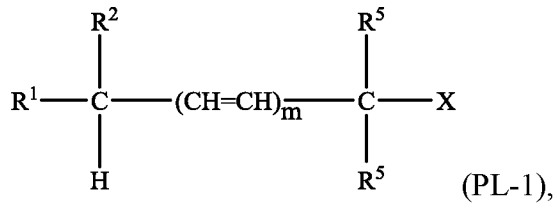
Согласно определенным вариантам осуществления Z' представляет собой гидрогель на основе ПЭГ.

Согласно определенным вариантам осуществления $-Z$ представляет собой гидрогель на основе ПЭГ, как описано в WO2011/012715A1 или WO2014/056926A1, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно определенным вариантам осуществления $-Z$ представляет собой гидрогель на основе гиалуроновой кислоты.

Согласно определенным вариантам осуществления $-Z$ представляет собой гидрогель на основе гиалуроновой кислоты, как описано в WO2018/175788A1, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно определенным вариантам осуществления Z' представляет собой гидрогель, как раскрыто в WO2013/036847 A1. В частности, согласно определенным вариантам осуществления Z' представляет собой гидрогель, полученный способом, включающим стадию взаимодействия по меньшей мере первого реакционноспособного полимера с расщепляемым сшивающим соединением, где указанное расщепляемое сшивающее соединение содержит первую функциональную группу $-Y^1$, которая взаимодействует с первым реакционноспособным полимером, и дополнительно содержит фрагмент, который отщепляется путем удаления в физиологических условиях, где указанный фрагмент содержит вторую функциональную группу $-Y^2$, которая реагирует со вторым реакционноспособным полимером. Согласно определенным вариантам осуществления расщепляемое сшивающее соединение имеет формулу (PL-1)



где

m представляет собой 0 или 1,

$-\text{X}$ содержит функциональную группу, способную соединиться с реакционноспособным полимером, который поддается отщеплению в физиологических условиях, и указанную вторую функциональную группу $-\text{Y}^2$,

по меньшей мере один из $-\text{R}^1$, $-\text{R}^2$ и $-\text{R}^5$ содержит указанную первую функциональную группу $-\text{Y}^1$, способную соединиться с полимером,

один и только один из $-\text{R}^1$ и $-\text{R}^2$ выбрано из группы, состоящей из $-\text{H}$, алкила, арилалкила и гетероарилалкила,

необязательно, $-\text{R}^1$ и $-\text{R}^2$ могут быть соединены с образованием 3-8-членного кольца,

по меньшей мере один или оба из $-\text{R}^1$ и $-\text{R}^2$ независимо выбраны из группы, состоящей из $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, арила, гетероарила, алкенила, алкинила, $-\text{COR}^3$, $-\text{SOR}^3$, $-\text{SO}_2\text{R}^3$ и $-\text{SR}^4$,

$-\text{R}^3$ выбран из группы, состоящей из $-\text{H}$, алкила, арила, арилалкила, гетероарила, гетероарилалкила, $-\text{OR}^9$ и $-\text{NR}^9_2$,

$-\text{R}^4$ выбран из группы, состоящей из алкила, арила, арилалкила, гетероарила и гетероарилалкила,

каждый $-\text{R}^5$ независимо выбран из группы, состоящей из $-\text{H}$, алкила, алкенилалкила, алкинилалкила, $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p\text{O}$ -алкила, где p представляет собой целое число в интервале от 1 - 1000, арила, арилалкила, гетероарила и гетероарилалкила,

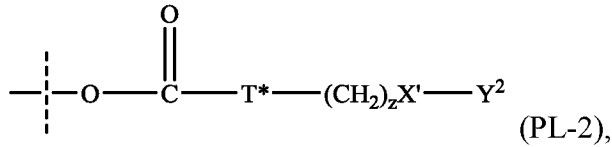
каждый $-\text{R}^9$ независимо выбран из группы, состоящей из $-\text{H}$ и алкила, или оба $-\text{R}^9$ вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо,

и где фрагмент формулы (PL-1) является необязательно дополнительно замещенным.

В следующих параграфах такой гидрогель описан более подробно.

Согласно определенным вариантам осуществления $-\text{X}$ формулы (PL-1) выбрано из группы, состоящей из сукцинимидилкарбоната, сульфосукцинимидилкарбонатгалогенидов, простых тиоэфиров, сложных эфиров,

нитрофенилкарбоната, хлорформиата, фторформиата, необязательно замещенных фенолов и формулы (PL-2)



где

пунктирная линия показывает присоединение к остальной части формулы (PL-1),

-T* - выбрано из группы, состоящей из -O-, -S- и -NR⁶-,

z представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5 и 6,

-X' - отсутствует или выбран из группы, состоящей из -OR⁷- и -SR⁷-,

-Y² представляет собой функциональную группу, способную соединяться с реакционноспособным полимером,

-R⁶ выбрано из группы, состоящей из -H, алкила, арила, гетероарила, арилалкила и гетероарилалкила, и

-R⁷ выбрано из группы, состоящей из алкилена, фенилена и (OCH₂CH₂)_p, где p представляет собой целое число в интервале от 1 - 1000.

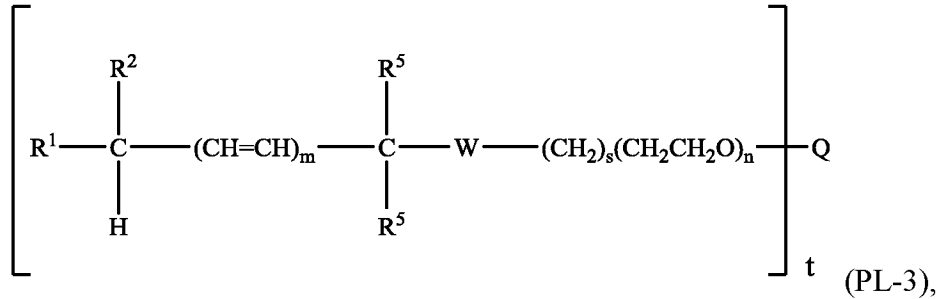
Согласно определенным вариантам осуществления -X формулы (PL-1) содержит активированный карбонат, такой как сукцинимидилкарбонат, сульфосукцинимидилкарбонат или нитрофенилкарбонат. Согласно определенным вариантам осуществления -X формулы (PL-1) содержит карбонилгалогенид, как например, O(C=O)Cl или O(C=O)F. Согласно определенным вариантам осуществления -X формулы (PL-1) имеет формулу (PL-2). Согласно определенным вариантам осуществления -X формулы (PL-1) представляет собой -OR⁷ или -SR⁷, где -R⁷ представляет собой необязательно замещенный алкилен, необязательно замещенный фенилен или (OCH₂CH₂)_p, где p представляет собой 1 - 1000.

Согласно определенным вариантам осуществления p формулы (PL-2) представляет собой целое число в интервале 1 - 100. Согласно определенным вариантам осуществления r формулы (PL-2) представляет собой целое число в интервале 1 - 10.

Согласно определенным вариантам осуществления -Y¹ формулы (PL-1) и -Y² формулы (PL-2) независимо содержат -N₃, -NH₂, -NH-CO₂^tBu, -SH, -S^tBu, малеимид, -CO₂H, -CO₂^tBu, 1,3-диен, циклопентадиен, фуран, алкин, циклооктин, акрилат или акриламид, где ^tBu представляет собой трет-бутил, и где когда один из -Y¹ или -Y² содержит -N₃, другой не содержит алкин или циклооктин, когда один из -Y¹ или -Y² содержит -SH, другой не содержит малеимид, акрилат или акриламид, когда один из -Y¹

или $-Y^2$ содержит $-NH_2$, другой не содержит $-CO_2H$, когда один из $-Y^1$ или $-Y^2$ содержит 1,3-диен или цикlopентадиен, другой не содержит фуран.

Согласно определенным вариантам осуществления расщепляемое сшивающее соединение имеет формулу (PL-3)



где

m представляет собой 0 или 1,

n представляет собой целое число, выбранное из 1 - 1000,

s представляет собой 0, 1 или 2,

t выбрано из группы, состоящей из 2, 4, 8, 16 и 32,

$-W-$ выбрано из группы, состоящей из $-O(C=O)O-$, $-O(C=O)NH-$, $-O(C=O)S-$, $-O(C=O)NR^6CH_2O-$ и $-O(C=O)NR^6S-$,

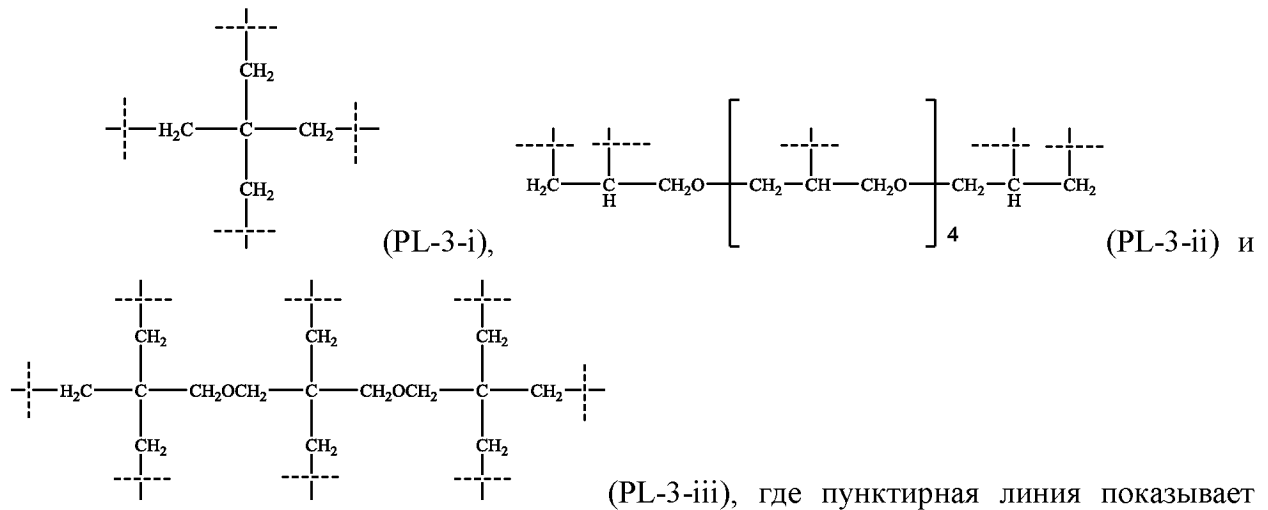
$-Q$ представляет собой группу ядра, имеющую валентность $= t$, которая соединяет множество ответвлений расщепляемого сшивающего соединения,

где t представляет собой целое число, выбранное из 2, 4, 8, 16 и 32, и

где $-R^1$, $-R^2$ и $-R^5$ имеют значения, как определено для формулы (PL-1).

Согласно определенным вариантам осуществления t формулы (PL-3) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления t формулы (PL-3) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления t формулы (PL-3) представляет собой 8. Согласно определенным вариантам осуществления t формулы (PL-3) представляет собой 16. Согласно определенным вариантам осуществления t формулы (PL-3) представляет собой 32.

Согласно определенным вариантам осуществления $-Q$ формулы (PL-3) имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из



присоединение к остальной части расщепляемого сшивающего соединения.

Согласно определенным вариантам осуществления -Q формулы (PL-3) имеет структуру (PL-3-i). Согласно определенным вариантам осуществления -Q формулы (PL-3) имеет структуру (PL-3-ii). Согласно определенным вариантам осуществления -Q формулы (PL-3) имеет структуру (PL-3-iii).

Согласно определенным вариантам осуществления расщепляемое сшивающее соединение имеет формулу (PL-3), где m представляет собой 0, n представляет собой около 100, s представляет собой 0, t представляет собой 4, -W- представляет собой -O(C=O)NH-, -Q имеет структуру (PL-3i), -R² представляет собой -H, один -R⁵ представляет собой -H, а другой -R⁵ представляет собой -(CH₂)₅N₃, и -R¹ представляет собой (4-хлорфенил)SO₂, фенил, замещенный -SO₂, морфолино-SO₂, или -CN.

Согласно определенным вариантам осуществления -Y¹ формулы (PL-3) содержит -N₃, -NH₂, -NH-CO₂^tBu, -SH, -S^tBu, малеимид, -CO₂H, -CO₂^tBu, 1,3-диен, цикlopentadiен, фуран, алкин, циклооктин, акрилат или акриламид, где ^tBu представляет собой трет-бутил.

Согласно определенным вариантам осуществления каждый -Y¹ формулы (PL-1) или (PL-3), и -Y² формулы (PL-2) независимо содержит -N₃, -NH₂, -NH-CO₂^tBu, -SH, -S^tBu, малеимид, -CO₂H, -CO₂^tBu, 1,3-диен, цикlopentadiен, фуран, алкин, циклооктин, акрилат или акриламид.

Согласно определенным вариантам осуществления один из -Y¹ и -Y² представляет собой азид, а другой представляет собой реакционноспособную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из ацетилена, циклооктина и малеимида. Согласно определенным вариантам осуществления один из -Y¹ и -Y² представляет собой тиол, а другой представляет собой реакционноспособную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из малеимида, акрилата, акриламида, винилсульфона,

винилсульфонамида и галогенкарбонила. Согласно определенным вариантам осуществления один из $-Y^1$ и $-Y^2$ представляет собой амин, а другой представляет собой селективную реакционноспособную функциональную группу, выбранную из карбоновой кислоты и активированной карбоновой кислоты. Согласно определенным вариантам осуществления один из $-Y^1$ и $-Y^2$ представляет собой малеимид, а другой представляет собой селективную реакционноспособную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из 1,3-диена, цикlopентадиена и фурана.

Согласно определенным вариантам осуществления первый и любой второй полимер выбран из группы, состоящей из гомополимерных или сополимерных полиэтиленгликолей, полипропиленгликолей, поли(N-винилпирролидона), полиметакрилатов, полифосфазенов, полилактидов, полиакриламидов, полигликолятов, полиэтилениминов, агароз, декстранов, желатинов, коллагенов, полилизиннов, хитозанов, альгинатов, гиалуронанов, пектинов и каррагинанов, которые либо содержат подходящие реакционноспособные функциональные группы, либо имеют формулу $[Y^3-(CH_2)_s(CH_2CH_2O)_n]_tQ$, где $-Y^3$ представляет собой реакционноспособную функциональную группу, s представляет собой 0, 1 или 2, n представляет собой целое число, выбранное из группы в интервале от 10 до 1000, $-Q$ представляет собой группу ядра, имеющую валентность t , и t представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 2, 4, 8, 16 и 32.

Согласно определенным вариантам осуществления первый полимер содержит полимер с множеством ответвлений. Согласно определенным вариантам осуществления первый полимер содержит по меньшей мере три ответвления. Согласно определенным вариантам осуществления первый полимер содержит по меньшей мере четыре ответвления. Согласно определенным вариантам осуществления первый полимер содержит по меньшей мере пять ответвлений. Согласно определенным вариантам осуществления первый полимер содержит по меньшей мере шесть ответвлений. Согласно определенным вариантам осуществления первый полимер содержит по меньшей мере семь ответвлений. Согласно определенным вариантам осуществления первый полимер содержит по меньшей мере восемь ответвлений.

Согласно определенным вариантам осуществления второй полимер содержит полимер с множеством ответвлений. Согласно определенным вариантам осуществления второй полимер содержит по меньшей мере три ответвления. Согласно определенным вариантам осуществления второй полимер содержит по меньшей мере четыре ответвления. Согласно определенным вариантам осуществления второй полимер содержит по меньшей мере пять ответвлений. Согласно определенным вариантам

осуществления второй полимер содержит по меньшей мере шесть ответвлений. Согласно определенным вариантам осуществления второй полимер содержит по меньшей мере семь ответвлений. Согласно определенным вариантам осуществления второй полимер содержит по меньшей мере восемь ответвлений.

Согласно определенным вариантам осуществления первый полимер содержит полиэтиленгликолевый полимер с 2 ответвлениями. Согласно определенным вариантам осуществления первый полимер содержит полиэтиленгликолевый полимер с 4 ответвлениями. Согласно определенным вариантам осуществления первый полимер содержит полиэтиленгликолевый полимер с 8 ответвлениями. Согласно определенным вариантам осуществления первый полимер содержит полиэтиленгликолевый полимер с 16 ответвлениями. Согласно определенным вариантам осуществления первый полимер содержит полиэтиленгликолевый полимер с 32 ответвлениями.

Согласно определенным вариантам осуществления второй полимер содержит полиэтиленгликолевый полимер с 2 ответвлениями. Согласно определенным вариантам осуществления второй полимер содержит полиэтиленгликолевый полимер с 4 ответвлениями. Согласно определенным вариантам осуществления второй полимер содержит полиэтиленгликолевый полимер с 8 ответвлениями. Согласно определенным вариантам осуществления второй полимер содержит полиэтиленгликолевый полимер с 16 ответвлениями. Согласно определенным вариантам осуществления второй полимер содержит полиэтиленгликолевый полимер с 32 ответвлениями.

Согласно определенным вариантам осуществления первый и второй реакционноспособные полимеры реагируют с указанным расщепляемым сшивающим соединением либо последовательно, либо одновременно.

Согласно определенным вариантам осуществления первая и вторая функциональные группы являются одинаковыми.

Только в контексте формул (PL-1), (PL-2) и (PL-3) используемые термины имеют следующее значение:

Термин «фрагмент, способный отщепляться путем удаления в физиологических условиях относится к структуре, содержащей группу $\text{HC}-(\text{CH}=\text{CH})_m-\text{C}-\text{X}'$, где m представляет собой 0 или 1, а X' представляет собой уходящую группу, где описанная выше реакция отщепления для удаления элементов HX' может происходить с такой скоростью, что период полужизни реакции составляет от 1 до 10000 часов при физиологических условиях pH и температуры. Предпочтительно период полужизни реакции составляет от 1 до 5000 часов и более предпочтительно от 1 до 1000 часов при

физиологических условиях рН и температуры. Под физиологическими условиями рН и температуры понимают рН от 7 до 8 и температуру от 30 до 40 градусов по Цельсию.

Термин «реакционноспособный полимер и реакционноспособный олигомер» относится к полимеру или олигомеру, содержащему функциональные группы, которые являются реакционноспособными по отношению к другим функциональным группам, наиболее предпочтительно в мягких условиях, совместимых с требованиями стабильности пептидов, белков и других биомолекул. Подходящие функциональные группы, обнаруженные в реакционноспособных полимерах, включают малеимиды, тиолы или защищенные тиолы, спирты, акрилаты, акриламиды, амины или защищенные амины, карбоновые кислоты или защищенные карбоновые кислоты, азиды, алкины, включая циклоалкины, 1,3-диены, включая циклопентадиены и фураны, альфа-галогенкарбонилы и N-гидроксисукцинимидил, N-гидроксисульфосукцинимидил или нитрофениловые сложные эфиры или карбонаты.

Термин «функциональная группа, способная соединиться с реакционноспособным полимером» относится к функциональной группе, которая реагирует с соответствующей функциональной группой реакционноспособного полимера с образованием ковалентной связи с полимером. Подходящие функциональные группы, способные соединиться с реакционноспособным полимером, включают малеимиды, тиолы или защищенные тиолы, акрилаты, акриламиды, амины или защищенные амины, карбоновые кислоты или защищенные карбоновые кислоты, азиды, алкины, включая циклоалкины, 1,3-диены, включая циклопентадиены и фураны, альфа-галогенкарбонилы и N-гидроксисукцинимидил, N-гидроксисульфосукцинимидил или нитрофениловые сложные эфиры или карбонаты.

Термин «замещенный» означает алкильную, алкенильную, алкинильную, арильную или гетероарильную группу, включающую одну или более групп заместителей вместо одного или более атомов водорода. Заместители могут в общем быть выбраны из галогена, включая F, Cl, Br и I, низшего алкила, включая линейный, разветвленный и циклический, низшего галоалкила, включая фторалкил, хлоралкил, бромалкил и иодалкил, OH, низшего алкокси, включая линейные, разветвленные и циклические, SH, низшего алкилтио, включая линейный, разветвленный и циклический, амина, алкиламино, диалкиламино, силила, включая алкилсиллил, алкоксисиллил и арилсиллил, нитро, циано, карбонила, карбоновой кислоты, сложного эфира карбоновой кислоты, карбоксильного амида, аминокарбонила, аминокацила, карбамата, мочевины, тиокарбамата, тиомочевины, кетона, сульфона, сульфонида, арила, включая фенил, нафтил и антраценил, гетероарила, включая 5-ти членные гетероарилы, включая пиррол, имидазол, фуран,

тиофен, оксазол, тиазол, изоксазол, изотиазол, тиadiaзол, триазол, оксадиазол и тетразол, 6-ти членные гетероарилы, включая пиридин, пиримидин, пиазин, и конденсированные гетероарилы, включая бензофуран, бензотиофен, бензоксазол, бензимидазол, индол, бензотиазол, бензизоксазол и бензизотиазол.

Свойства $-R^1$ и $-R^2$ могут модулироваться необязательным добавлением электронодонорных или электроноакцепторных заместителей. Под термином "электронодонорная группа" подразумевают заместитель, приводящий к снижению кислотности R^1R^2CH ; электронодонорные группы обычно связаны с отрицательными константами Гаммета σ или Тафта σ^* и хорошо известны в области физической органической химии. (Константы Гаммета относятся к арильным/гетероарильным заместителям, константы Тафта относятся к заместителям в неароматических фрагментах.) Примеры подходящих электронодонорных заместителей включают низший алкил, низший алкокси, низший алкилтио, amino, алкиламино, диалкиламино и силлил.

Термин «электроноакцепторная группа» относится к заместителю, приводящему к увеличению кислотности группы R^1R^2CH ; электроноакцепторные группы обычно связаны с положительными константами Гаммета σ или Тафта σ^* и хорошо известны в области физической органической химии. Примеры подходящих электроноакцепторных заместителей включают галоген, дифторметил, трифторметил, нитро, циано, $C(=O)-R^x$, где $-R^x$ представляет собой H, низший алкил, низший алкокси или amino, или $S(O)_mRY$, где m равно 1 или 2 и R^Y представляет собой низший алкил, арил или гетероарил. Как хорошо известно специалистам, электронное влияние замещающей группы может зависеть от положения заместителя. Например, алкоксизаместитель в орто- или паразположении арильного кольца является электронодонорным и характеризуется отрицательной константой Гаммета σ , а алкоксизаместитель в метаположении арильного кольца является электроноакцепторным и характеризуется положительной константой Гаммета σ .

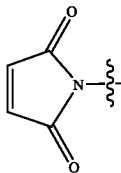
Термины «алкил», «алкенил» и «алкинил» включают линейные, разветвленные или циклические углеводородные группы, содержащие от 1 до 8 атомов углерода, или от 1 до 6 атомов углерода, или от 1 до 4 атомов углерода, где алкил представляет собой насыщенный углеводород, алкенил включает один или несколько углерод-углеродных двойных связей и алкинил включают одну или несколько углерод-углеродных тройных связей. Если не указано иное, они содержат от 1 до 6 атомов углерода.

Термин «арил» включает ароматические углеводородные группы, содержащие от 6 до 18 атомов углерода, предпочтительно от 6 до 10 атомов углерода, включая такие группы, как фенил, нафтил и антраценил. «Гетероарил» включает ароматические кольца, содержащие от 3 до 15 атомов углерода, содержащие по меньшей мере один атом N, O

или S, предпочтительно от 3 до 7 атомов углерода, содержащие по меньшей мере один атом N, O или S, включая такие группы, как пирролил, пиридил, пиримидинил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, хинолил, индолил, инденил и подобные.

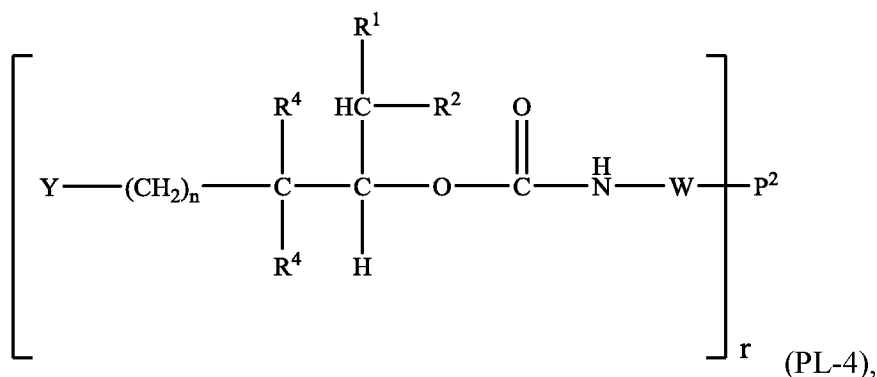
Термин «галоген» включает фтор, хлор, бром и йод.

Термин «малеимидо» представляет собой группу формулы



Согласно определенным вариантам осуществления Z' представляет собой гидрогель, как раскрыто в WO2020/206358 A1. В частности, согласно определенным вариантам осуществления Z' представляет собой гидрогель, полученный способом, включающим стадии

(а) предоставление первого форполимера, содержащего полимер с множеством ответвлений -P², где указанный первый форполимер имеет формулу (PL-4)



где

n представляет собой целое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4, 5 и 6,

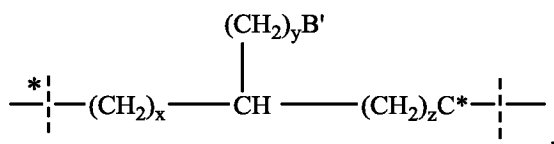
r представляет собой целое число более 2,

-Y представляет собой реакционноспособную функциональную группу для соединения указанного первого форполимера со вторым форполимером r,

-R¹ и -R² независимо представляют собой электроноакцепторную группу, алкил или -H, и где по меньшей мере один из R¹ и -R² представляет собой электроноакцепторную группу,

каждый -R⁴ независимо представляет собой C₁-C₃ алкил или два -R⁴ вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют 3-6-членное кольцо,

-W- отсутствует или присутствует



где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, указывает на присоединение к $-\text{NH}$, а непомяченная пунктирная линия указывает на присоединение к $-\text{P}^2$,

каждый из x , y и z независимо представляет собой целое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4, 5 и 6,

$-\text{B}'$ представляет собой $-\text{NH}_2$, $-\text{ONH}_2$, кетон, альдегид, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$, $-\text{CO}_2\text{H}$, карбоксамидную группу или группу, включающую циклооктин или бициклононин, и

$-\text{C}^*$ представляет собой карбоксамид, простой тиоэфир, тиосукцинимидил, триазол или оксим,

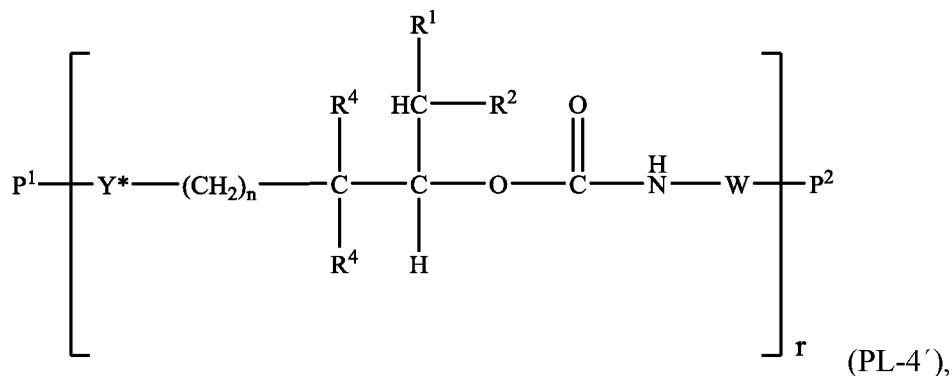
(b) получение второго форполимера, содержащего полимер с множеством ответвлений $-\text{P}^1$, где каждое ответвление оканчивается реакционноспособной функциональной группой $-\text{Y}''$, которая взаимодействует с Y на стадии (a);

(c) смешивание двух форполимеров со стадий (a) и (b) в условиях, при которых $-\text{Y}$ и Y'' реагируют с образованием связи Y^* ; и необязательно

(d) выделение полученного гидрогеля.

Соответственно, $-\text{Z}'$ представляет собой гидрогель, получаемый описанным выше способом. Согласно определенным вариантам осуществления гидрогель, полученный предшествующим способом, является деградируемым.

Согласно определенным вариантам осуществления $-\text{Y}$ и $-\text{Y}''$ реагируют на стадии (c) с образованием нерастворимой гидрогелевой матрицы, содержащей поперечные связи формулы (PL-4')



где n , r , $-\text{P}^1$, $-\text{Y}^*$, $-\text{R}^4$, $-\text{R}^1$, $-\text{R}^2$, $-\text{W}$ и $-\text{P}^2$ имеют значения, как определено выше.

Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой целое число, выбранное из 1, 2 и 3. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (PL-

4) или (PL-4') представляет собой целое число, выбранное из 0, 1, 2 и 3. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (PL-4) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой 3.

Согласно определенным вариантам осуществления P^2 с множеством ответвлений формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой полимер с g -ответвлениями, где g представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12. Согласно определенным вариантам осуществления g формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой целое число, выбранное из 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8. Согласно определенным вариантам осуществления g формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой целое число, выбранное из 2, 4, 6 и 8. Согласно определенным вариантам осуществления g формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления g формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления g формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой 6. Согласно определенным вариантам осуществления g формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой 8.

Согласно определенным вариантам осуществления $-P^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') имеет молекулярную массу по меньшей мере 1 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') имеет молекулярную массу 1 - 100 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') имеет молекулярную массу 1 - 80 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') имеет молекулярную массу 1 - 60 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') имеет молекулярную массу 1 - 40 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') имеет молекулярную массу 1 - 20 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') имеет молекулярную массу 1 - 10 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') имеет молекулярную массу 1 - 5 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') имеет молекулярную массу около 20 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') имеет молекулярную массу около 40 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') имеет молекулярную массу около 60 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') имеет молекулярную массу около 80 кДа.

полимер с множеством ответвлений $-P^1$ согласно стадии (b) имеет молекулярную массу около 60 кДа. Согласно определенным вариантам осуществления полимер с множеством ответвлений $-P^1$ согласно стадии (b) имеет молекулярную массу около 80 кДа.

Согласно определенным вариантам осуществления $-P^1$ согласно стадии (b) и $-P^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') содержат поли(этиленгликоль) (ПЭГ), поли(этиленоксид) (PEO), поли(этиленимин) (PEI), декстраны, гиалуроновые кислоты или их сополимеры. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^1$ согласно стадии (b) и P^2 формулы (PL-4) или (PL-4') представляют собой полимеры на основе ПЭГ. Согласно определенным вариантам осуществления $-P^1$ согласно стадии (b) и $-P^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляют собой полимеры на основе гиалуроновой кислоты.

Согласно определенным вариантам осуществления $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') являются независимыми электроноакцепторными группами, алкилом или $-H$, и где по меньшей мере один из $-R^1$ и $-R^2$ представляет собой электроноакцепторную группу.

Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой $-CN$, $-NO_2$, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, $-COR^3$, $-SOR^3$, или $-SO_2R^3$, где $-R^3$ представляет собой $-H$, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный арилалкил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероарилалкил, $-OR^8$ или $-NR^8_2$, где каждый $-R^8$ представляет собой независимо $-H$ или необязательно замещенный алкил, или оба $-R^8$ группы вместе с атомом азота, к которой они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, или $-SR^9$, где $-R^9$ представляет собой необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный арилалкил, необязательно замещенный гетероарил, или необязательно замещенный гетероарилалкил.

Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой $-CN$. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой $-NO_2$. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой необязательно замещенный арил, содержащий от 6 до 10 атомов углерода. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой необязательно замещенный фенил, нафтил, или антраценил. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой необязательно

замещенный гетероарил, содержащий от 3 до 7 атомов углерода и содержащий по меньшей мере один из атомов N, O или S. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой необязательно замещенный пирролил, пиридил, пиримидинил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, хинолил, индолил или инденил. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой необязательно замещенный алкенил, содержащий от 2 до 20 атомов углерода. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой необязательно замещенный алкинил, содержащий от 2 до 20 атомов углерода. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой $-\text{COR}^3$, $-\text{SOR}^3$, или $-\text{SO}_2\text{R}^3$, где $-\text{R}^3$ представляет собой $-\text{H}$, необязательно замещенный алкил, содержащий от 1 до 20 атомов углерода, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный арилалкил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероарилалкил, $-\text{OR}^8$ или $-\text{NR}^8_2$, где каждый $-\text{R}^8$ представляет собой независимо $-\text{H}$ или необязательно замещенный алкил, содержащий от 1 до 20 атомов углерода, или оба $-\text{R}^8$ группы вместе с атомом азота, к которой они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой $-\text{SR}^9$, где $-\text{R}^9$ представляет собой необязательно замещенный алкил, содержащий от 1 до 20 атомов углерода, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный арилалкил, необязательно замещенный гетероарил, или необязательно замещенный гетероарилалкил. Согласно определенным вариантам осуществления по меньшей мере один из $-R^1$ и $-R^2$ представляет собой $-\text{CN}$ или $-\text{SO}_2\text{R}^3$.

Согласно определенным вариантам осуществления по меньшей мере один из $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой $-\text{CN}$, $-\text{SOR}^3$ или $-\text{SO}_2\text{R}^3$. Согласно определенным вариантам осуществления по меньшей мере один из $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой $-\text{CN}$ или $-\text{SO}_2\text{R}^3$. Согласно определенным вариантам осуществления по меньшей мере один из $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой $-\text{CN}$ или $-\text{SO}_2\text{R}^3$, где $-\text{R}^3$ представляет собой необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный арил, или $-\text{NR}^8_2$. Согласно определенным вариантам осуществления по меньшей мере один из $-R^1$ и $-R^2$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой $-\text{CN}$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{SO}_2\text{CH}_3$, фенил, замещенный $-\text{SO}_2$, фенил,

замещенный $-\text{SO}_2$ и $-\text{Cl}$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$, $-\text{SO}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, или $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2$.

Согласно определенным вариантам осуществления каждый $-\text{R}^4$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой независимо C_1 - C_3 алкил или вместе могут образовывать 3-6-ти членное кольцо. Согласно определенным вариантам осуществления каждый $-\text{R}^4$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляет собой независимо C_1 - C_3 алкил. Согласно определенным вариантам осуществления оба $-\text{R}^4$ формулы (PL-4) или (PL-4') представляют собой метил.

Согласно определенным вариантам осуществления $-\text{Y}$ и $-\text{Y}''$ независимо выбраны из группы, состоящей из амина, аминокси, кетона, альдегида, малеимида, тиола, спирта, азида, 1,2,4,6-тетразинила, транс-циклооктенила, бициклононинила, циклооктинила и их защищенных вариантов.

Согласно определенным вариантам осуществления Y и Y'' могут взаимодействовать друг с другом, например, селективным образом. Например, когда $-\text{Y}$ представляет собой амин, $-\text{Y}''$ представляет собой карбоновую кислоту, активный сложный эфир или активный карбонат с образованием остаточной соединительной функциональной группы $-\text{Y}^*$, которая представляет собой амид или карбамат. В качестве другого примера, когда $-\text{Y}$ представляет собой азид, $-\text{Y}''$ представляет собой алкинил, бициклононинил или циклооктинил с образованием остаточной соединительной функциональной группы $-\text{Y}^*$, которая представляет собой 1,2,3-триазол. В качестве другого примера, когда $-\text{Y}$ представляет собой $-\text{NH}_2\text{O}$, $-\text{Y}''$ представляет собой кетон или альдегид с образованием остаточной соединительной функциональной группы $-\text{Y}^*$, которая представляет собой оксим. В качестве другого примера, когда $-\text{Y}$ представляет собой $-\text{SH}$, $-\text{Y}''$ представляет собой малеимид или галогенкарбонил с образованием остаточной соединительной функциональной группы Y^* , которая представляет собой тиосукцинимидил или тиоэфир. Точно так же эти роли $-\text{Y}$ и $-\text{Y}''$ можно поменять местами, чтобы получить $-\text{Y}^*$ противоположной ориентации.

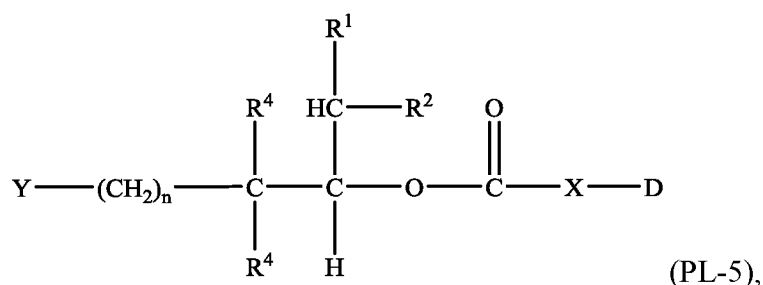
Согласно определенным вариантам осуществления $-\text{Y}^*$ содержит амид, оксим, 1,2,3-триазол, тиоэфир, тиосукцинимид или простой эфир. Согласно определенным вариантам осуществления $-\text{Y}^*$ представляет собой $-\text{L}^2$.

Эти реакции конъюгации можно проводить в условиях, известных в данной области техники, например, когда $-\text{Y}$ представляет собой азид, а $-\text{Y}''$ представляет собой циклооктин, конъюгация происходит в любом растворителе, в котором оба компонента проявляют достаточную растворимость, хотя известно, что водные растворы демонстрируют более благоприятные скорости реакции. При смешивании в подходящем

растворителе, обычно водном буфере, при рН от 2 до 7, когда $-Y$ и $-Y''$ представляют собой азид/циклооктин, или при рН от 6 до 9, когда $-Y$ и $-Y''$ представляют собой активированный сложный эфир и амин, группы $-Y$ и $-Y''$ реагируют с образованием нерастворимой гидрогелевой матрицы, содержащей поперечные связи формулы (PL-4'). Этот процесс можно проводить в объемной фазе или в условиях эмульгирования в смешанной органической/водной системе с образованием суспензий микрочастиц, таких как микросферы, пригодные для инъекций.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат, содержащий гидрогель Z' , получают способом, включающим стадии:

- (a) предоставление первого форполимера формулы (PL-4)
- (b) реакция форполимера формулы (PL-4) с линкером-лекарственным средством формулы (PL-5)



где

n , $-\text{R}^1$, $-\text{R}^2$, $-\text{R}^4$ и $-\text{Y}$ имеют значения, как определено в формуле (PL-4),

$-\text{D}$ представляет собой фрагмент лекарственного средства,

$-\text{X}$ отсутствует, когда $-\text{D}$ представляет собой фрагмент лекарственного средства, связанный через амин, или X представляет собой $\text{N}(\text{R}^6)\text{CH}_2-$, когда $-\text{D}$ представляет собой фрагмент лекарственного средства, связанный через фенол, спирт, тиол, тиофенол, имидазол или неосновной амин; где $-\text{R}^6$ представляет собой необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил, так что $-\text{Y}$ формулы (PL-5) реагирует с $-\text{B}'$ формулы (PL-4),

(c) предоставление второго форполимера, содержащего полимер с множеством ответвлений $-\text{P}^1$, где каждое ответвление оканчивается реакционноспособной функциональной группой $-\text{Y}''$, которая взаимодействует с $-\text{Y}$ на стадии (a), и где варианты осуществления для $-\text{P}^1$ описаны выше,

(d) смешивание двух форполимеров со стадий (a) и (b) в условиях, при которых $-\text{Y}$ и Y'' реагируют с образованием остаточной соединительной функциональной группы $-\text{Y}^*$; и необязательно

(e) выделение полученного гидрогеля.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат получают способом, включающим стадию взаимодействия гидрогеля Z' с линкером-лекарственным средством формулы (PL-5), где $-B'$ на гидрогеле Z' взаимодействует с $-Y$ формулы (PL-5).

Только в контексте формул (PL-4), (PL-4') и (PL-5) используемые термины имеют следующее значение:

Термин «алкил» относится к линейным, разветвленным или циклическим насыщенным углеводородным группам, содержащим от 1 до 20, от 1 до 12, от 1 до 8, от 1 до 6 или от 1 до 4 атомов углерода. Согласно определенным вариантам осуществления алкил является линейным или же разветвленным. Примеры линейных или разветвленных алкильных групп включают метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, *n*-пентил, *n*-гексил, *n*-гептил, *n*-октил, *n*-нонил и *n*-децил. Согласно желаемому варианту осуществления алкил является циклическим. Примеры циклических алкильных групп включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентадиенил и циклогексил.

Термин «алкокси» относится к алкильным группам, связанным с кислородом, включая метокси, этокси, изопропокси, циклопропокси и циклобутокси.

Термин «алкенил» относится к неароматическим ненасыщенным углеводородам с двойными углерод-углеродными связями и от 2 до 20, от 2 до 12, от 2 до 8, от 2 до 6 или от 2 до 4 атомами углерода.

Термин «алкинил» относится к неароматическим ненасыщенным углеводородам с тройными углерод-углеродными связями и от 2 до 20, от 2 до 12, от 2 до 8, от 2 до 6 или от 2 до 4 атомами углерода.

Термин «арил» относится к ароматическим углеводородным группам, содержащим от 6 до 18 атомов углерода, предпочтительно от 6 до 10 атомов углерода, включая такие группы, как фенил, нафтил и антраценил. Термин «гетероарил» относится к ароматическим кольцам, содержащим от 3 до 15 атомов углерода, содержащим по меньшей мере один атом N, O или S, предпочтительно от 3 до 7 атомов углерода, содержащим по меньшей мере один атом N, O или S, включая такие группы, как пирролил, пиридил, пиримидинил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, хинолил, индолил и инденил.

Согласно определенным вариантам осуществления алкенил, алкинил, арил или гетероарил фрагменты могут быть связаны с остальной частью молекулы через алкильную связь. При таких обстоятельствах заместитель будет обозначаться как алкенилалкил, алкинилалкил, арилалкил или гетероарилалкил, указывая на то, что алкиленовая группа

находится между алкениловой, алкиниловой, арильной или гетероарильной группами и молекулой, с которой связан алкенил, алкинил, арил или гетероарил.

Термин «галоген» или «гало» относится к бром, фтору, хлору и йоду.

Термин «гетероциклическое кольцо» или «гетероциклил» относится к 3-15-членному ароматическому или неароматическому кольцу, содержащему по меньшей мере один атом N, O или S. Примеры включают пиперидинил, пиперазинил, тетрагидропиранил, пирролидин и тетрагидрофуранил, а также иллюстративные группы, предусмотренные для термина «гетероарил» выше. Согласно определенным вариантам осуществления гетероциклическое кольцо или гетероциклил не являются ароматическими. Согласно определенным вариантам осуществления гетероциклическое кольцо или гетероциклил являются ароматическими.

Термин «необязательно замещенный» относится к группе, которая может быть незамещенной или замещенной одним или несколькими (например, 1, 2, 3, 4 или 5) заместителями, которые могут быть одинаковыми или разными. Примеры заместителей включают алкил, алкенил, алкинил, галоген, $-CN$, $-OR^{aa}$, $-SR^{aa}$, $-NR^{aa}R^{bb}$, $-NO_2$, $-C=NH(OR^{aa})$, $-C(O)R^{aa}$, $-OC(O)R^{aa}$, $-C(O)OR^{aa}$, $-C(O)NR^{aa}R^{bb}$, $-OC(O)NR^{aa}R^{bb}$, $-NR^{aa}C(O)R^{bb}$, $-NR^{aa}C(O)OR^{bb}$, $-S(O)R^{aa}$, $-S(O)_2R^{aa}$, $-NR^{aa}S(O)R^{bb}$, $-C(O)NR^{aa}S(O)R^{bb}$, $-NR^{aa}S(O)_2R^{bb}$, $-C(O)NR^{aa}S(O)_2R^{bb}$, $-S(O)NR^{aa}R^{bb}$, $-S(O)_2NR^{aa}R^{bb}$, $-P(O)(OR^{aa})(OR^{bb})$, гетероциклил, гетероарил или арил, где алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, гетероциклил, гетероарил и арил, каждый независимо, необязательно замещен $-R^{cc}$, где $-R^{aa}$ и $-R^{bb}$ каждый независимо представляет собой $-H$, алкил, алкенил, алкинил, гетероциклил, гетероарил или арил, или $-R^{aa}$ и $-R^{bb}$ вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклил, который необязательно замещен алкилом, алкенилом, алкинилом, галогеном, гидроксилом, алкокси или $-CN$, и где каждый $-R^{cc}$ представляет собой независимо алкил, алкенил, алкинил, галоген, гетероциклил, гетероарил, арил, $-CN$, или $-NO_2$.

Фрагмент $-L^1$ может быть соединен с $-D$ через фрагмент II-2 формулы (I), в частности через аминокислотный остаток указанного фрагмента II-2, или через модифицирующий фрагмент M_{mod} , присутствующий в $-D$. Согласно одному варианту осуществления $-L^1$ соединен с $-D$ через фрагмент II-2, в частности через аминокислотный остаток фрагмента II-2. Согласно другому варианту осуществления $-L^1$ соединен с $-D$ через модифицирующий фрагмент M_{mod} , присутствующий в $-D$. Понятно, что один или несколько фрагментов $-L^1$ может быть соединены с фрагментом M_{mod} . Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 может содержать

фрагмент $-L^1$ -, соединенный с одним аминокислотным остатком фрагмента II-2 формулы (I), и может содержать фрагмент $-L^1$ -, соединенный с фрагментом M_{mod} .

Согласно одному варианту осуществления все фрагменты $-L^1$ -, присутствующие в конъюгате II-2, соединены с аминокислотным остатком -D.

Если $-L^1$ - соединен с аминокислотным остатком фрагмента II-2, такой аминокислотный остаток может быть протеиногенным или непротеиногенным аминокислотным остатком -D. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с непротеиногенным аминокислотным остатком. Согласно определенным вариантам осуществления присоединение $-L^1$ - осуществляется к протеиногенному аминокислотному остатку. Если присоединение происходит к протеиногенному аминокислотному остатку, указанный протеиногенный аминокислотный остаток согласно реализации варианта осуществления выбирают из группы, состоящей из цистеина, метионина, гистидина, лизина, триптофана, серина, треонина, тирозина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глутамина и аргинина. Согласно определенным вариантам осуществления такой протеиногенный аминокислотный остаток выбирают из группы, состоящей из цистеина, гистидина, лизина, триптофана, серина, треонина, тирозина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и аргинина.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с остатком цистеина -D. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с остатком гистидина -D. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с остатком лизина. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с остатком триптофана. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с остатком серина. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с остатком треонина. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с остатком тирозина. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с остатком аспарагиновой кислоты. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с остатком глутаминовой кислоты. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с остатком аргинина.

Согласно определенным вариантам осуществления по меньшей мере один фрагмент $-L^1$ - соединен с аминокислотным остатком -D и один или несколько дополнительные фрагменты $-L^1$ - соединены с модифицирующим фрагментом, присутствующим в -D.

Фрагмент $-L^1$ - может быть соединен с -D через любой тип связи, при условии, что она является обратимой. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с -D посредством связи, выбранной из группы, состоящей из амида, сложного эфира,

карбамата, ацеталя, аминаля, ими́на, оксима, гидразона, дисульфида и ацилгуанидина. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с $-D$ посредством связи, выбранной из группы, состоящей из амида, сложного эфира, карбамата и ацилгуанидина. Понятно, что эти связи могут быть необратимыми сами по себе, но эта обратимость может быть результатом действия определенных групп атомов или фрагментов, присутствующих в $-L^1$ -.

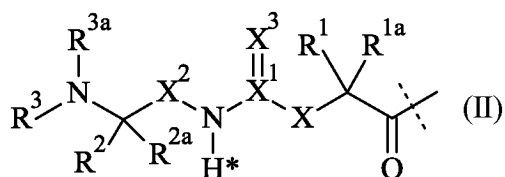
Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с $-D$ через сложноэфирную связь. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с $-D$ через карбаматную связь. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с $-D$ через ацилгуанидин. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с $-D$ через амидную связь.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с $-D$ через азот функциональной группы амина боковой цепи остатка лизина или N-конца $-D$. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с $-D$ через азот функциональной группы амина боковой цепи остатка лизина или N-конца $-D$, и связь, образованная между $-D$ и $-L^1$ -, представляет собой карбамат.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с $-D$ через азот функциональной группы амина боковой цепи остатка лизина $-D$. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с $-D$ через азот функциональной группы амина боковой цепи остатка лизина или N-конца $-D$, и связь, образованная между $-D$ и $-L^1$ -, представляет собой карбамат.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с $-D$ через азот функциональной группы N-конца $-D$. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - соединен с $-D$ через азот функциональной группы N-конца $-D$, и связь, образованная между $-D$ и $-L^1$ -, представляет собой карбамат.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - имеет структуру, как раскрыто в WO 2009/095479 A2. Соответственно, согласно определенным вариантам осуществления фрагмент $-L^1$ - имеет формулу (II):



где пунктирная линия показывает присоединение к атому азота фрагмента $-D$ посредством образования амидной связи;

$-X-$ представляет собой $-C(R^4R^{4a})-$; $-N(R^4)-$; $-O-$; $-C(R^4R^{4a})-C(R^5R^{5a})-$; $-C(R^5R^{5a})-C(R^4R^{4a})-$; $-C(R^4R^{4a})-N(R^6)-$; $-N(R^6)-C(R^4R^{4a})-$; $-C(R^4R^{4a})-O-$; $-O-C(R^4R^{4a})-$; или $-C(R^7R^{7a})-$;

X^1 представляет собой C или S(O);

$-X^2-$ представляет собой $-C(R^8R^{8a})-$ или $-C(R^8R^{8a})-C(R^9R^{9a})-$;

$=X^3$ представляет собой $=O$; $=S$ или $=N-CN$;

$-R^1$, $-R^{1a}$, $-R^2$, $-R^{2a}$, $-R^4$, $-R^{4a}$, $-R^5$, $-R^{5a}$, $-R^6$, $-R^8$, $-R^{8a}$, $-R^9$, $-R^{9a}$ независимо выбраны из группы, состоящей из $-H$ и C_{1-6} алкила;

$-R^3$, $-R^{3a}$ независимо выбирают из группы, состоящей из $-H$; и C_{1-6} алкила, при условии, что в случае, если один из $-R^3$, $-R^{3a}$ или оба отличны от водорода, они соединены с N, к которому они присоединены через SP^3 -гибридизованный атом углерода;

$-R^7$ представляет собой $-N(R^{10}R^{10a})$; или $-NR^{10}-(C=O)-R^{11}$;

$-R^{7a}$, $-R^{10}$, $-R^{10a}$, $-R^{11}$ независимо друг от друга представляют собой $-H$ или C_{1-6} алкил;

необязательно одна или более из пар $-R^{1a}/-R^{4a}$, $-R^{1a}/-R^{5a}$, $-R^{1a}/-R^{7a}$, $-R^{4a}/-R^{5a}$, $-R^{8a}/-R^{9a}$ образуют химическую связь;

необязательно одна или более из пар $-R^1/-R^{1a}$, $-R^2/-R^{2a}$, $-R^4/-R^{4a}$, $-R^5/-R^{5a}$, $-R^8/-R^{8a}$,

$-R^9/-R^{9a}$ соединены вместе с атомом, к которому они присоединены, с образованием C_{3-10} циклоалкила; или 3-10-ти членного гетероцикла;

необязательно одна или более из пар $-R^1/-R^4$, $-R^1/-R^5$, $-R^1/-R^6$, $-R^1/-R^{7a}$, $-R^4/-R^5$, $-R^4/-R^6$, $-R^8/-R^9$, $-R^2/-R^3$ соединяются вместе с атомами, к которым они присоединены, с образованием кольца A;

необязательно, R^3/R^{3a} соединяются вместе с атомом азота, к которому они присоединены, с образованием 3-10-членного гетероцикла;

A выбран из группы, состоящей из фенила; нафтила; инденила; инданила; тетралинила; C_{3-10} циклоалкила; 3-10-ти членного гетероцикла и 8-11-ти членного гетероцикла и

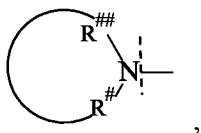
где $-L^1$ -имеет в качестве заместителя по меньшей мере один $-L^2-Z$ и где $-L^1$ -необязательно дополнительно замещен, при условии, что водород, помеченный звездочкой в формуле (II), не замещен $-L^2-Z$ или заместителем.

Предпочтительно $-L^1$ -формулы (II) имеет в качестве заместителя один фрагмент $-L^2-Z$.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ -формулы (II) дополнительно не замещен.

Понятно, что если $-R^3/-R^{3a}$ формулы (II) соединяются вместе с атомом азота, к которому они присоединены, с образованием 3-10-членного гетероцикла, только такие 3-

10-членные гетероциклы могут быть образованы, в которых атомы, непосредственно соединенные с атомом азота, представляют собой SP^3 -гибридизованные атомы углерода. Другими словами, такой 3-10-членный гетероцикл, образованный $-R^3/-R^{3a}$ вместе с атомом азота, с которыми они соединены, имеет следующую структуру:



где

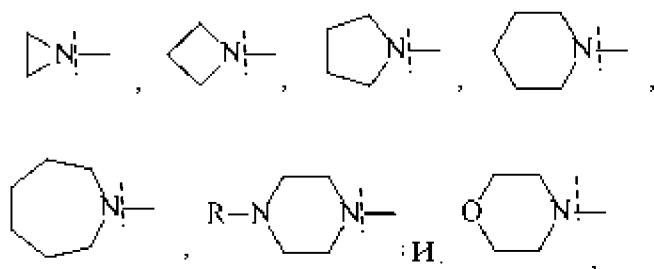
пунктирная линия показывает присоединение к остальной части $-L^1-$;

кольцо содержит от 3 до 10 атомов, включая по меньшей мере один атом азота; и

$R^{\#}$ и $R^{\#\#}$ представляют собой SP^3 -гибридизованный атом углерода.

Также понятно, что 3-10-членный гетероцикл может быть дополнительно замещен.

Примерными вариантами выполнения подходящих 3-10-членных гетероциклов, образованных $-R^3/-R^{3a}$ формулы (II) вместе с атомом азота, к которому они присоединены, являются следующие:

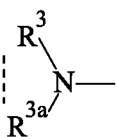


где

пунктирная линия указывает присоединение к остальной части молекулы; и

$-R$ выбран из группы, состоящей из $-H$ и C_{1-6} алкила.

$-L^1$ -формулы (II) может необязательно быть дополнительно замещенной. В общем, любой заместитель может применяться, до тех пор, пока принцип расщепления не затронут, т.е. водород, помеченный звездочкой в формуле (II), не заменен, а азот фрагмента

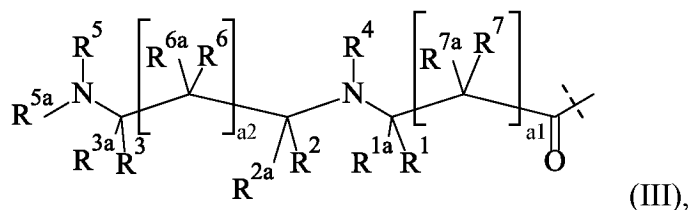


формулы (II) остается частью первичного, вторичного или третичного амина, т.е. R^3 и R^{3a} независимо друг от друга представляют собой $-H$ или соединены с $-N<$ через SP^3 -гибридизованный атом углерода.

Атом азота $-D$, связанный с $-L^1$ - формулы (II), представляет собой согласно определенным вариантам осуществления атома азота функциональной группы амина, которая может быть первичной, вторичной или третичной аминогруппой. Согласно определенным вариантам осуществления атом азота $-D$, связанный с $-L^1$ - формулы (II), представляет атома азота функциональной группы амина, которая может быть первичной, вторичной или третичной аминогруппой. Согласно определенным вариантам осуществления атом азота $-D$, связанный с $-L^1$ - формулы (II), представляет собой атом азота функциональной группы первичного амина. Согласно определенным вариантам осуществления атом азота $-D$, связанный с $-L^1$ - формулы (II), представляет собой атом азота функциональной группы первичного амина. Если $-L^1$ - формулы (II) конъюгирован с $-D$, где $-D$ представляет собой белковую или пептидную составляющую лекарственного средства, аминная функциональная группа согласно определенным вариантам осуществления может представлять собой N-концевую функциональную группу амина или функциональную группу амина боковой цепи лизина. Если $-L^1$ - формулы (II) конъюгирован с $-D$, где $-D$ представляет собой белковую или пептидную часть лекарственного средства, функциональная аминогруппа согласно определенным вариантам осуществления может представлять собой функциональную группу амина в боковой цепи лизина.

Согласно определенным вариантам осуществления $-R^1$ или $-R^{1a}$ формулы (II) имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$ или $-L^2-Z'$. Согласно другому варианту осуществления $-R^2$ или $-R^{2a}$ формулы (II) имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$ или $-L^2-Z'$. Согласно другому варианту осуществления $-R^3$ или $-R^{3a}$ формулы (II) имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$ или $-L^2-Z'$. Согласно другому варианту осуществления $-R^4$ формулы (II) имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$ или $-L^2-Z'$. Согласно другому варианту осуществления $-R^5$ или $-R^{5a}$ формулы (II) имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$ или $-L^2-Z'$. Согласно другому варианту осуществления $-R^6$ формулы (II) имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$ или $-L^2-Z'$. Согласно другому варианту осуществления $-R^7$ или $-R^{7a}$ формулы (II) имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$ или $-L^2-Z'$. Согласно другому варианту осуществления $-R^8$ или $-R^{8a}$ формулы (II) имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$ или $-L^2-Z'$. Согласно другому варианту осуществления $-R^9$ или $-R^{9a}$ формулы (II) имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$ или $-L^2-Z'$.

Согласно другому варианту осуществления $-L^1$ -имеет структуру, как раскрыто в WO2016/020373A1. Соответственно, согласно другому варианту осуществления фрагмент $-L^1$ -имеет формулу (III):



где

пунктирная линия показывает присоединение к первичному или вторичному амину или гидроксилу фрагмента -D посредством образования амидной или сложноэфирной связи, соответственно;

$-R^1$, $-R^{1a}$, $-R^2$, $-R^{2a}$, $-R^3$ и $-R^{3a}$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из -H, $-C(R^8R^{8a}R^{8b})$, $-C(=O)R^8$, $-C\equiv N$, $-C(=NR^8)R^{8a}$, $-CR^8(=CR^{8a}R^{8b})$, $-C\equiv CR^8$ и -T;

$-R^4$, $-R^5$ и $-R^{5a}$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из -H, $-C(R^9R^{9a}R^{9b})$ и -T;

a_1 и a_2 независимо друг от друга представляют собой 0 или 1;

каждый $-R^6$, $-R^{6a}$, $-R^7$, $-R^{7a}$, $-R^8$, $-R^{8a}$, $-R^{8b}$, $-R^9$, $-R^{9a}$, $-R^{9b}$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из -H, галогена, $-CN$, $-COOR^{10}$, $-OR^{10}$, $-C(O)R^{10}$, $-C(O)N(R^{10}R^{10a})$, $-S(O)_2N(R^{10}R^{10a})$, $-S(O)N(R^{10}R^{10a})$, $-S(O)_2R^{10}$, $-S(O)R^{10}$, $-N(R^{10})S(O)_2N(R^{10a}R^{10b})$, $-SR^{10}$, $-N(R^{10}R^{10a})$, $-NO_2$, $-OC(O)R^{10}$, $-N(R^{10})C(O)R^{10a}$, $-N(R^{10})S(O)_2R^{10a}$, $-N(R^{10})S(O)R^{10a}$, $-N(R^{10})C(O)OR^{10a}$, $-N(R^{10})C(O)N(R^{10a}R^{10b})$, $-OC(O)N(R^{10}R^{10a})$, -T, C_{1-20} алкила, C_{2-20} алкенила и C_{2-20} алкинила; где -T, C_{1-20} алкил, C_{2-20} алкенил и C_{2-20} алкинил необязательно замещены одним или более $-R^{11}$, которые являются одинаковыми или различными, и где C_{1-20} алкил, C_{2-20} алкенил и C_{2-20} алкинил необязательно прерываются одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из -T-, $-C(O)O-$, $-O-$, $-C(O)-$, $-C(O)N(R^{12})-$, $-S(O)_2N(R^{12})-$, $-S(O)N(R^{12})-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)-$, $-N(R^{12})S(O)_2N(R^{12a})-$, $-S-$, $-N(R^{12})-$, $-OC(OR^{12})(R^{12a})-$, $-N(R^{12})C(O)N(R^{12a})-$, и $-OC(O)N(R^{12})-$;

каждый $-R^{10}$, $-R^{10a}$, $-R^{10b}$ независимо выбран из группы, состоящей из -H, -T, C_{1-20} алкила, C_{2-20} алкенила и C_{2-20} алкинила; где -T, C_{1-20} алкил, C_{2-20} алкенил и C_{2-20} алкинил необязательно замещены одним или более $-R^{11}$, которые являются одинаковыми или различными, и где C_{1-20} алкил, C_{2-20} алкенил и C_{2-20} алкинил необязательно прерываются одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из -T-, $-C(O)O-$, $-O-$, $-C(O)-$, $-C(O)N(R^{12})-$, $-S(O)_2N(R^{12})-$, $-S(O)N(R^{12})-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)-$, $-N(R^{12})S(O)_2N(R^{12a})-$, $-S-$, $-N(R^{12})-$, $-OC(OR^{12})(R^{12a})-$, $-N(R^{12})C(O)N(R^{12a})-$, и $-OC(O)N(R^{12})-$;

каждый Т независимо друг от друга выбран из группы, состоящей из фенила, нафтила, инденила, инданила, тетралинила, C₃₋₁₀ циклоалкила, 3-10-ти членного гетероциклила и 8-11-ти членного гетеробициклила, где каждый Т необязательно независимо замещен одним или более -R¹¹, которые являются одинаковыми или различными;

каждый -R¹¹ независимо друг от друга выбран из галогена, -CN, оксо (=O), -COOR¹³, -OR¹³, -C(O)R¹³, -C(O)N(R¹³R^{13a}), -S(O)₂N(R¹³R^{13a}), -S(O)N(R¹³R^{13a}), -S(O)₂R¹³, -S(O)R¹³, -N(R¹³)S(O)₂N(R^{13a}R^{13b}), -SR¹³, -N(R¹³R^{13a}), -NO₂, -OC(O)R¹³, -N(R¹³)C(O)R^{13a}, -N(R¹³)S(O)₂R^{13a}, -N(R¹³)S(O)R^{13a}, -N(R¹³)C(O)OR^{13a}, -N(R¹³)C(O)N(R^{13a}R^{13b}), -OC(O)N(R¹³R^{13a}), и C₁₋₆ алкила; где C₁₋₆ алкил необязательно замещен одним или более галогенами, которые являются одинаковыми или различными;

каждый -R¹², -R^{12a}, -R¹³, -R^{13a}, -R^{13b} независимо выбран из группы, состоящей из -H и C₁₋₆ алкила; где C₁₋₆ алкил необязательно замещен одним или более галогенами, которые являются одинаковыми или различными;

необязательно одна или более из пар -R¹/-R^{1a}, -R²/-R^{2a}, -R³/-R^{3a}, -R⁶/-R^{6a}, -R⁷/-R^{7a} соединены вместе с атомом, к которому они присоединены, с образованием C₃₋₁₀ циклоалкила или 3-10-ти членного гетероциклила;

необязательно одна или более из пар -R¹/-R², -R¹/-R³, -R¹/-R⁴, -R¹/-R⁵, -R¹/-R⁶, -R¹/-R⁷, -R²/-R³, -R²/-R⁴, -R²/-R⁵, -R²/-R⁶, -R²/-R⁷, -R³/-R⁴, -R³/-R⁵, -R³/-R⁶, -R³/-R⁷, -R⁴/-R⁵, -R⁴/-R⁶, -R⁴/-R⁷, -R⁵/-R⁶, -R⁵/-R⁷, -R⁶/-R⁷ соединены вместе с атомами, к которым они присоединены, с образованием кольца А;

А выбран из группы, состоящей из фенила; нафтила; инденила; инданила; тетралинила; C₃₋₁₀ циклоалкила; 3-10-ти членного гетероциклила и 8-11-ти членного гетеробициклила

где -L¹-имеет в качестве заместителя по меньшей мере один -L²-Z, и где -L¹-необязательно дополнительно замещен.

Необязательные дальнейшие заместители фрагмента -L¹-формулы (III) предпочтительно являются такими, как описано выше.

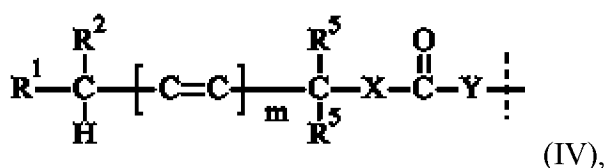
Предпочтительно -L¹-формулы (III) имеет в качестве заместителя один фрагмент -L²-Z.

Согласно определенным вариантам осуществления -L¹-формулы (III) дополнительно не замещен.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения -L¹-формулы (III) дополнительно не замещен.

Дополнительные предпочтительные варианты выполнения для $-L^1$ -раскрываются в EP1536334B1, WO2009/009712A1, WO2008/034122A1, WO2009/143412A2, WO2011/082368A2 и US8618124B2, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме.

Дополнительные предпочтительные варианты выполнения для $-L^1$ -раскрываются в US8946405B2 и US8754190B2, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме. Соответственно, предпочтительная фрагмент $-L^1$ -имеет формулу (IV):



где

пунктирная линия показывает присоединение к $-D$ через функциональную группу фрагмента $-D$, выбранную из группы, состоящей из $-\text{OH}$, $-\text{SH}$ и NH_2 ;

m равно 0 или 1;

по меньшей мере один или оба из $-\text{R}^1$ и R^2 выбирается/выбираются независимо друг от друга из группы, состоящей из $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, необязательно замещенного арила, необязательно замещенного гетероарила, необязательно замещенного алкенила, необязательно замещенного алкинила, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^3$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}^3$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^3$ и $-\text{SR}^4$,

один и только один из $-\text{R}^1$ и R^2 выбирают из группы, состоящей из $-\text{H}$, необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного арилалкила и необязательно замещенного гетероарилалкила;

$-\text{R}^3$ выбирают из группы, состоящей из $-\text{H}$, необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного арила, необязательно замещенного арилалкила, необязательно замещенного гетероарила, необязательно замещенного гетероарилалкила, $-\text{OR}^9$ и $\text{N}(\text{R}^9)_2$;

$-\text{R}^4$ выбирают из группы, состоящей из необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного арила, необязательно замещенного арилалкила, необязательно замещенного гетероарила и необязательно замещенного гетероарилалкила;

каждый $-\text{R}^5$ независимо выбирают из группы, состоящей из $-\text{H}$, необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного алкенилалкила, необязательно замещенного алкинилалкила, необязательно замещенного арила, необязательно замещенного арилалкила, необязательно замещенного гетероарила и необязательно замещенного гетероарилалкила;

$-R^9$ выбирают из группы, состоящей из $-H$ и необязательно замещенного алкила;

$-Y$ - отсутствует, и $-X$ -представляет собой $-O$ -или S -; или

$-Y$ - представляет собой $-N(Q)CH_2-$, и X -представляет собой $-O-$;

Q выбирают из группы, состоящей из необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного арила, необязательно замещенного арилалкила, необязательно замещенного гетероарила и необязательно замещенного гетероарилалкила; необязательно, $-R^1$ и R^2 могут соединяться с образованием 3-8-членного кольца; и необязательно, оба $-R^9$ вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо;

где $-L^1$ -имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$, и где $-L^1$ -необязательно дополнительно замещен.

Только в контексте формулы (IV) применяемые термины имеют следующие значения:

Термин “алкил”, как применяется в настоящей заявке, включает линейные, разветвленные или циклические насыщенные углеводородные группы, имеющие от 1 до 8 атомов углерода, или в некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения от 1 до 6 или от 1 до 4 атомов углерода.

Термин “алкокси” включает алкильные группы, связанные с кислородом, включая метокси, этокси, изопропокси, циклопропокси, циклобутокси и подобное.

Термин “алкенил” включает неароматические ненасыщенные углеводороды с двойными связями углерод-углерод.

Термин “алкинил” включает неароматические ненасыщенные углеводороды с тройными связями углерод-углерод.

Термин “арил” включает ароматические углеводородные группы, имеющие от 6 до 18 атомов углерода, предпочтительно от 6 до 10 атомов углерода, включая группы, такие как фенил, нафтил и антраценил. Термин “гетероарил” включает ароматические кольца, содержащие от 3 до 15 атомов углерода, содержащие по меньшей мере один N , O или S атом, предпочтительно от 3 до 7 атомов углерода, содержащие по меньшей мере один N , O или S атом, включая группы, такие как пирролил, пиридил, пиримидинил, имидазолил, оксазолил, изооксазолил, тиазолил, изотиазолил, хинолил, индолил, инденил и подобное.

В некоторых случаях, алкенильные, алкинильные, арильные или гетероарильные фрагменты могут быть соединены с оставшейся частью молекулы через алкиленовую связь. При этих обстоятельствах заместитель будет называться алкенилалкил, алкинилалкил, арилалкил или гетероарилалкил, что указывает на то, что алкиленовый

фрагмент находится между алкенилом, алкинилом, арилом или гетероарилом и молекулой, с которой связан алкенил, алкинил, арил или гетероарил.

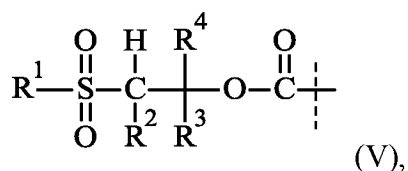
Термин “галоген” включает бром, фтор, хлор и иод.

Термин “гетероциклическое кольцо” относится к 4-8-членному ароматическому или неароматическому кольцу, содержащему от 3 до 7 атомов углерода и по меньшей мере один N, O, или S атом. Примерами являются пиперидинил, пиперазинил, тетрагидропиранил, пирролидин и тетрагидрофуранил, а также примерные группы, приведенные выше для термина “гетероарил”.

Когда кольцевая система необязательно замещена, подходящие заместители выбирают из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила или дополнительного кольца, где каждый необязательно дополнительно замещен. Необязательные заместители в любой группе, включая вышеуказанные, включают гало, нитро, циано, OR, -SR, -NR₂, -OCOR, -NRCOR, -COOR, -CONR₂, -SOR, -SO₂R, -SONR₂, -SO₂NR₂, где каждый R независимо представляет собой алкил, алкенил, алкинил, арил или гетероарил, или две R группы, взятые вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют кольцо.

Предпочтительно -L¹-формулы (IV) имеет в качестве заместителя один фрагмент -L²-Z.

Согласно другому варианту осуществления -L¹-имеет структуру, раскрытую в WO2013/036857A1, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Соответственно, согласно другому варианту осуществления -L¹-имеет формулу (V):



где

пунктирная линия показывает присоединение к -D через аминную функциональную группу -D;

-R¹ выбран из группы, состоящей из обязательного замещенного C₁-C₆ линейного, разветвленного или циклического алкила; необязательно замещенного арила; необязательно замещенного гетероарила, алкокси и -NR⁵₂;

-R² выбран из группы, состоящей из -H; необязательно замещенного C₁-C₆ алкила; необязательно замещенного арила и необязательно замещенного гетероарила;

-R³ выбран из группы, состоящей из -H; необязательно замещенного C₁-C₆ алкила; необязательно замещенного арила и необязательно замещенного гетероарила;

$-R^4$ выбран из группы, состоящей из $-H$; необязательно замещенного C_1-C_6 алкила; необязательно замещенного арила и необязательно замещенного гетероарила;

каждый $-R^5$ независимо друг от друга выбран из группы, состоящей из $-H$; необязательно замещенного C_1-C_6 алкила; необязательно замещенного арила и необязательно замещенного гетероарила; или взятые вместе два $-R^5$ могут представлять собой циклоалкил или циклогетероалкил;

где $-L^1$ -имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$, и где $-L^1$ -необязательно дополнительно замещен.

Только в контексте формулы (V) применяемые термины имеют следующие значения:

“Алкил”, “алкенил” и “алкинил” включают линейные, разветвленные или циклические углеводородные группы, имеющие от 1 до 8 атомов углерода или 1-6 атомов углерода или 1-4 атомов углерода, где алкилом является насыщенный углеводород, алкенил включает одну или более двойных связей углерод-углерод, и алкинил включает одну или более тройных связей углерод-углерод. Если иного не указано, они содержат 1-6 атомов углерода.

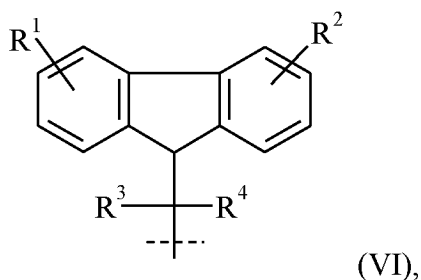
“Арил” включает ароматические углеводородные группы, имеющие от 6 до 18 атомов углерода, предпочтительно 6-10 атомов углерода, включая группы, такие как фенил, нафтил и антрацен. “Гетероарил” включает ароматические кольца, содержащие 3-15 атомов углерода, содержащие по меньшей мере один N, O или S атом, предпочтительно 3-7 атомов углерода, содержащие по меньшей мере один N, O или S атом, включая группы, такие как пирролил, пиридил, пиримидинил, имидазолил, оксазолил, изооксазолил, тиазолил, изотиазолил, хинолил, индолил, инденил и подобное.

Термин “замещенный” означает алкильную, алкенильную, алкинильную, арильную или гетероарильную группу, включающую одну или более групп заместителей вместо одного или более атомов водорода. Заместители могут в общем быть выбраны из галогена, включая F, Cl, Br и I; низшего алкила, включая линейный, разветвленный и циклический; низшего галоалкила, включая фторалкил, хлоралкил, бромалкил и иодалкил; OH; низшего алкокси, включая линейные, разветвленные и циклические; SH; низшего алкилтио, включая линейный, разветвленный и циклический; amino, алкиламино, диалкиламино, силила, включая алкилсилил, алкоксисилил и арилсилил; нитро; циано; карбонила; карбоновой кислоты, сложного эфира карбоновой кислоты, карбоксильного амида, аминокарбонила; аминоксила; карбамата; мочевины; тиокарбамата; тиомочевины; кетона; сульфона; сульфонида; арила, включая фенил, нафтил и антраценил; гетероарила, включая 5-ти членные гетероарилы, включая пиррол, имидазол, фуран,

тиофен, оксазол, тиазол, изоксазол, изотиазол, тиadiaзол, триазол, оксадиазол и тетразол, 6-ти членные гетероарилы, включая пиридин, пиримидин, пиазин, и конденсированные гетероарилы, включая бензофуран, бензотиофен, бензоксазол, бензимидазол, индол, бензотиазол, бензизоксазол и бензизотиазол.

Предпочтительно $-L^1$ -формулы (V) имеет в качестве заместителя один фрагмент $-L^2-Z$.

Согласно другому варианту осуществления $-L^1$ -имеет структуру, как раскрыто в US7585837B2, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Соответственно, согласно другому варианту осуществления $-L^1$ -имеет формулу (VI):



где

пунктирная линия показывает присоединение к $-D$ через аминную функциональную группу $-D$;

R^1 и R^2 независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила, алкокси, алкоксиалкила, арила, алкарила, аралкила, галогена, нитро, $-SO_3H$, $-SO_2NHR^5$, амина, аммония, карбоксила, PO_3H_2 и OPO_3H_2 ;

R^3 , R^4 и R^5 независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила и арила;

где $-L^1$ -имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$, и где $-L^1$ -необязательно дополнительно замещен.

Подходящими заместителями для формулы (VI) являются фрагменты алкил (как например C_{1-6} алкил), алкенил (как например C_{2-6} алкенил), алкинил (как например C_{2-6} алкинил), арил (как например фенил), гетероалкил, гетероалкенил, гетероалкинил, гетероарил (как например ароматический 4-7 членный гетероцикл) или галоген.

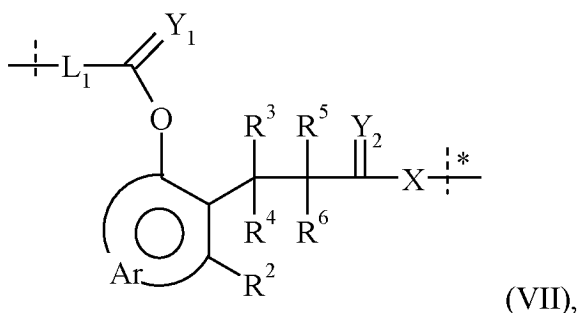
Только в контексте формулы (VI) применяемые термины имеют следующие значения:

Термины “алкил”, “алкокси”, “алкоксиалкил”, “арил”, “алкарил” и “аралкил” означают алкильные радикалы, содержащие 1-8, предпочтительно 1-4 атомов углерода, например, метил, этил, пропил, изопропил и бутил, и арильные радикалы, содержащие 6-

10 атомов углерода, например, фенил и нафтил. Термин “галоген” включает бром, фтор, хлор и иод.

Предпочтительно $-L^1$ -формулы (VI) имеет в качестве заместителя один фрагмент $-L^2-Z$.

Согласно другому варианту осуществления $-L^1$ -имеет структуру, как раскрыто в WO2002/089789A1, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Соответственно, согласно другому варианту осуществления $-L^1$ -имеет формулу (VII):



где

пунктирная линия показывает присоединение к $-D$ через аминную функциональную группу $-D$;

L_1 представляет собой бифункциональную связывающую группу,

Y_1 и Y_2 независимо представляют собой O, S или NR^7 ;

R^2, R^3, R^4, R^5, R^6 и R^7 независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, C_{1-6} алкилов, C_{3-12} разветвленных алкилов, C_{3-8} циклоалкилов, C_{1-6} замещенных алкилов, C_{3-8} замещенных циклоалкилов, арилов, замещенных арилов, аралкилов, C_{1-6} гетероалкилов, замещенных C_{1-6} гетероалкилов, C_{1-6} алкокси, фенокси и C_{1-6} гетероалкокси;

Ar представляет собой фрагмент, который при включении в формулу (VII), образует мультизамещенный ароматический углеводород или мульти-замещенную гетероциклическую группу;

X представляет собой химическую связь или фрагмент, который активно переносится в клетку-мишень, гидрофобный фрагмент или их комбинацию,

у представляет собой 0 или 1;

где $-L^1$ -имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$, и где $-L^1$ -необязательно дополнительно замещен.

Только в контексте формулы (VII) применяемые термины имеют следующие значения:

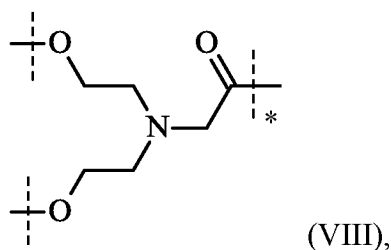
Термин “алкил”, как следует понимать, включает, например, неразветвленные, разветвленные, замещенные C_{1-12} алкилы, включая алкокси, C_{3-8} циклоалкилы или замещенные циклоалкилы, и т.д.

Термин “замещение”, как следует понимать, включает добавление или замещение одного или более атомов, содержащихся в функциональной группе, или соединения с одним или более отличными атомами.

Замещенные алкилы включают карбоксиалкилы, аминоалкилы, диалкиламины, гидроксиалкилы и меркаптоалкилы; замещенные циклоалкилы включают фрагменты, как например 4-хлорциклогексил; арилы включают фрагменты, как например нафтил; замещенные арилы включают фрагменты, как например 3-бром-фенил; аралкилы включают фрагменты, как например толуил; гетероалкилы включают фрагменты, как например этилтиофен; замещенный гетероалкилы включают фрагменты, как например 3-метокситиофен; алкокси включает фрагменты, как например метокси; и фенокси включает фрагменты, как например 3-нитрофенокси. Гало-, как необходимо понимать, включает фтор, хлор, иод и бром.

Предпочтительно $-L^1$ -формулы (VII) имеет в качестве заместителя один фрагмент $-L^2-Z$.

Согласно другому варианту осуществления $-L^1$ -содержит подструктуру формулы (VIII)



где

пунктирная линия, помеченная звездочкой, указывает присоединение к атому азота в $-D$ посредством образования амидной связи;

непомеченная пунктирная линия указывает присоединение к оставшейся части $-L^1$;

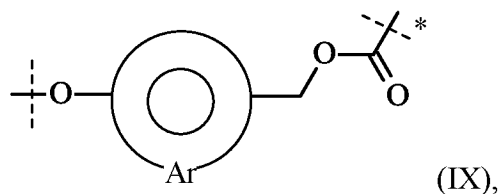
и

где $-L^1$ -имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$, и где $-L^1$ -необязательно дополнительно замещен.

Предпочтительно $-L^1$ -формулы (VIII) имеет в качестве заместителя один фрагмент $-L^2-Z$.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ -формулы (VIII) дополнительно не замещен.

Согласно другому варианту осуществления $-L^1$ -содержит подструктуру формулы (IX)



где

пунктирная линия, помеченная звездочкой, указывает присоединение к атому азота в -D посредством образования карбаматной связи;

непомеченная пунктирная линия указывает присоединение к оставшейся части $-L^1$;

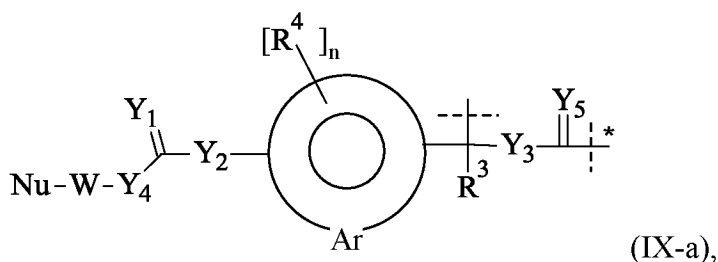
и

где $-L^1$ -имеет в качестве заместителя $-L^2-Z$, и где $-L^1$ -необязательно дополнительно замещен.

Предпочтительно $-L^1$ -формулы (IX) имеет в качестве заместителя один фрагмент $-L^2-Z$.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ -формулы (IX) дополнительно не замещен.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ -имеет формулу (IX-a):



где

пунктирная линия, помеченная звездочкой, указывает присоединение к атому азота в -D, и непомеченная пунктирная линия указывает присоединение к $-L^2-Z$;

n представляет собой 0, 1, 2, 3, или 4;

$=Y_1$, выбран из группы, состоящей из =O и =S;

$-Y_2$ - выбран из группы, состоящей из -O- и -S-;

$-Y_3$ - выбран из группы, состоящей из -O- и -S-;

$-Y_4$ - выбран из группы, состоящей из -O-, $-NR^5$ - и $-C(R^6R^{6a})$ -;

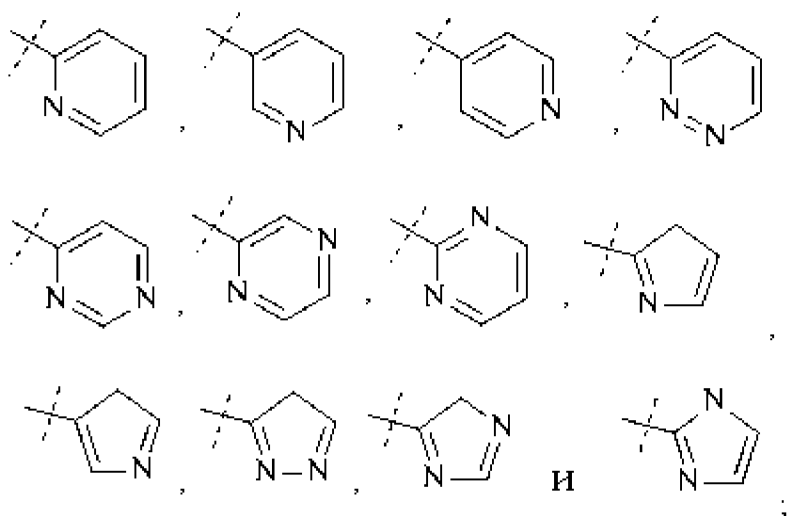
$=Y_5$ выбран из группы, состоящей из =O и =S;

$-R^3$, $-R^5$, $-R^6$, $-R^{6a}$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из -H, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила, трет-бутила, н-пентила, 2-метилбутила, 2,2-диметилпропила, н-гексила, 2-метилпентила, 3-метилпентила, 2,2-диметилбутила, 2,3-диметилбутила и 3,3-диметилпропила;

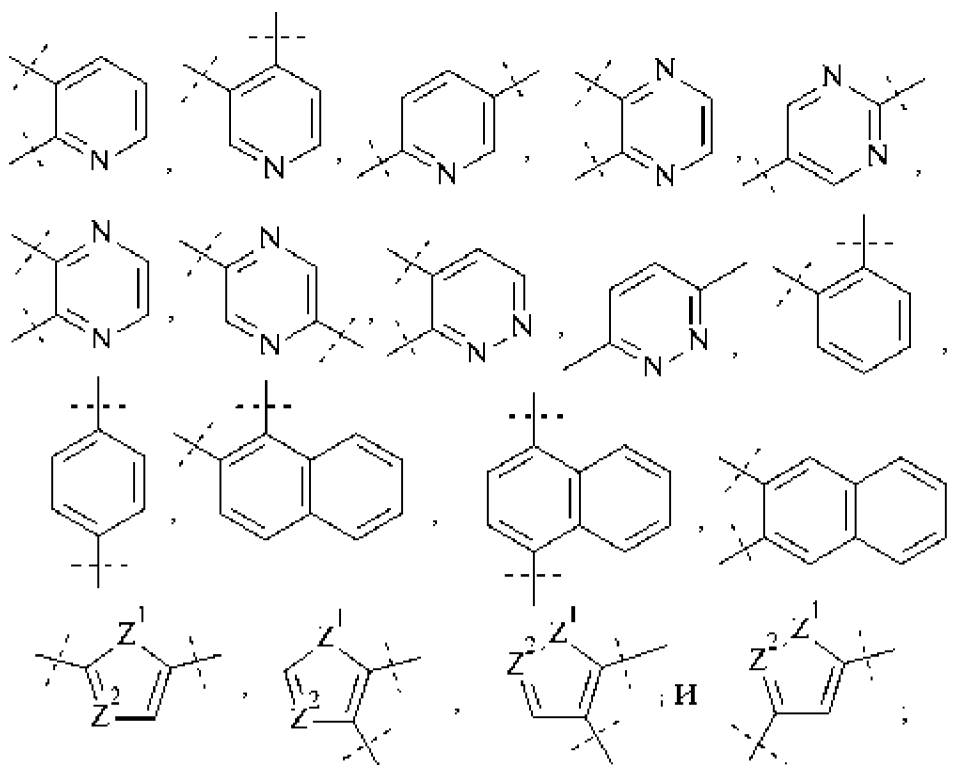
$-R^4$ выбран из группы, состоящей из метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила, трет-бутила, н-пентила, 2-метилбутила, 2,2-диметилпропила, н-гексила, 2-метилпентила, 3-метилпентила, 2,2-диметилбутила, 2,3-диметилбутила и 3,3-диметилпропила;

$-W-$ выбран из группы, состоящей из C_{1-20} алкила, необязательно прерывающимся одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из C_{3-10} циклоалкила, 8-30-ти членного карбополициклила, 3-10-ти членный гетероциклила, $-C(O)-$, $-C(O)N(R^7)-$, $-O-$, $-S-$ и $-N(R^7)-$;

$-Nu$ представляет собой нуклеофил, выбранный из группы, состоящей из $-N(R^7R^{7a})$, $-N(R^7OH)$, $-N(R^7)-N(R^{7a}R^{7b})$, $-S(R^7)$, $-COOH$,



$-Ar-$ выбран из группы, состоящей из



где

пунктирная линия указывает присоединение к оставшейся части $-L^1$,

$-Z^1$ - выбран из группы, состоящей из $-O$ -, $-S$ -и $-N(R^7)$ -, и

$-Z^2$ - представляет собой $-N(R^7)$ -; и

$-R^7$, $-R^{7a}$, $-R^{7b}$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из $-H$, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила и C_{2-6} алкинила;

где $-L^1$ -необязательно дополнительно замещен.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - имеет формулу (IX-a), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина лизиновой боковой цепи или N-конца -D.

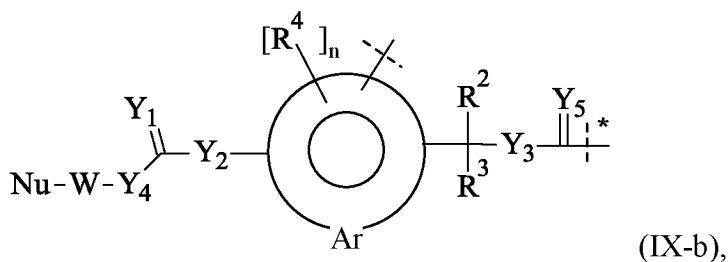
Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - имеет формулу (IX-a), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина лизиновой боковой цепи -D.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - имеет формулу (IX-a), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина N-конца -D.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - формулы (IX-a) дополнительно не замещен.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ -формулы (IX-a) дополнительно не замещен.

Согласно другому варианту осуществления $-L^1$ -имеет формулу (IX-b):



где

пунктирная линия, помеченная звездочкой, указывает присоединение к атому азота в $-D$, и непомеченная пунктирная линия указывает присоединение к $-L^2-Z$;

n представляет собой 0, 1, 2, 3 или 4;

$=Y_1$, выбран из группы, состоящей из $=O$ и $=S$;

$-Y_2$ - выбран из группы, состоящей из $-O$ -и $-S$ -;

$-Y_3$ - выбран из группы, состоящей из $-O$ -и $-S$ -;

$-Y_4$ - выбран из группы, состоящей из $-O$ -, $-NR^5$ -и $-C(R^6R^{6a})$ -;

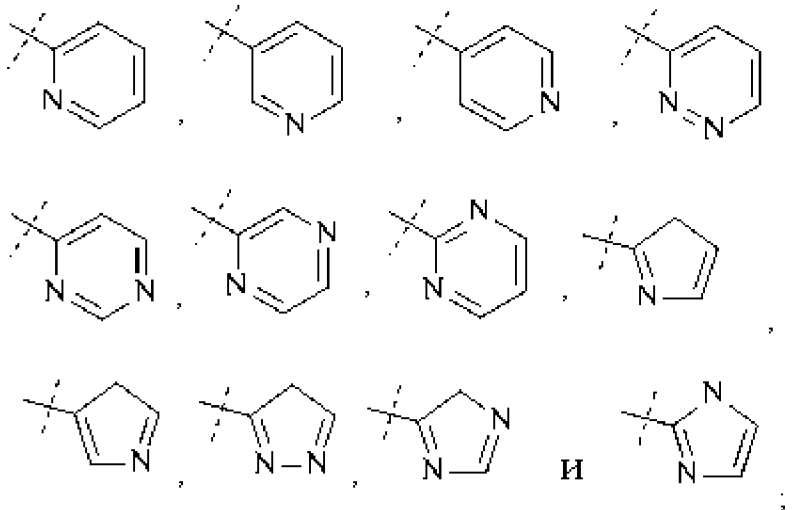
$=Y_5$ выбран из группы, состоящей из $=O$ и $=S$;

$-R^2$, $-R^3$, $-R^5$, $-R^6$, $-R^{6a}$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из $-H$, метила, этила, n -пропила, изопропила, n -бутила, изобутила, втор-бутила, трет-бутила, n -пентила, 2-метилбутила, 2,2-диметилпропила, n -гексила, 2-метилпентила, 3-метилпентила, 2,2-диметилбутила, 2,3-диметилбутила и 3,3-диметилпропила;

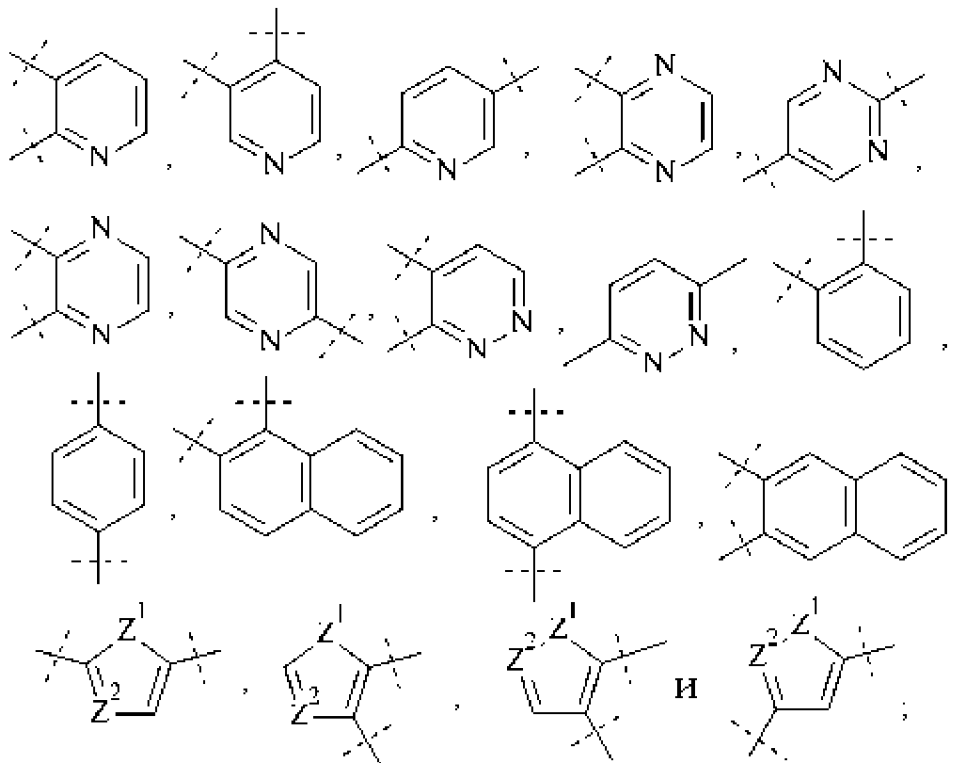
$-R^4$ выбран из группы, состоящей из метила, этила, n -пропила, изопропила, n -бутила, изобутила, втор-бутила, трет-бутила, n -пентила, 2-метилбутила, 2,2-диметилпропила, n -гексила, 2-метилпентила, 3-метилпентила, 2,2-диметилбутила, 2,3-диметилбутила и 3,3-диметилпропила;

$-W$ - выбран из группы, состоящей из C_{1-20} алкила, необязательно прерывающимся одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из C_{3-10} циклоалкила, 8-30-ти членного карбополициклила, 3-10-ти членный гетероциклила, $-C(O)$ -, $-C(O)N(R^7)$ -, $-O$ -, $-S$ -и $-N(R^7)$ -;

$-Nu$ представляет собой нуклеофил, выбранный из группы, состоящей из $-N(R^7R^{7a})$, $-N(R^7OH)$, $-N(R^7)-N(R^{7a}R^{7b})$, $-S(R^7)$, $-COOH$,



-Ar- выбран из группы, состоящей из



где

пунктирная линия указывает присоединение к оставшейся части $-L^1-$,

$-Z^1-$ выбран из группы, состоящей из $-O-$, $-S-$ и $-N(R^7)-$, и

$-Z^2-$ представляет собой $-N(R^7)-$; и

$-R^7$, $-R^{7a}$, $-R^{7b}$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из $-H$, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила и C_{2-6} алкинила;

где $-L^1-$ необязательно дополнительно замещен.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - имеет формулу (IX-b), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина лизиновой боковой цепи или N-конца -D.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - имеет формулу (IX-b), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина лизиновой боковой цепи -D.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - имеет формулу (IX-b), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина N-конца -D.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - формулы (IX-b) дополнительно не замещен.

Согласно определенным вариантам осуществления $=Y^1$ формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой =O.

Согласно определенным вариантам осуществления $-Y^2$ - формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой -O-.

Согласно определенным вариантам осуществления $-Y^3$ - формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой -O-.

Согласно определенным вариантам осуществления $-Y^4$ - формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой -NR⁵-.

Согласно определенным вариантам осуществления $=Y^5$ формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой =O.

Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой 0 или 1. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой 0. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой 1.

Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой 0 или 1. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой 0. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой 1.

Согласно определенным вариантам осуществления $-R^2$ формулы (IX-b) выбран из группы, состоящей из -H, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила и трет-бутила. Согласно определенным вариантам осуществления $-R^2$ формулы (IX-b) выбран из группы, состоящей из -H, метила, этила, н-пропила и изопропила. Согласно определенным вариантам осуществления $-R^2$ формулы (IX-b)

выбран из -H, метила и этила. Согласно определенным вариантам осуществления $-R^2$ формулы (IX-b) представляет собой -H.

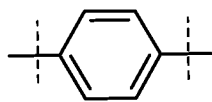
Согласно определенным вариантам осуществления $-R^3$ формулы (IX-a) и (IX-b) выбран из группы, состоящей из -H, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила и трет-бутила. Согласно определенным вариантам осуществления $-R^3$ формулы (IX-a) и (IX-b) выбран из группы, состоящей из -H, метила, этила, н-пропила и изопропила. Согласно определенным вариантам осуществления $-R^3$ формулы (IX-a) и (IX-b) выбран из -H, метила и этила. Согласно определенным вариантам осуществления $-R^3$ формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой -H.

Согласно предпочтительному варианту осуществления каждый $-R^4$ формулы (IX-a) и (IX-b) независимо выбран из метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила и трет-бутила. Согласно определенным вариантам осуществления $-R^4$ формулы (IX-a) и (IX-b) выбран из группы, состоящей из метила, этила, н-пропила и изопропила. Согласно определенным вариантам осуществления $-R^4$ формулы (IX-a) и (IX-b) выбран из метила и этила.

Согласно определенным вариантам осуществления $-R^5$ формулы (IX-a) и (IX-b) выбран из группы, состоящей из -H, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила и трет-бутила. Согласно определенным вариантам осуществления $-R^5$ формулы (IX-a) и (IX-b) выбран из группы, состоящей из -H, метила, этила, н-пропила и изопропила. Согласно определенным вариантам осуществления $-R^5$ формулы (IX-a) и (IX-b) выбран из метила и этила. Согласно определенным вариантам осуществления $-R^5$ формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой метил.

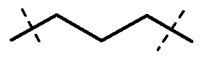
Согласно определенным вариантам осуществления $-R^6$ и $-R^{6a}$ формулы (IX-a) и (IX-b) независимо выбраны из группы, состоящей из -H, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила и трет-бутила. Согласно определенным вариантам осуществления $-R^6$ и $-R^{6a}$ формулы (IX-a) и (IX-b) независимо выбраны из группы, состоящей из -H, метила, этила, н-пропила и изопропила. Согласно определенным вариантам осуществления $-R^6$ и $-R^{6a}$ формулы (IX-a) и (IX-b) независимо выбраны из -H, метила и этила. Согласно определенным вариантам осуществления $-R^6$ и $-R^{6a}$ формулы (IX-a) и (IX-b) оба представляют собой -H.

Согласно определенным вариантам осуществления Ag формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой фенил. Согласно определенным вариантам осуществления Ag формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой



где пунктирная линия указывает присоединение к оставшейся части фрагмента формулы (IX-a) и (IX-b).

Согласно определенным вариантам осуществления W формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой C₁₋₂₀ алкил, необязательно прерванный C₃₋₁₀ циклоалкилом, -C(O)-, -C(O)N(R⁷)-, -O-, -S- и -N(R⁷)-. Согласно определенным вариантам осуществления W формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой C₁₋₁₀ алкил, необязательно прерванный C₃₋₁₀ циклоалкилом, -C(O)-, -C(O)N(R⁷)-, -O-, -S- и -N(R⁷)-. Согласно определенным вариантам осуществления W формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой C₁₋₆ алкил, необязательно прерванный C₃₋₁₀ циклоалкилом, -C(O)-, -C(O)N(R⁷)-, -O-, -S- и -N(R⁷)-. Согласно определенным вариантам осуществления W формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой



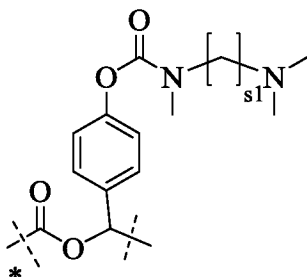
где

пунктирная линия указывает присоединение к оставшейся части фрагмента формулы (IX-a) и (IX-b), соответственно.

Согласно определенным вариантам осуществления -Nu формулы (IX-a) и (IX-b) представляет собой -N(R⁷R^{7a}).

Согласно определенным вариантам осуществления -R⁷, -R^{7a} и -R^{7b} формулы (IX-a) и (IX-b) независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из -H, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила и трет-бутила. Согласно определенным вариантам осуществления -R⁷, -R^{7a} и -R^{7b} формулы (IX-a) и (IX-b) каждый независимо выбран из -H, метила, этила, н-пропила и изопропила. Согласно определенным вариантам осуществления -R⁷, -R^{7a} и -R^{7b} формулы (IX-a) и (IX-b) каждый независимо выбран из метила или этила. Согласно определенным вариантам осуществления -R⁷, -R^{7a} и -R^{7b} формулы (IX-a) и (IX-b) оба представляют собой метил.

Согласно определенным вариантам осуществления -L¹-имеет формулу (IX-c)



(IX-c),

где

пунктирная линия, помеченная звездочкой, указывает присоединение к атому азота в -D;

непомеченная пунктирная линия указывает присоединение к $-L^2-Z$; и

s1 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

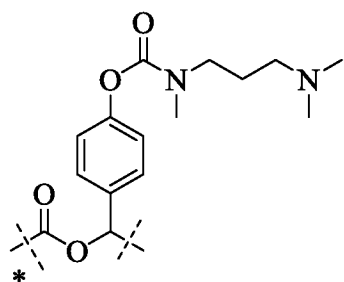
Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ имеет формулу (IX-c), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина лизиновой боковой цепи или N-конца -D.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ имеет формулу (IX-c), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина лизиновой боковой цепи -D.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ имеет формулу (IX-c), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина N-конца -D.

Согласно определенным вариантам осуществления s1 формулы (IX-c) представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4 и 5. Согласно определенным вариантам осуществления s1 формулы (IX-c) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления s1 формулы (IX-c) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления s1 формулы (IX-c) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления s1 формулы (IX-c) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления s1 формулы (IX-c) представляет собой 5.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ имеет формулу (IX-d)



(IX-d),

где

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота -D, и

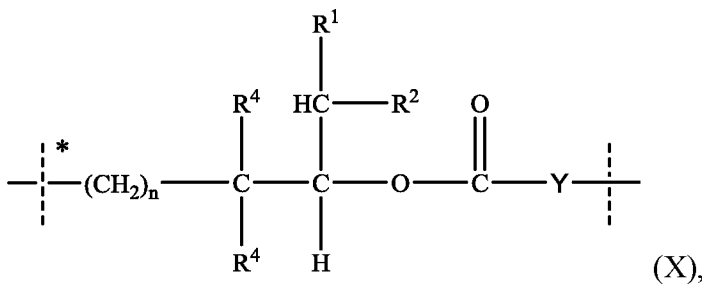
неотмеченная пунктирная линия показывает присоединение к $-L^2-Z$.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - имеет формулу (IX-d), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина лизиновой боковой цепи или N-конца -D.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - имеет формулу (IX-d), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина лизиновой боковой цепи -D.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - имеет формулу (IX-d), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина N-конца -D.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - имеет структуру, раскрытую в WO2020/206358 A1. Соответственно, согласно определенным вариантам осуществления фрагмент $-L^1$ - имеет формулу (X):



где

неотмеченная пунктирная линия показывает присоединение к -D,

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к $-L^2$ -Z или $-L^2$ -Z',

n представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5 и 6,

$-\text{R}^1$ и $-\text{R}^2$ независимо представляют собой электроноакцепторную группу, алкил, или -H, и где по меньшей мере один из $-\text{R}^1$ или $-\text{R}^2$ представляет собой электроноакцепторную группу,

каждый $-\text{R}^4$ представляет собой независимо C_1 - C_3 алкил или два $-\text{R}^4$ вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют 3-6-членное кольцо; и

$-\text{Y}$ - отсутствует, когда -D представляет собой фрагмент лекарственного средства, связанный через амин, или $=\text{Y}$ - представляет собой $\text{N}(\text{R}^6)\text{CH}_2$, когда -D представляет собой фрагмент лекарственного средства, связанный через фенол, спирт, тиол, тиофенол, имидазол или неосновной амин; где R^6 представляет собой необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил.

Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (X) представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5 и 6. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (X) представляет собой целое число, выбранное из 1, 2 и 3. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (X) представляет собой целое число from 0, 1, 2 и 3. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (X) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (X) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (X) представляет собой 3.

Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (X) выбрано из группы, состоящей из $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, $-\text{COR}^3$, $-\text{SOR}^3$, или $-\text{SO}_2\text{R}^3$, где $-\text{R}^3$ представляет собой $-\text{H}$, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный арилалкил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероарилалкил, $-\text{OR}^8$ или $-\text{NR}^8_2$, где каждый $-\text{R}^8$ представляет собой независимо $-\text{H}$ или необязательно замещенный алкил, или оба $-\text{R}^8$ группы вместе с атомом азота, к которой они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, или $-\text{SR}^9$, где $-\text{R}^9$ представляет собой необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный арилалкил, необязательно замещенный гетероарил, или необязательно замещенный гетероарилалкил.

Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (X) представляет собой $-\text{CN}$. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (X) представляет собой $-\text{NO}_2$. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (X) представляет собой необязательно замещенный арил, содержащий от 6 до 10 атомов углерода. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (X) представляет собой необязательно замещенный фенил, нафтил, или антраценил. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (X) представляет собой необязательно замещенный гетероарил, содержащий от 3 до 7 атомов углерода и содержащий по меньшей мере один атом N, O, или S. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (X) представляет собой необязательно замещенный пирролил, пиридил, пиримидинил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, хинолил, индолил, или инденил. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы

(X) представляет собой необязательно замещенный алкенил, содержащий от 2 до 20 атомов углерода. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (X) представляет собой необязательно замещенный алкинил, содержащий от 2 до 20 атомов углерода. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (X) представляет собой $-\text{COR}^3$, $-\text{SOR}^3$, или $-\text{SO}_2\text{R}^3$, где $-R^3$ представляет собой $-\text{H}$, необязательно замещенный алкил, содержащий от 1 до 20 атомов углерода, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный арилалкил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероарилалкил, $-\text{OR}^8$ или $-\text{NR}^8_2$, где каждый $-R^8$ представляет собой независимо $-\text{H}$ или необязательно замещенный алкил, содержащий 1 - 20 атомов углерода, или оба $-R^8$ группы вместе с атомом азота, к которой они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо. Согласно определенным вариантам осуществления электроноакцепторная группа $-R^1$ и $-R^2$ формулы (X) представляет собой $-\text{SR}^9$, где $-R^9$ представляет собой необязательно замещенный алкил, содержащий 1 - 20 атомов углерода, необязательно замещенный арил, необязательно замещенный арилалкил, необязательно замещенный гетероарил, или необязательно замещенный гетероарилалкил.

Согласно определенным вариантам осуществления по меньшей мере один из $-R^1$ или $-R^2$ формулы (X) представляет собой $-\text{CN}$, $-\text{SOR}^3$ или $-\text{SO}_2\text{R}^3$. Согласно определенным вариантам осуществления по меньшей мере один из $-R^1$ и $-R^2$ формулы (X) представляет собой $-\text{CN}$ или $-\text{SO}_2\text{R}^3$. Согласно определенным вариантам осуществления по меньшей мере один из $-R^1$ и $-R^2$ формулы (X) представляет собой $-\text{CN}$ или $-\text{SO}_2\text{R}^3$, где $-R^3$ представляет собой необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный арил, или $-\text{NR}^8_2$. Согласно определенным вариантам осуществления по меньшей мере один из $-R^1$ и $-R^2$ формулы (X) представляет собой $-\text{CN}$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{SO}_2\text{CH}_3$, фенил, замещенный $-\text{SO}_2$, фенил, замещенный $-\text{SO}_2$ и $-\text{Cl}$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$, $-\text{SO}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, или $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2$.

Согласно определенным вариантам осуществления каждый $-R^4$ формулы (X) представляет собой независимо C_1 - C_3 алкил. Согласно определенным вариантам осуществления оба $-R^4$ представляют собой метил.

Согласно определенным вариантам осуществления $-\text{Y}$ - формулы (X) отсутствует. Согласно определенным вариантам осуществления $-\text{Y}$ - формулы (X) представляет собой $-\text{N}(\text{R}^6)\text{CH}_2$.

Согласно определенным вариантам осуществления $-\text{L}^1$ - имеет формулу (X), где n представляет собой 1, $-R^1$ представляет собой $-\text{CN}$, $-R^2$ представляет собой $-\text{H}$, и $-R^4$ представляет собой $-\text{CH}_3$. Согласно определенным вариантам осуществления $-\text{L}^1$ - имеет

определенным вариантам осуществления $-L^1$ - имеет формулу (X), где n представляет собой 3, $-R^1$ представляет собой $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-R^2$ представляет собой $-\text{H}$, и $-R^4$ представляет собой $-\text{CH}_3$. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - имеет формулу (X), где n представляет собой 3, $-R^1$ представляет собой $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2$, $-R^2$ представляет собой $-\text{H}$, и $-R^4$ представляет собой $-\text{CH}_3$. Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1$ - имеет формулу (X), где n представляет собой 3, $-R^1$ представляет собой фенил, замещенный $-\text{SO}_2$ и $-\text{CH}_3$, $-R^2$ представляет собой $-\text{H}$, и $-R^4$ представляет собой $-\text{CH}_3$.

Только в контексте формулы (X) используемые термины имеют следующее значение:

Термин «алкил» относится к линейным, разветвленным или циклическим насыщенным углеводородным группам, содержащим от 1 до 20, от 1 до 12, от 1 до 8, от 1 до 6 или от 1 до 4 атомов углерода. Согласно определенным вариантам осуществления алкил является линейным или же разветвленным. Примеры линейных или разветвленных алкильных групп включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил, н-нонил и н-децил. Согласно желаемому варианту осуществления алкил является циклическим. Примеры циклических алкильных групп включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентадиенил и циклогексил.

Термин «алкокси» относится к алкильным группам, связанным с кислородом, включая метокси, этокси, изопропокси, циклопропокси и циклобутокси.

Термин «алкенил» относится к неароматическим ненасыщенным углеводородам с двойными углерод-углеродными связями и от 2 до 20, от 2 до 12, от 2 до 8, от 2 до 6 или от 2 до 4 атомами углерода.

Термин «алкинил» относится к неароматическим ненасыщенным углеводородам с тройными углерод-углеродными связями и от 2 до 20, от 2 до 12, от 2 до 8, от 2 до 6 или от 2 до 4 атомами углерода.

Термин «арил» относится к ароматическим углеводородным группам, содержащим от 6 до 18 атомов углерода, предпочтительно от 6 до 10 атомов углерода, включая такие группы, как фенил, нафтил и антраценил. Термин «гетероарил» относится к ароматическим кольцам, содержащим от 3 до 15 атомов углерода, содержащим по меньшей мере один атом N, O или S, предпочтительно от 3 до 7 атомов углерода, содержащим по меньшей мере один атом N, O или S, включая такие группы, как пирролил, пиридил, пиримидинил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, хинолил, индолил и инденил.

Согласно определенным вариантам осуществления алкенил, алкинил, арил или гетероарил фрагменты могут быть связаны с остальной частью молекулы через алкильную связь. При таких обстоятельствах заместитель будет обозначаться как алкенилалкил, алкинилалкил, арилалкил или гетероарилалкил, указывая на то, что алкиленовая группа находится между алкениловой, алкиниловой, арильной или гетероарильной группами и молекулой, с которой связан алкенил, алкинил, арил или гетероарил.

Термин «галоген» или «гало» относится к бром, фтору, хлору и йоду.

Термин «гетероциклическое кольцо» или «гетероциклил» относится к 3-15-членному ароматическому или неароматическому кольцу, содержащему по меньшей мере один атом N, O или S. Примеры включают пиперидинил, пиперазинил, тетрагидропиранил, пирролидин и тетрагидрофуранил, а также иллюстративные группы, предусмотренные для термина «гетероарил» выше. Согласно определенным вариантам осуществления гетероциклическое кольцо или гетероциклил не являются ароматическими. Согласно определенным вариантам осуществления гетероциклическое кольцо или гетероциклил являются ароматическими.

Термин «необязательно замещенный» относится к группе, которая может быть незамещенной или замещенной одним или несколькими (например, 1, 2, 3, 4 или 5) заместителями, которые могут быть одинаковыми или разными. Примеры заместителей включают алкил, алкенил, алкинил, галоген, -CN, -OR^{aa}, -SR^{aa}, -NR^{aa}R^{bb}, -NO₂, -C=NH(OR^{aa}), -C(O)R^{aa}, -OC(O)R^{aa}, -C(O)OR^{aa}, -C(O)NR^{aa}R^{bb}, -OC(O)NR^{aa}R^{bb}, -NR^{aa}C(O)R^{bb}, -NR^{aa}C(O)OR^{bb}, -S(O)R^{aa}, -S(O)₂R^{aa}, -NR^{aa}S(O)R^{bb}, -C(O)NR^{aa}S(O)R^{bb}, -NR^{aa}S(O)₂R^{bb}, -C(O)NR^{aa}S(O)₂R^{bb}, -S(O)NR^{aa}R^{bb}, -S(O)₂NR^{aa}R^{bb}, -P(O)(OR^{aa})(OR^{bb}), гетероциклил, гетероарил или арил, где алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, гетероциклил, гетероарил и арил, каждый независимо, необязательно замещен -R^{cc}, где -R^{aa} и -R^{bb} каждый независимо представляет собой -H, алкил, алкенил, алкинил, гетероциклил, гетероарил или арил, или -R^{aa} и -R^{bb} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклил, который необязательно замещен алкилом, алкенилом, алкинилом, галогеном, гидроксилем, алкокси или -CN, и где каждый -R^{cc} представляет собой независимо алкил, алкенил, алкинил, галоген, гетероциклил, гетероарил, арил, -CN, или -NO₂.

Согласно определенным вариантам осуществления -L²- представляет собой химическую связь. Согласно определенным вариантам осуществления -L²- представляет собой спейсерный фрагмент.

Согласно определенным вариантам осуществления -L²- выбрано из группы, состоящей из -T-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{y1})-, -S(O)₂N(R^{y1})-, -S(O)N(R^{y1})-, -S(O)₂-, -

S(O)-, $-N(R^{y1})S(O)_2N(R^{y1a})-$, $-S-$, $-N(R^{y1})-$, $-OC(OR^{y1})(R^{y1a})-$, $-N(R^{y1})C(O)N(R^{y1a})-$, $-OC(O)N(R^{y1})-$, C₁₋₅₀ алкила, C₂₋₅₀ алкенила и C₂₋₅₀ алкинила, где -Т-, C₁₋₅₀ алкил, C₂₋₅₀ алкенил и C₂₋₅₀ алкинил необязательно замещены одним или несколькими -R^{y2}, которые являются одинаковыми или различными, и где C₁₋₅₀ алкил, C₂₋₅₀ алкенил и C₂₋₅₀ алкинил необязательно прерываются одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из -Т-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{y3})-, -S(O)₂N(R^{y3})-, -S(O)N(R^{y3})-, -S(O)₂-, -S(O)-, -N(R^{y3})S(O)₂N(R^{y3a})-, -S-, -N(R^{y3})-, -OC(OR^{y3})(R^{y3a})-, -N(R^{y3})C(O)N(R^{y3a})- и -OC(O)N(R^{y3})-,

-R^{y1} и -R^{y1a} независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из -H, -Т, C₁₋₅₀ алкила, C₂₋₅₀ алкенила и C₂₋₅₀ алкинила, где -Т, C₁₋₅₀ алкил, C₂₋₅₀ алкенил и C₂₋₅₀ алкинил необязательно замещены одним или несколькими -R^{y2}, которые являются одинаковыми или различными, и где C₁₋₅₀ алкил, C₂₋₅₀ алкенил и C₂₋₅₀ алкинил необязательно прерываются одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из -Т-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{y4})-, -S(O)₂N(R^{y4})-, -S(O)N(R^{y4})-, -S(O)₂-, -S(O)-, -N(R^{y4})S(O)₂N(R^{y4a})-, -S-, -N(R^{y4})-, -OC(OR^{y4})(R^{y4a})-, -N(R^{y4})C(O)N(R^{y4a})- и -OC(O)N(R^{y4})-,

каждый Т независимо выбран из группы, состоящей из фенила, нафтила, инденила, инданила, тетралина, C₃₋₁₀ циклоалкил, 3-10-ти членного гетероцикла, 8-11-ти членного гетеробипоцикла, 8-30-ти членного карбополицикла и 8-30-ти членного гетерополицикла, где каждый Т независимо необязательно замещен одним или несколькими -R^{y2}, которые являются одинаковыми или различными,

каждый -R^{y2} независимо выбран из группы, состоящей из галогена, -CN, оксо (=O), -COOR^{y5}, -OR^{y5}, -C(O)R^{y5}, -C(O)N(R^{y5}R^{y5a}), -S(O)₂N(R^{y5}R^{y5a}), -S(O)N(R^{y5}R^{y5a}), -S(O)₂R^{y5}, -S(O)R^{y5}, -N(R^{y5})S(O)₂N(R^{y5a}R^{y5b}), -SR^{y5}, -N(R^{y5}R^{y5a}), -NO₂, -OC(O)R^{y5}, -N(R^{y5})C(O)R^{y5a}, -N(R^{y5})S(O)₂R^{y5a}, -N(R^{y5})S(O)R^{y5a}, -N(R^{y5})C(O)OR^{y5a}, -N(R^{y5})C(O)N(R^{y5a}R^{y5b}), -OC(O)N(R^{y5}R^{y5a}) и C₁₋₆ алкил, где C₁₋₆ алкил независимо замещен одним или несколькими галогенами, которые являются одинаковыми или различными, и

каждый -R^{y3}, -R^{y3a}, -R^{y4}, -R^{y4a}, -R^{y5}, -R^{y5a} и -R^{y5b} независимо выбран из группы, состоящей из -H и C₁₋₆ алкил, где C₁₋₆ алкил независимо необязательно замещен одним или несколькими галогенами, которые являются одинаковыми или различными.

Согласно определенным вариантам осуществления -L²- выбрано из группы, состоящей из -Т-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{y1})-, -S(O)₂N(R^{y1})-, -S(O)N(R^{y1})-, -S(O)₂-, -S(O)-, -N(R^{y1})S(O)₂N(R^{y1a})-, -S-, -N(R^{y1})-, -OC(OR^{y1})(R^{y1a})-, -N(R^{y1})C(O)N(R^{y1a})-, -OC(O)N(R^{y1})-, C₁₋₅₀ алкила, C₂₋₅₀ алкенила и C₂₋₅₀ алкинила, где -Т-, C₁₋₂₀ алкил, C₂₋₂₀ алкенил и C₂₋₂₀ алкинил необязательно замещены одним или несколькими -R^{y2}, которые

являются одинаковыми или различными, и где C_{1-20} алкил, C_{2-20} алкенил и C_{2-20} алкинил необязательно прерываются одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из -Т-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{y3})-, -S(O)₂N(R^{y3})-, -S(O)N(R^{y3})-, -S(O)₂-, -S(O)-, -N(R^{y3})S(O)₂N(R^{y3a})-, -S-, -N(R^{y3})-, -OC(OR^{y3})(R^{y3a})-, -N(R^{y3})C(O)N(R^{y3a})- и -OC(O)N(R^{y3})-,

-R^{y1} и -R^{y1a} независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из -H-, -Т-, C_{1-10} алкила, C_{2-10} алкенила и C_{2-10} алкинила, где -Т-, C_{1-10} алкил, C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил необязательно замещены одним или несколькими -R^{y2}, которые являются одинаковыми или различными, и где C_{1-10} алкил, C_{2-10} алкенил и C_{2-10} алкинил необязательно прерываются одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из -Т-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{y4})-, -S(O)₂N(R^{y4})-, -S(O)N(R^{y4})-, -S(O)₂-, -S(O)-, -N(R^{y4})S(O)₂N(R^{y4a})-, -S-, -N(R^{y4})-, -OC(OR^{y4})(R^{y4a})-, -N(R^{y4})C(O)N(R^{y4a})- и -OC(O)N(R^{y4})-,

каждый Т независимо выбран из группы, состоящей из фенила, нафтила, инденила, инданила, тетралинила, C_{3-10} циклоалкил, 3-10-ти членного гетероцикла, 8-11-ти членного гетеробипцикла, 8-30-ти членного карбополицикла и 8-30-ти членного гетерополицикла, где каждый Т независимо необязательно замещен одним или несколькими -R^{y2}, которые являются одинаковыми или различными,

-R^{y2} выбрано из группы, состоящей из галогена, -CN, оксо (=O), -COOR^{y5}, -OR^{y5}, -C(O)R^{y5}, -C(O)N(R^{y5}R^{y5a}), -S(O)₂N(R^{y5}R^{y5a}), -S(O)N(R^{y5}R^{y5a}), -S(O)₂R^{y5}, -S(O)R^{y5}, -N(R^{y5})S(O)₂N(R^{y5a}R^{y5b}), -SR^{y5}, -N(R^{y5}R^{y5a}), -NO₂, -OC(O)R^{y5}, -N(R^{y5})C(O)R^{y5a}, -N(R^{y5})S(O)₂R^{y5a}, -N(R^{y5})S(O)R^{y5a}, -N(R^{y5})C(O)OR^{y5a}, -N(R^{y5})C(O)N(R^{y5a}R^{y5b}), -OC(O)N(R^{y5}R^{y5a}) и C_{1-6} алкила, где C_{1-6} алкил независимо необязательно замещен одним или несколькими галогенами, которые являются одинаковыми или различными, и

каждый -R^{y3}, -R^{y3a}, -R^{y4}, -R^{y4a}, -R^{y5}, -R^{y5a} и -R^{y5b} независимо друг от друга выбран из группы, состоящей из -H и C_{1-6} алкила, где C_{1-6} алкил независимо необязательно замещен одним или несколькими галогенами, которые являются одинаковыми или различными.

Согласно определенным вариантам осуществления -L²- выбрано из группы, состоящей из -Т-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{y1})-, -S(O)₂N(R^{y1})-, -S(O)N(R^{y1})-, -S(O)₂-, -S(O)-, -N(R^{y1})S(O)₂N(R^{y1a})-, -S-, -N(R^{y1})-, -OC(OR^{y1})(R^{y1a})-, -N(R^{y1})C(O)N(R^{y1a})-, -OC(O)N(R^{y1})-, C_{1-50} алкила, C_{2-50} алкенила и C_{2-50} алкинила, где -Т-, C_{1-50} алкил, C_{2-50} алкенил и C_{2-50} алкинил необязательно замещены одним или несколькими -R^{y2}, которые являются одинаковыми или различными, и где C_{1-50} алкил, C_{2-50} алкенил и C_{2-50} алкинил необязательно прерываются одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из -Т-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{y3})-,

$-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{y3})-$, $-\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{y3})-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})-$, $-\text{N}(\text{R}^{y3})\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{y3a})-$, $-\text{S}-$, $-\text{N}(\text{R}^{y3})-$,
 $-\text{OC}(\text{OR}^{y3})(\text{R}^{y3a})-$, $-\text{N}(\text{R}^{y3})\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{y3a})-$ и $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{y3})-$,

$-\text{R}^{y1}$ и $-\text{R}^{y1a}$ независимо выбраны из группы, состоящей из $-\text{H}$, $-\text{T}$, C_{1-10} алкила, C_{2-10} алкенила и C_{2-10} алкинила,

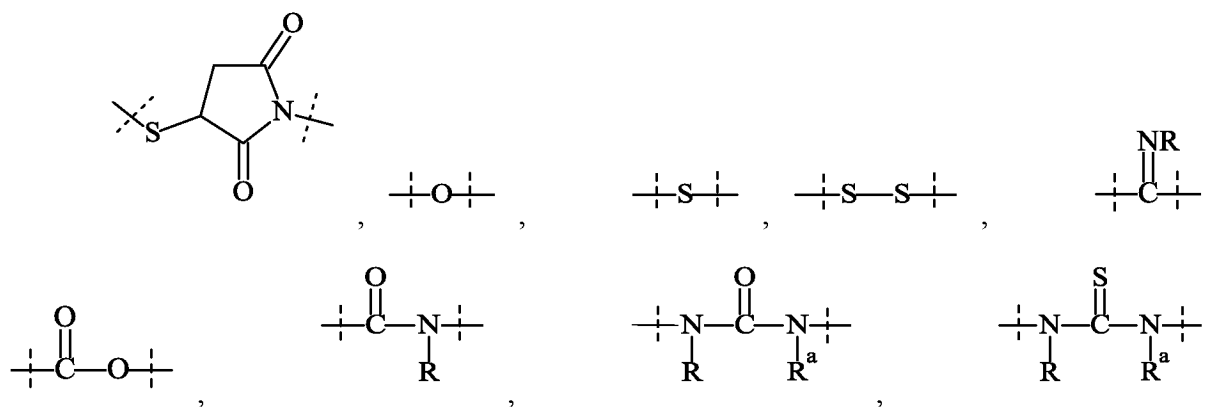
каждый T независимо выбран из группы, состоящей из фенила, нафтила, инденила, инданила, тетралина, C_{3-10} циклоалкил, 3-10-ти членного гетероцикла, 8-11-ти членного гетеробикалика, 8-30-ти членного карбополицикла и 8-30-ти членного гетерополицикла,

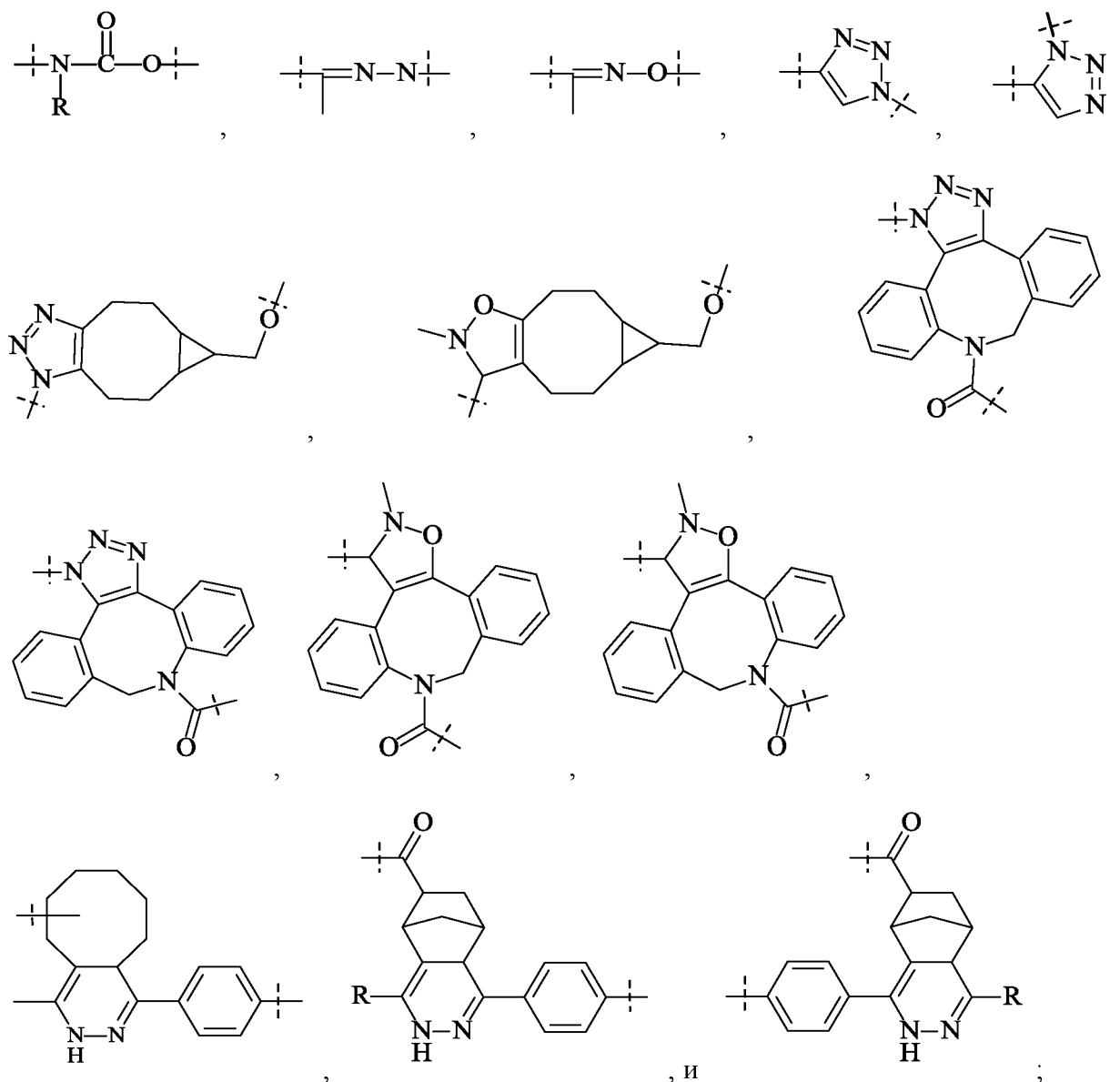
каждый $-\text{R}^{y2}$ независимо выбран из группы, состоящей из галогена и C_{1-6} алкила, и каждый $-\text{R}^{y3}$, $-\text{R}^{y3a}$, $-\text{R}^{y4}$, $-\text{R}^{y4a}$, $-\text{R}^{y5}$, $-\text{R}^{y5a}$ и $-\text{R}^{y5b}$ независимо друг от друга выбран из группы, состоящей из $-\text{H}$ и C_{1-6} алкила, где C_{1-6} алкил независимо необязательно замещен одним или несколькими галогенами, которые являются одинаковыми или различными.

Согласно определенным вариантам осуществления $-\text{L}^2$ -представляет собой C_{1-20} алкильную цепь, которая необязательно прерывается одной или более группами, независимо выбранными из $-\text{O}-$, $-\text{T}$ -и $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{y1})-$; и где C_{1-20} алкильная цепь, необязательно замещена одной или более группами, независимо выбранными из $-\text{OH}$, $-\text{T}$ и $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{y6}\text{R}^{y6a})$; где $-\text{R}^{y1}$, $-\text{R}^{y6}$, $-\text{R}^{y6a}$ независимо выбраны из группы, состоящей из H и C_{1-4} алкила, и где T выбран из группы, состоящей из фенила, нафтила, инденила, инданила, тетралина, C_{3-10} циклоалкила, 3-10-ти членного гетероцикла, 8-11-ти членного гетеробикалика, 8-30-ти членного карбополицикла, и 8-30-ти членного гетерополицикла.

Согласно определенным вариантам осуществления $-\text{L}^2$ -имеет молекулярную массу в интервале от 14 г/моль до 750 г/моль.

Согласно определенным вариантам осуществления $-\text{L}^2$ -содержит фрагмент, выбранный из группы, состоящей из



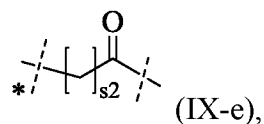


где

пунктирная линия указывает присоединение к $-L^1-$, оставшуюся часть $-L^2-$ -или к $-Z$, соответственно; и

$-R$ и $-R^a$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из $-H$, метила, этила, пропила, бутила, пентила и гексила.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^2-$ имеет формулу (IX-e)



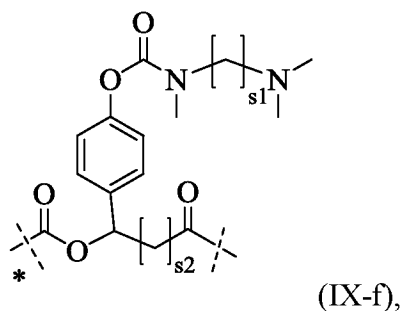
где

пунктирная линия, помеченная звездочкой, указывает присоединение к $-L^1-$; непомеченная пунктирная линия указывает присоединение к $-Z$; и

s_2 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20.

Согласно определенным вариантам осуществления s_2 формулы (IX-e) представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12. Согласно определенным вариантам осуществления s_2 формулы (IX-e) представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8. Согласно определенным вариантам осуществления s_2 формулы (IX-e) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления s_2 формулы (IX-e) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления s_2 формулы (IX-e) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления s_2 формулы (IX-e) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления s_2 формулы (IX-e) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления s_2 формулы (IX-e) представляет собой 6. Согласно определенным вариантам осуществления s_2 формулы (IX-e) представляет собой 7. Согласно определенным вариантам осуществления s_2 формулы (IX-e) представляет собой 8.

Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент $-L^1-L^2-$ имеет формулу (IX-f)



где

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота -D,

неотмеченная пунктирная линия показывает присоединение к -Z,

s_1 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и

s_2 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1-L^2-$ имеет формулу (IX-f), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина лизиновой боковой цепи или N-конца -D.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1-L^2-$ имеет формулу (IX-f), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина лизиновой боковой цепи -D.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1-L^2-$ имеет формулу (IX-f), где пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота амина N-конца -D.

Соответственно, связь между фрагментом $-L^1-$ и -D, образованная в соединении формулы (IX-f), представляет собой карбамат.

Согласно определенным вариантам осуществления $s1$ формулы (IX-f) представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4 и 5. Согласно определенным вариантам осуществления $s1$ формулы (IX-f) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления $s1$ формулы (IX-f) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления $s1$ формулы (IX-f) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления $s1$ формулы (IX-f) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления $s1$ формулы (IX-f) представляет собой 5.

Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (IX-f) представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (IX-f) представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (IX-f) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (IX-f) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (IX-f) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (IX-f) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (IX-f) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (IX-f) представляет собой 6. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (IX-f) представляет собой 7. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (IX-f) представляет собой 8.

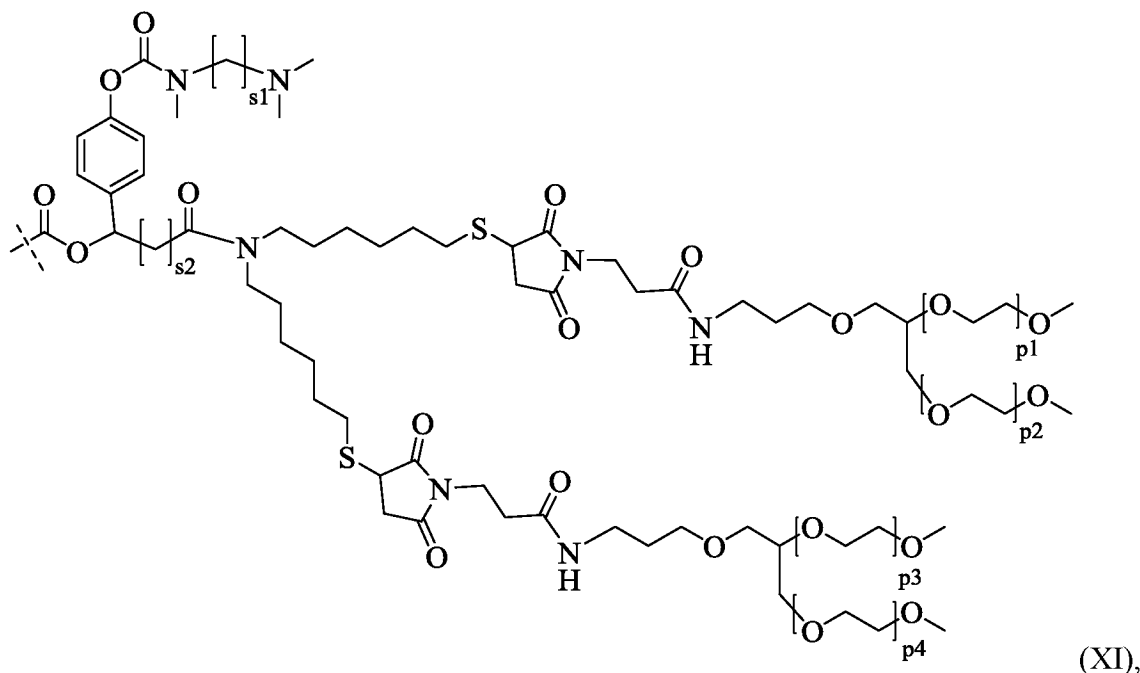
Согласно определенным вариантам осуществления $s1$ формулы (IX-f) представляет собой 3 и $s2$ формулы (IX-f) представляет собой 3.

Согласно одному варианту осуществления конъюгат II-2 имеет формулу (Ia). Согласно определенным вариантам осуществления x представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления x представляет собой 2. Согласно определенным

вариантам осуществления x представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления x представляет собой 4.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат IL-2 имеет формулу (Ib). Согласно определенным вариантам осуществления y представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления y представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления y представляет собой 4.

Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент $-L^1-L^2-Z$ имеет формулу (XI)



где пунктирная линия показывает присоединение к атому азота $-D$,

$s1$ представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10,

$s2$ представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20, и

$p1$, $p2$, $p3$, $p4$ независимо друг от друга представляют собой целое число в интервале от 70 до 900.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1-L^2-Z$ имеет формулу (XI), где пунктирная линия показывает присоединение к атому азота амина лизиновой боковой цепи или N-конца $-D$.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1-L^2-Z$ имеет формулу (XI), где пунктирная линия показывает присоединение к атому азота амина лизиновой боковой цепи $-D$.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1-L^2-Z$ имеет формулу (XI), где пунктирная линия показывает присоединение к атому азота амина N-конца $-D$.

Соответственно, связь между фрагментами $-L^1-$ и $-D$, образованная в соединении формулы (XI), представляет собой карбамат.

Согласно определенным вариантам осуществления $s1$ формулы (XI) представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4 и 5. Согласно определенным вариантам осуществления $s1$ формулы (XI) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления $s1$ формулы (XI) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления $s1$ формулы (XI) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления $s1$ формулы (XI) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления $s1$ формулы (XI) представляет собой 5.

Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (XI) представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (XI) представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (XI) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (XI) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (XI) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (XI) представляет собой 4. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (XI) представляет собой 5. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (XI) представляет собой 6. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (XI) представляет собой 7. Согласно определенным вариантам осуществления $s2$ формулы (XI) представляет собой 8.

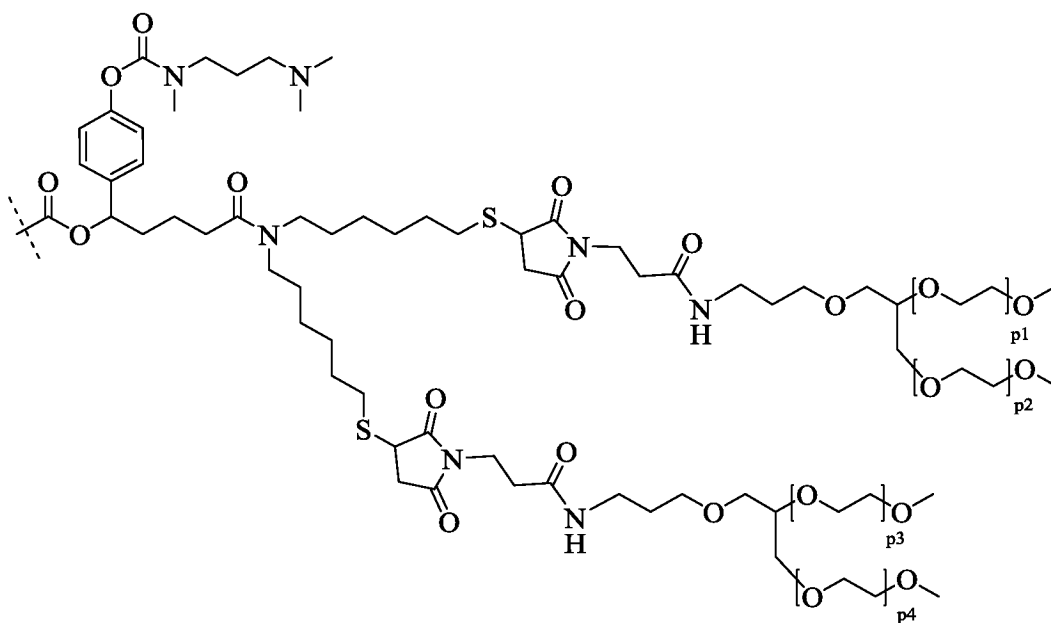
Согласно определенным вариантам осуществления $s1$ формулы (XI) представляет собой 3 и $s2$ формулы (XI) представляет собой 3.

Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI) представляет собой целое число в интервале от 115 до 680. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI) представляет собой целое число в интервале от 115 до 560. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI) представляет собой целое число в интервале от 185 до 450. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI) представляет собой целое число в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI) представляет собой около 115. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI) представляет собой около 160. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI) представляет собой около 225. Согласно определенным вариантам

Согласно определенным вариантам осуществления p_4 формулы (XI) представляет собой целое число в интервале от 115 до 680. Согласно определенным вариантам осуществления p_4 формулы (XI) представляет собой целое число в интервале от 115 до 560. Согласно определенным вариантам осуществления p_4 формулы (XI) представляет собой целое число в интервале от 185 до 450. Согласно определенным вариантам осуществления p_4 формулы (XI) представляет собой целое число в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления p_4 формулы (XI) представляет собой около 115. Согласно определенным вариантам осуществления p_4 формулы (XI) представляет собой около 160. Согласно определенным вариантам осуществления p_4 формулы (XI) представляет собой около 225. Согласно определенным вариантам осуществления p_4 формулы (XI) представляет собой около 270. Согласно определенным вариантам осуществления p_4 формулы (XI) представляет собой около 340. Согласно определенным вариантам осуществления p_4 формулы (XI) представляет собой около 450. Согласно определенным вариантам осуществления p_4 формулы (XI) представляет собой около 560.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 формулы (XI) и p_4 являются идентичными. Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент $-L^1-L^2-Z$ имеет формулу (XI-a)



(XI-a),

где пунктирная линия показывает присоединение к атому азота -D, и p_1 , p_2 , p_3 , p_4 независимо друг от друга представляют собой целое число в интервале от 70 до 900.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1-L^2-Z$ имеет формулу (XI-a), где пунктирная линия показывает присоединение к атому азота амина лизиновой боковой цепи или N-конца -D.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1-L^2-Z$ имеет формулу (XI-a), где пунктирная линия показывает присоединение к атому азота амина лизиновой боковой цепи -D.

Согласно определенным вариантам осуществления $-L^1-L^2-Z$ имеет формулу (XI-a), где пунктирная линия показывает присоединение к атому азота амина N-конца -D.

Соответственно, связь между фрагментами $-L^1-$ и $-D$, образованная в соединении формулы (XI-a), представляет собой карбамат.

Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI-a) представляет собой целое число в интервале от 115 до 680. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI-a) представляет собой целое число в интервале от 115 до 560. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI-a) представляет собой целое число в интервале от 185 до 450. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI-a) представляет собой целое число в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI-a) представляет собой около 115. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI-a) представляет собой около 160. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI-a) представляет собой около 225. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI-a) представляет собой около 270. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI-a) представляет собой около 340. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI-a) представляет собой около 450. Согласно определенным вариантам осуществления $p1$ формулы (XI-a) представляет собой около 560.

Согласно определенным вариантам осуществления $p2$ формулы (XI-a) представляет собой целое число в интервале от 115 до 680. Согласно определенным вариантам осуществления $p2$ формулы (XI-a) представляет собой целое число в интервале от 115 до 560. Согласно определенным вариантам осуществления $p2$ формулы (XI-a) представляет собой целое число в интервале от 185 до 450. Согласно определенным вариантам осуществления $p2$ формулы (XI-a) представляет собой целое число в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления $p2$ формулы (XI-a) представляет собой около 115. Согласно определенным вариантам осуществления $p2$ формулы (XI-a) представляет собой около 160. Согласно определенным вариантам осуществления $p2$ формулы (XI-a) представляет собой около 225. Согласно определенным вариантам

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 формулы (XI-a) и p_4 являются идентичными. Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:14, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:14, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:14, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:14, с которым

фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:14, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:14, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:14, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота

первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:14, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат IL-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:14, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:14, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:13, с которым

фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:13, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:13, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:13, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным

вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:13, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:13, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:13, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:13, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2

представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат IL-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:13, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:13, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:22, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным

вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:22, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:22, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:22, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:22, с которым

фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:22, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат IL-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:22, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:22, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:22, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:22, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:23, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:23, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:23, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:23, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:23, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a)

конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:23, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:23, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:23, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат IL-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:23, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:23, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:24, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:24, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a)

конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:24, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:24, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:24, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:24, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:24, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:24, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:24, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2

представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:24, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:25, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:25, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:25, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:25, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:25, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:25, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a)

конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:25, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:25, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:25, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:25, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:26, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:26, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:26, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число

в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:26, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:26, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:26, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам

осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:26, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:26, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:26, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:26, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до

125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:27, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:27, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:27, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам

осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:27, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:27, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:27, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:27, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:27, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат IL-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:27, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:27, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:28, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:28, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:28, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:28, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:28, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:28, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:28, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2

представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:28, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат IL-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:28, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:28, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:29, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:29, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:29, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:29, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a)

конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:29, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:29, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:29, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:29, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат IL-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:29, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:29, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:30, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число

в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:30, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:30, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:30, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам

осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:30, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:30, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:30, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:30, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до

125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:30, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:30, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:31, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам

осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:31, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:31, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:31, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:31, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38,

где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:31, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:31, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:31, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам

осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:31, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:31, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:32, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:32, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38,

где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:32, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:32, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:32, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам

осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:32, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:32, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:32, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:32, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:32, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:33, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:33, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным

вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:33, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:33, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:33, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:33, с которым

фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:33, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:33, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:33, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота

первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:33, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:34, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:34, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:34, с которым

фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:34, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:34, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:34, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным

вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:34, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:34, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:34, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:34, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2

представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:35, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:35, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:35, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным

вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:35, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:35, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:35, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:35, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:35, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат IL-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:35, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:35, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:36, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:36, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:36, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:36, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:36, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:36, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:36, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2

представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:36, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат IL-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:36, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:36, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:37, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:37, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:37, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:37, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a)

конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:37, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:37, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:37, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:37, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат IL-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:37, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:37, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:38, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число

в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:38, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:38, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент IL-2 последовательности SEQ ID NO:38, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом IL-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента IL-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам

осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:38, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:38, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:38, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:38, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до

125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:38, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:38, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:39, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 2 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам

осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:39, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1a) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:39, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:39, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:39, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38,

где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению содержит фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:39, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 3 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240. Согласно определенным вариантам осуществления b_3 составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:39, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:39, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b_1 представляет собой 2, b_2 представляет собой 2 и b_3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p_1 , p_2 , p_3 и p_4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам

осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат II-2 присутствует в виде смеси, где смесь содержит

(i) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:39, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1d) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240, и

(ii) по меньшей мере один конъюгат, содержащий фрагмент II-2 последовательности SEQ ID NO:39, с которым фрагмент M_{mod} формулы (A-1e) конъюгирован с атомом серы цистеина в положении 38, где b1 представляет собой 2, b2 представляет собой 3 и b3 представляет собой целое число в интервале от около 100 до 125, и с этим фрагментом II-2 фрагмент формулы (XI-a) конъюгирован с атомом азота первичного амина N-конца или лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2 и p1, p2, p3 и p4 в интервале от 220 до 240.

Согласно определенным вариантам осуществления p1, p2, p3 и p4 в каждом конъюгате смеси составляет около 112. Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент формулы (XI-a) каждого конъюгата смеси конъюгирован с атомом азота первичного амина лизинового остатка боковой цепи фрагмента II-2.

Другим аспектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один белок II-2 формулы (I) или по меньшей мере один конъюгат II-2, содержащий по меньшей мере один белок II-2 формулы (I), как описано в настоящем документе, и по меньшей мере один эксципиент. Согласно определенным вариантам осуществления такая фармацевтическая композиция имеет рН в диапазоне от рН 3 до рН 8 включительно рН 8.

Согласно определенным вариантам осуществления такая фармацевтическая композиция представляет собой жидкий состав. Согласно определенным вариантам осуществления фармацевтическая композиция представляет собой сухой состав.

Такая жидкая или сухая фармацевтическая композиция фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере один эксципиент. Эксципиенты, применяемые в парентеральных композициях, могут быть разделены на категории следующим образом, например, буферные средства, модификаторы изотоничности, консерванты,

стабилизаторы, антиадсорбционные средства, средства защиты от окисления, загустители/вещества, увеличивающие вязкость, или другие вспомогательные средства. Однако, в некоторых случаях, один эксципиент может иметь двойные или тройные функции. Предпочтительно, по меньшей мере один эксципиент, содержащийся в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению выбирают из группы, состоящей из следующего:

(i) Буферные средства: физиологически допустимые буферы для поддержания значения pH в желаемом диапазоне, такие как фосфат натрия, бикарбонат, сукцинат, гистидин, цитрат и ацетат, сульфат, нитрат, хлорид, пируват; нейтролизаторы кислот, такие как $Mg(OH)_2$ или $ZnCO_3$ также могут применяться;

(ii) Модификаторы изотоничности: чтобы минимизировать боль, которая может стать результатом повреждения клеток в ходе разности осмотического давления при инъекции веществ замедленного всасывания; глицерин и хлорид натрия являются примерами; эффективные концентрации могут быть определены осмометрией, применяя допускаемую осмотическую концентрацию раствора, равную 285-315 мОсмоль/кг для сыворотки;

(iii) Консерванты и/или противомикробные средства: мультидозные парентеральные композиции требуют добавления консервантов при достаточной концентрации, чтобы минимизировать риск заражения пациента при инъекции, и соответствующие регулирующие требования должны быть установлены; типичные консерванты включают м-крезол, фенол, метилпарабен, этилпарабен, пропилпарабен, бутилпарабен, хлорбутанол, бензиловый спирт, фенилртути нитрат, тимерозол, сорбиновую кислоту, сорбат калия, бензойную кислоту, хлоркрезол, и бензалкония хлорид;

(iv) Стабилизаторы: Стабилизация достигается за счет усиления стабилизирующих белок сил, дестабилизации денатурированного состояния или прямого связывания эксципиентов с белком; стабилизаторами могут быть аминокислоты, такие как аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, глицин, гистидин, лизин, пролин, сахара, такие как глюкоза, сахароза, трегалоза, полиолы, такие как глицерин, маннит, сорбит, соли, такие как фосфат калия, сульфат натрия, хелатирующие средства, такие как EDTA, гексафосфат, лиганды, такие как ионы двухвалентного металла (цинк, кальций и т.д.), другие соли или органические молекулы, такие как фенольные производные; кроме того, могут быть использованы олигомеры или полимеры, такие как циклодекстрины, декстран, дендримеры, ПЭГ или ПВП или протамин или HSA;

(v) Антиадсорбционные средства: В основном ионные или неионные поверхностно-активные вещества или другие белки или растворимые полимеры применяются для покрытия или конкурентным образом адсорбируются на внутренней поверхности контейнера композиции. Например, полуксамер (Pluronic F-68), ПЭГ додециловый простой эфир (Brij 35), полисорбат 20 и 80, декстран, полиэтиленгликоль, ПЭГ-полигистидин, BSA и HSA и желатины; выбранная концентрация и тип эксципиента зависит от эффекта, которого следует избегать, но обычно монослой поверхностно-активного вещества образуется на границе раздела фаз чуть выше значения СМС;

(vi) Средства защиты от окисления: антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, эктоин, метионин, глутатион, монотиоглицерин, морин, полиэтиленмин (PEI), пропилгаллат и витамин Е; хелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, EDTA, гексафосфат и тиогликолевая кислота, также могут применяться;

(vii) Загустители или вещества, увеличивающие вязкость: замедляют осаждение частиц во флаконе и шприце и используются для облегчения смешивания и ресуспендирования частиц и для облегчения введения суспензии (т.е. с малой силой на шприцевом поршне); подходящими загустителями или усилителями вязкости являются, например, карбомерные загустители, такие как Carbopol 940, Carbopol Ultrez 10, производные целлюлозы, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза (гипромеллоза, НРМС) или диэтиламиноэтилцеллюлоза (DEAE или DEAE-C), коллоидный силикат магния (Veegum) или силикат натрия, гидроксиапатитный гель, трикальцийфосфатный гель, ксантаны, каррагинаны, такие как камедь Satia UTC 30, алифатические поли(гидроксикислоты), как например поли(D, L-или L-молочная кислота) (PLA) и поли(гликолевая кислота) (PGA) и их сополимеры (PLGA), терполимеры D, L-лактида, гликолида и капролактона, полуксамеры, гидрофильные поли(оксиэтиленовые) блоки и гидрофобные поли(оксипропиленовые) блоки для создания триблока поли(оксиэтилен)-поли(оксипропилен)-поли(оксиэтилен) (например, Pluronic®), сополимер простого полиэфира и сложного полиэфира, как например сополимер терефталат полиэтиленгликоля/терефталат полибутилена, сахарозы ацетат изобутират (SAIB), декстран или его производные, комбинации декстранов и ПЭГ, полидиметилсилоксан, коллаген, хитозан, поливиниловый спирт (PVA) и производные, полиалкилимиды, поли(акриламид-со-диаллилдиметиламмоний (DADMA)), поливинилпирролидон (ПВП), глюкозаминогликаны (GAG), такие как дерматан сульфат, хондроитин сульфат, кератан сульфат, гепарин, гепаран сульфат, гиалуронан, АВА триблок-или АВ блок-сополимеры, состоящие из гидрофобных А-блоков, как например, полилактид (PLA) или поли(лактид-со-гликолид) (PLGA) и гидрофильные В-блоки, как например полиэтиленгликоль (ПЭГ)

или поливинилпирролидон; такие блок-сополимеры, как и вышеупомянутые поллоксамеры, могут проявлять обратимое термическое гелеобразование (состояние жидкости при комнатной температуре для облегчения введения и состояние геля выше температуры перехода золь-гель при температуре тела после инъекции);

(viii) Лиофилизирующий или диффундирующий агент: модифицирует проницаемость соединительной ткани посредством гидролиза компонентов внеклеточного матрикса во интерстициальном пространстве, таких как, но без ограничения к этому, гиалуроновая кислота, полисахарид, обнаруженные в межклеточном пространстве соединительной ткани; лиофилизирующий агент, такой как, но без ограничения к этому, гиалуронидаза, временно снижает вязкость внеклеточной матрицы и способствует диффузии инъецированных лекарственных средств; и

(ix) Другие вспомогательные средства: такие как смачивающие средства, модификаторы вязкости, антибиотики, гиалуронидаза; кислоты и основания, такие как соляная кислота и гидроксид натрия являются вспомогательными средствами, необходимыми для установления значения pH в ходе получения.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к белку PL-2 формулы (I), конъюгату PL-2, содержащему по меньшей мере один белок PL-2 формулы (I), или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один белок PL-2 формулы (I) или по меньшей мере один конъюгат PL-2, содержащий по меньшей мере один белок PL-2 формулы (I), для применения в качестве лекарственного средства.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к белку PL-2 формулы (I), конъюгату PL-2, содержащему по меньшей мере один белок PL-2 формулы (I), или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один белок PL-2 формулы (I) или по меньшей мере один конъюгат PL-2, содержащий по меньшей мере один белок PL-2 формулы (I), для применения для лечения заболевания, которое можно лечить с помощью PL-2.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к белку PL-2 формулы (I), конъюгату PL-2, содержащему по меньшей мере один белок PL-2 формулы (I), или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один белок PL-2 формулы (I) или по меньшей мере один конъюгат PL-2, содержащий по меньшей мере один белок PL-2 формулы (I), для получения лекарственного средства лечения заболевания, которое можно лечить с помощью PL-2.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения, контроля, отсрочки или предотвращения у пациента-млекопитающего, предпочтительно пациента-человека, нуждающегося в лечении, одного или нескольких заболеваний,

которые можно лечить с помощью IL-2, включающему стадию введения указанному пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества белка IL-2 формулы (I), конъюгата IL-2, содержащего по меньшей мере один белок IL-2 формулы (I), или фармацевтической композиции по меньшей мере одного белка IL-2 формулы (I) или по меньшей мере одного конъюгата IL-2, содержащего по меньшей мере один белок IL-2 формулы (I).

Согласно определенным вариантам осуществления заболевание, которое можно лечить с помощью IL-2, представляет собой рак. Такой рак может быть выбран из группы, состоящей из жидких опухолей, солидных опухолей и лимфом.

Опухоль лимфатической ткани может быть лейкоз или миелоидная неоплазма, как например, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелобластный лейкоз (CML), волосатоклеточный лейкоз, лимфобластный лейкоз, миелоидный лейкоз, лейкоз клеток плазмы, острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), миелопролиферативное новообразование (MPN), пост- MPN AML, пост- MDS AML, del(5q)- ассоциированный MDS высокого риска или AML, хронический миелобластный лейкоз бластной фазы, множественная миелома, миелодиспластический синдром, хронические миелопролиферативные нарушения, плазмноклеточная опухоль и макроглобулинемия Вальденстрёма.

Солитарная опухоль или лимфома могут быть выбраны из группы, состоящей из рака губ и полости рта, рака полости рта, рака печени/печеночноклеточного рака, первичного рака печени, рака легкого, лимфомы, злокачественной мезотелиомы, злокачественной тимомы, рака кожи, интраокулярной меланомы, метастатического плоскоклеточного рака шеи с первичной латентностью, синдрома множественной эндокринной неоплазии у детей, фунгоидного микоза, рака придаточных пазух носа и полости носа, рака носоглотки, нейробластомы, рака ротоглотки, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака паращитовидных желёз, феохромобластомы, опухоли гипофиза, аденокарциномы, связанных со СПИДом злокачественных новообразований, рака анального канала, рака желчного протока, рака мочевого пузыря, рака головного мозга и нервной системы, рак молочной железы, аденомы бронха/карциноида, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта, карциномы, колоректального рака, рака эндометрия, рака пищевода, экстракраниальной герминогенной опухоли, внегонадной гоноцитомы, внепечёночного рака желчного протока, рака желчного пузыря, желудочного рака (желудка), гестационной трофобластической опухоли, рака головы и шеи, гипоглоточного рака, карциномы островковых клеток (эндокринной части поджелудочной железы), рака почки/почечно-

клеточного рака, рака гортани, плеврорлёгочной бластомы, рака предстательной железы, переходно-клеточного рака почечной лоханки и мочеточника, ретинобластомы, рака слюнных желёз, саркомы, синдрома Сезари, рака тонкой кишки, рака мочеполовой системы, злокачественной тимомы, рака щитовидной железы, опухоли Вильмса, холангиокарциномы, а также связанных с ними более ранних стадий аберрантного роста клеток, таких как дисплазии, аденомы и карцинома *in situ*.

Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак печени/печеночноклеточный рак. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак легкого. Согласно определенным вариантам осуществления раком является лимфома. Согласно определенным вариантам осуществления раком является злокачественная тимома. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак кожи. Согласно определенным вариантам осуществления раком является метастатический плоскоклеточный рак шеи с первичной латентностью. Согласно определенным вариантам осуществления раком является нейробластома. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак яичников. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак поджелудочной железы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак желчного протока. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак мочевого пузыря. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак головного мозга и нервной системы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак молочной железы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта. Согласно определенным вариантам осуществления раком является карцинома. Согласно определенным вариантам осуществления раком является колоректальный рак. Согласно определенным вариантам осуществления раком является внепечёночный рак желчного протока. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак желчного пузыря. Согласно определенным вариантам осуществления раком является желудочный рак (желудка). Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак головы и шеи. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак почки/почечно-клеточный рак. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак предстательной железы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является саркома. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак тонкой кишки. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак мочеполовой системы.

Примерами рака легкого являются немелкоклеточный рак легкого и мелкоклеточный рак легкого. Согласно определенным вариантам осуществления раком является немелкоклеточный рак легкого. Согласно определенному варианту осуществления раком является мелкоклеточный рак легкого.

Примером лимфомы являются лимфома, связанная со СПИДом, первичная лимфома центральной нервной системы, Т-клеточная лимфома, кожная Т-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина, лимфома Ходжкина во время беременности, неходжкинская лимфома, неходжкинская лимфома во время беременности и ангиоиммунобластная лимфома.

Примерами рака кожи являются меланома и карцинома из клеток Меркеля. Согласно определенному варианту осуществления раком является рак кожи. Согласно определенному варианту осуществления раком является карцинома из клеток Меркеля.

Рак яичников может представлять собой, например, эпителиальный рак, гоноцитому или пограничную опухоль яичника. Согласно определенным вариантам осуществления раком является эпителиальный рак. Согласно определенным вариантам осуществления раком является гоноцитомой. Согласно определенным вариантам осуществления раком является пограничная опухоль яичника.

Рак поджелудочной железы может представлять собой, например, экзокринную опухоль/аденокарциному, эндокринную опухоль поджелудочной железы (ПЭТ) или нейроэндокринную опухоль (NET). Согласно определенным вариантам осуществления раком является экзокринная опухоль/аденокарцинома. Согласно определенным вариантам осуществления опухолью является эндокринная опухоль поджелудочной железы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является нейроэндокринная опухоль.

Примерами рака головного мозга и нервной системы являются медуллобластома, как например, медуллобластома у детей, астроцитомы, эпендимомы, нейроэктодермальные опухоли, невриномы, менингиомы, эозинофильная аденома и глиома. Согласно определенному варианту осуществления раком является медуллобластома. Согласно определенным вариантам осуществления раком является медуллобластома у детей. Согласно определенным вариантам осуществления раком является астроцитомой. Согласно определенным вариантам осуществления раком является нейроэктодермальной опухолью. Согласно определенным вариантам осуществления опухолью является невриномой. Согласно определенным вариантам осуществления раком является менингиомой. Согласно определенным вариантам осуществления раком является

эозинофильная аденома. Согласно определенным вариантам осуществления раком является глиома.

Астроцитомы могут быть выбраны из группы, состоящей из гигантоклеточной глиобластомы, глиобластомы, вторичной глиобластомы, первичной взрослой глиобластомы, первичной детской глиобластомы, олигодендроглиальной опухоли, олигодендроглиомы, анапластической олигодендроглиомы, олигоастроцитарной опухоли, олигоастроцитомы, анапластической олигоастроцитомы, анапластической астроцитомы, пилоидной астроцитомы, субэпендимальной гигантоклеточной астроцитомы, диффузной астроцитомы, плеоморфной ксантоастроцитомы и астроцитомы мозжечка.

Примерами нейроэктодермальной опухоли являются примитивная нейроэктодермальная опухоль пинеальной железы и супратенториальная примитивная нейроэктодермальная опухоль.

Эпендимома может быть выбрана из группы, состоящей из субэпендимомы, эпендимомы, миксопапиллярной эпендимомы и анапластической эпендимомы.

Менингиома может быть атипичной менингиомой или анапластической менингиомой.

Глиома может быть выбрана из группы, состоящей из мультиформной глиобластомы, параганглиомы, супрантенториальной примордиальной нейроэктодермальной опухоли (sPNET), глиомы ствола головного мозга, глиомы ствола головного мозга у детей, глиомы гипоталамуса и зрительного пути, глиомы гипоталамуса и зрительного пути у детей и злокачественной глиомы

Примерами рака молочной железы являются рак молочной железы во время беременности, тройной негативный рак молочной железы, протоковая карцинома *in situ* (DCIS), инвазивная протоковая карцинома (IDC), тубулярная карцинома молочной железы, медулярная карцинома молочной железы, мукоидная карцинома молочной железы, папиллярная карцинома молочной железы, криброзная карцинома молочной железы, инвазивная дольковая карцинома (ILC), воспалительный рак молочной железы, дольковая карцинома *in situ* (LCIS), мужской рак молочной железы, болезнь Педжета соска, филоидная опухоль молочной железы и метастатический рак молочной железы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак молочной железы во время беременности. Согласно определенным вариантам осуществления раком является тройной негативный рак молочной железы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является протоковая карцинома *in situ*. Согласно определенным вариантам осуществления раком является инвазивная протоковая карцинома. Согласно определенным вариантам осуществления раком является тубулярная карцинома молочной

железы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является медуллярная карцинома молочной железы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является мукоидная карцинома молочной железы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является папиллярная карцинома молочной железы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является крибозная карцинома молочной железы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является инвазивная дольковая карцинома. Согласно определенным вариантам осуществления раком является воспалительный рак молочной железы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является дольковая карцинома *in situ*. Согласно определенным вариантам осуществления раком является мужской рак молочной железы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является болезнь Педжета соска. Согласно определенным вариантам осуществления раком является филлоидная опухоль молочной железы. Согласно определенным вариантам осуществления раком является метастатический рак молочной железы.

Примерами карциномы являются нейроэндокринная карцинома, аденокортикальная карцинома и карцинома островковых клеток. Согласно определенным вариантам осуществления раком является нейроэндокринная карцинома. Согласно определенным вариантам осуществления раком является аденокортикальная карцинома. Согласно определенным вариантам осуществления раком является карцинома островковых клеток.

Примерами колоректального рака являются рак ободочной кишки и рак прямой кишки. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак ободочной кишки. Согласно определенным вариантам осуществления раком является рак прямой кишки.

Саркома может быть выбрана из группы, состоящей из саркомы Капоши, остеосаркомы/злокачественной фиброзной гистиоцитомы костей, саркомы мягких тканей, опухолей/сарком семейства Юнга, рабдомиосаркомы, светлоклеточной саркомы сухожильного влагалища, центральной хондросаркомы, центральной и надкостной хондромы, фибросаркомы и маточной саркомы. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть саркома Капоши. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть остеосаркома/злокачественная фиброзная гистиоцитома костей. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть саркома мягких тканей. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть опухоли/саркомы семейства Юнга. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть рабдомиосаркома. Согласно определенным вариантам осуществления

раком может быть светлоклеточная саркома сухожильного влагалища. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть центральная хондросаркома. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть центральная и надкостная хондрома. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть фибросаркома. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть маточная саркома.

Примерами рака мочеполовой системы являются тестикулярный рак, рак уретры, рак влагалища, рак шейки матки, рак полового члена и рак вульвы. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть тестикулярный рак. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть рак уретры. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть рак влагалища. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть рак шейки матки. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть рак полового члена. Согласно определенным вариантам осуществления раком может быть вагинальный рак

Неожиданно было обнаружено, что у яванских макаков П-2 по настоящему изобретению приводит к сильному увеличению $\gamma\delta$ Т-клеток по сравнению с исходным уровнем, отмеченному при дозах с минимальным увеличением эозинофилов, которые хорошо переносились.

Согласно определенным вариантам осуществления, белок П-2 формулы (I), конъюгат П-2 или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению приводит к увеличению $\gamma\delta$ Т-клеток по меньшей мере 100-кратно по сравнению с исходным уровнем. Согласно определенным вариантам осуществления, белок П-2 формулы (I), конъюгат П-2 или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению приводит к увеличению $\gamma\delta$ Т-клеток по меньшей мере 150-кратно по сравнению с исходным уровнем. Согласно определенным вариантам осуществления, белок П-2 формулы (I), конъюгат П-2 или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению приводит к увеличению $\gamma\delta$ Т-клеток по меньшей мере 200-кратно по сравнению с исходным уровнем. Согласно определенным вариантам осуществления, белок П-2 формулы (I), конъюгат П-2 или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению приводит к увеличению $\gamma\delta$ Т-клеток по меньшей мере 300-кратно по сравнению с исходным уровнем. Согласно определенным вариантам осуществления, белок П-2 формулы (I), конъюгат П-2 или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению приводит к увеличению $\gamma\delta$ Т-клеток по меньшей мере 350-кратно по сравнению с исходным уровнем.

Согласно определенным вариантам осуществления, белок II-2 формулы (I), конъюгат II-2 или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению приводит к увеличению $\gamma\delta 2$ Т-клеток по меньшей мере 100-кратно по сравнению с исходным уровнем. Согласно определенным вариантам осуществления, белок II-2 формулы (I), конъюгат II-2 или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению приводит к увеличению $\gamma\delta 2$ Т-клеток по меньшей мере 150-кратно по сравнению с исходным уровнем. Согласно определенным вариантам осуществления, белок II-2 формулы (I), конъюгат II-2 или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению приводит к увеличению $\gamma\delta 2$ Т-клеток по меньшей мере 200-кратно по сравнению с исходным уровнем. Согласно определенным вариантам осуществления, белок II-2 формулы (I), конъюгат II-2 или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению приводит к увеличению $\gamma\delta 2$ Т-клеток по меньшей мере 300-кратно по сравнению с исходным уровнем. Согласно определенным вариантам осуществления, белок II-2 формулы (I), конъюгат II-2 или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению приводит к увеличению $\gamma\delta 2$ Т-клеток по меньшей мере 350-кратно по сравнению с исходным уровнем.

Согласно определенным вариантам осуществления лечение белком II-2 формулы (I), конъюгатом II-2 или фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению можно начинать до, одновременно с или после хирургического удаления опухоли или лучевой терапией. Кроме того, такое лечение можно необязательно комбинировать по меньшей мере с одним другим противораковым терапевтическим средством, таким как системная иммунотерапия или локальная внутриопухолевая иммунотерапия или иммунотерапия внутри лимфатических узлов. Примеры по меньшей мере одного противоракового терапевтического средства, такого как системная иммунотерапия, приведены в настоящем документе для одного или более дополнительных лекарственных средств, которые могут в соответствии с вариантами осуществления присутствовать в фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам осуществления белок II-2 формулы (I), конъюгат II-2 или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят системно до, одновременно с или после в сочетании по меньшей мере с одной системной иммунотерапией или местной внутриопухолевой иммунотерапией или внутрелимфатической иммунотерапией перед лучевой терапией или хирургическим удалением инъецированной опухоли. Согласно определенным вариантам осуществления белок II-2 формулы (I), конъюгат II-2 или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят внутриопухолево до, одновременно с или после в

сочетании по меньшей мере с одной системной иммунотерапией или местной внутриопухолевой иммунотерапией или внутрилимфатической иммунотерапией перед лучевой терапией или хирургическим удалением инъецированной опухоли. Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат, его фармацевтически приемлемую соль или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению представляет собой вводят внутриопухолево до, одновременно или после комбинация по меньшей мере с одной системной иммунотерапией или местной внутриопухолевой иммунотерапией или внутрилимфатической иммунотерапией после лучевой терапии или хирургического удаления опухоли. Согласно определенным вариантам осуществления белок PL-2 формулы (I), конъюгат PL-2 или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят в дренирующие опухоль лимфатические узлы до, одновременно с или после хирургическое удаление опухоли или лучевой терапии. Согласно определенным вариантам осуществления белок PL-2 формулы (I), конъюгат PL-2 или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят в дренирующие опухоль лимфатические узлы до, одновременно с или после в сочетании по крайней мере с одной системной иммунотерапией или местной внутриопухолевой иммунотерапией или внутрилимфатической иммунотерапией, а также до, одновременно или после хирургического удаления опухоли или лучевой терапией. Согласно определенным вариантам осуществления белок PL-2 формулы (I), конъюгат PL-2 или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят внутриопухолево в метастатические опухоли, которые могут возникать до или после хирургического удаления или лучевой терапии первичной опухоли. Согласно определенным вариантам осуществления белок PL-2 формулы (I), конъюгат PL-2 или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят внутриопухолево в метастатические опухоли, которые могут возникать до, одновременно с или после комбинации по меньшей мере с одной системной иммунотерапией или местной внутриопухолевой иммунотерапией или внутрилимфатической иммунотерапией, а также до, одновременно или после хирургического удаления или лучевой терапии первичной опухоли. Согласно определенным вариантам осуществления перед хирургическим удалением опухоли или лучевой терапией вводят по меньшей мере одну системную терапию с последующим системным введением или внутриопухолевым введением или введением в лимфатический узел белок PL-2 формулы (I), конъюгат PL-2 или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам осуществления вначале вводят внутриопухолевое введение белка PL-2 формулы (I), конъюгата PL-2 или фармацевтической композиции согласно

настоящему изобретению с последующим лечением комбинацией по меньшей мере с одной системной терапией или местной внутриопухолевой иммунотерапией или иммунотерапией внутри лимфатических узлов. Согласно определенным вариантам осуществления по меньшей мере одно системное лечение проводят перед хирургическим удалением опухоли с последующим введением белка ПЛ-2 формулы (I), конъюгата ПЛ-2 или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению системно или в дренирующие лимфатические узлы или в ложе опухоли после хирургического вмешательства или путем внутриопухолевого введения в опухоль, не удаленную хирургическим путем.

Согласно определенным вариантам осуществления белок ПЛ-2 формулы (I), конъюгат ПЛ-2 или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению вызывает распространение эпитопа. Распространение эпитопа выгодно, потому что оно может привести к более сильному или более полному иммунному ответу. В частности, генерация распространения эпитопов и экспансия вновь активированных Т-клеток в новые эпитопы с различной специфичностью могут способствовать важным клиническим преимуществам. Например, метастатические очаги могут иметь общие эпитопы с основной опухолью, но все же быть генетически отличными от основной опухоли, и, таким образом, распространение эпитопа может способствовать эрадикации отдаленных метастазов на основе начального иммунного ответа, общего между основной опухолью и метастатической опухолью, которая затем распространяется на уникальные эпитопы в отдаленных метастазах и помогает иммунной системе избавиться от этих метастазов. Распространение эпитопа было связано с повышением эффективности у пациентов с раком (Clin Cancer Res 2020,26:4442–7).

Согласно определенным вариантам осуществления белок ПЛ-2 формулы (I), конъюгат ПЛ-2 или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят пациенту до, одновременно с или после введения одного или нескольких дополнительных лекарственных средств, где одно или несколько дополнительных лекарственных средств согласно настоящему изобретению выбирают из группы, состоящей из агонистов паттерн-распознающих рецепторов (PRRA), цитотоксических/химиотерапевтических средств, ингибиторов или антагонистов иммунных контрольных точек, агонистов иммунных контрольных точек, агонистов иммуноактивирующих рецепторов, мультиспецифических лекарственных средств, конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), конъюгатов антитело-адаювант (AAC), радионуклидов или таргетных радионуклидных терапевтические средства, ингибиторов репарации повреждений ДНК, ингибиторов метаболизма опухоли, агонистов

паттерн-распознающих рецепторов, ингибиторов протеинкиназы, агонистов хемокиновых и хемоаттрактантных рецепторов, антагонистов хемокиновых и хемоаттрактантных рецепторов, агонистов цитокиновых рецепторов, агонистов рецепторов смерти, Антагонистов CD47 или SIRP α , онколитических лекарственных средств, белков-преобразователей сигналов, эпигенетических модификаторов, опухолевых пептидов или противоопухолевых вакцин, ингибиторов белков теплового шока (HSP), протеолитических ферментов, ингибиторов убиквитина и протеасом, антагонистов молекул адгезии, гормонов, включая гормональные пептиды и синтетические гормоны, и адоптивной клеточной терапии, такой как терапия инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL), терапия химерными антигенными рецепторами (CAR), терапия Т-клетками, терапия естественными клетками-киллерами (NK), терапия CAR-T, терапия CAR-NK, терапия CAR- $\gamma\delta$, терапия CAR-макрофагами или любая другая клеточная терапия с использованием генетически модифицированного или генетически немодифицированного типа иммунных клеток.

Такое одно или несколько дополнительных лекарственных средств могут быть либо в свободной, либо в немодифицированной форме, либо могут быть в форме соединения с замедленным высвобождением, т.е. в форме, из которой лекарственное средство высвобождается с определенным периодом полувыведения, например, с периодом полувыведения от 6 часов до полугода.

Такое одно или несколько дополнительных лекарственных средств могут быть либо в свободной, либо в немодифицированной форме, либо могут быть в форме соединения с замедленным высвобождением, т.е. в форме, из которой лекарственное средство высвобождается с определенным периодом полувыведения, например, с периодом полувыведения от 6 часов до полугода (AhR).

Согласно определенным вариантам осуществления PRRA представляет собой агонист Toll-подобного рецептора, такой как агонисты Toll-подобного рецептора, выбранные из группы, состоящей из агонистов TLR1/2, таких как пептидогликаны, липопротеины, Pam3CSK4, Amplivant, SLP-AMPLIVANT, HESPECTA, ISA101 и ISA201, агонистов TLR2, как например, LAM-MS, LPS-PG, LTA-BS, LTA-SA, PGN-BS, PGN-EB, PGN-EK, PGN-SA, CL429, FSL-1, Pam2CSK4, Pam3CSK4, zymosan, CBLB612, SV-283, ISA204, SMP105, термически убитых *Listeria monocytogenes*, агонистов TLR3, как например, поли(A:U), поли(I:C) (поли-ICLC), ринтатолимод, апоксим, IPH3102, поли-ICR, PRV300, RGCL2, RGIC.1, Riboxxim (RGC100, RGIC100), Riboxsol (RGIC50), synthetic natural или modified double stranded RNA, синтетическая природная или модифицированная двухцепочечная РНК, синтетические природные или

модифицированные олигомеры нуклеиновых кислот и рибоксон; агонистов TLR4, таких как липополисахариды (LPS), неоцептин-3, глюкопиранозил-липидный адьювант (GLA), GLA-SE, G100, GLA-AF, эталонный эндотоксин клинического центра (CCRE), монофосфориллипид А, grass MATA MPL, PEPA10, ONT-10 (PET- липид А, онкотиреон), G-305, ALD046, CRX527, CRX675 (RC527, RC590), GSK1795091, OM197MPAC, OM294DP, нацеленных на опухоль TLR4 агонистов, и SAR439794, агонистов TLR2/4, как например, липид А, онкотиреон), G- 305, ALD046, CRX527, CRX675 (RC527, RC590), GSK1795091, OM197MPAC, OM294DP и SAR439794, агонистов TLR2/4, как например липид А, OM174 и PGN007, агонистов TLR5, как например флагеллин, энтолимод, мобилан, протектан CBLB501, агонистов TLR6/2, как например диацилированные липопротеины, диацилированные липопептиды, FSL-1, MALP-2 и CBLB613, агонистов TLR7, как например CL264, CL307, имиквимод (R837), TMX-101, TMX-201, TMX-202, TMX302, гардиквимод, S- 27609, 851, UC- IV150, 852A (3M- 001, PF- 04878691), локсорибин, полиуридиловая кислота, GSK2245035, GS- 9620, RO6864018 (ANA773, RG7795), RO7020531, изаторибин, AN0331, ANA245, ANA971, ANA975, DSP0509, DSP3025 (AZD8848), GS986, MBS2, MBS5, RG7863 (RO6870868), сотиримод, SZU101, синтетическая природная или модифицированная одноцепочечная РНК, синтетические нуклеиновые кислоты, синтетические природные или модифицированные олигомеры нуклеиновых кислот, агонистов TLR7, нацеленных на опухоль, и TQA3334; агонистов TLR8, таких как ssPolyUridine, ssRNA40, TL8-506, XG-1-236, VTX-2337 (мотолимод), VTX-1463, VTX378, VTX763, DN1508052, SBT6050, синтетическая природная или модифицированная одноцепочечная РНК, синтетические нуклеиновые кислоты, синтетические природные или модифицированные олигомеры нуклеиновых кислот, агонистов TLR8, нацеленных на опухоль, и GS9688, агонистов TLR7/8, таких как агонист TLR7/8 TransCon™, CL075, CL097, поли(dT), резиквимод (R-848, VML600, S28463), MEDI9197 (3M-052), NKTR262, DV1001, IMO4200, IPH3201, синтетическая природная или модифицированная одноцепочечная РНК, синтетические нуклеиновые кислоты, синтетические олигомеры нуклеиновых кислот, BDC-1001, других агонистов TLR7/8, нацеленных на опухоль, и VTX1463; агонистов TLR9, таких как CpG DNA, CpG ODN, лефитолимод (MGN1703), SD-101, QbG10, CYT003, CYT003-QbG10, DUK-CpG-001, CpG-7909 (PF-3512676), GNKG168, EMD 1201081, IMO -2125, IMO-2055, CpG10104, AZD1419, AST008, IMO2134, MGN1706, IRS 954, 1018 ISS, actilon (CPG10101), ATP00001, AVE0675, AVE7279, CMP001, DIMS0001, DIMS9022, DIMS9054, DIMS9059, DV230, DV281, EnanDIM, геплисав (V270), каппапрокт (DIMS0150), NJP834, NPI503, SAR21609,

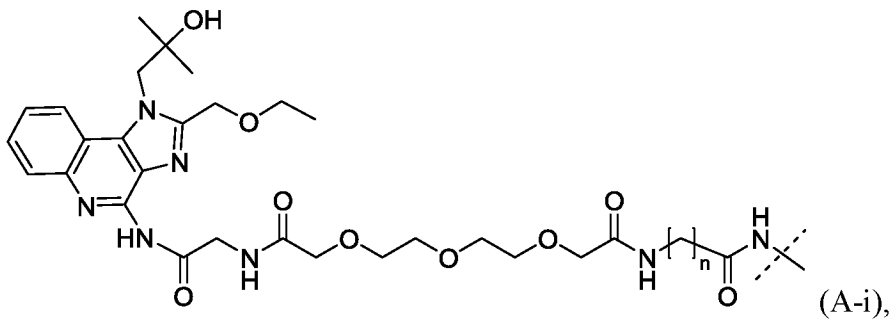
синтетические природные или модифицированные олигомеры нуклеиновых кислот и толамба; и агонистов TLR7/9, таких как DV1179.

Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляет собой агонист TLR1/2. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляет собой агонист TLR2. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляет собой агонист TLR3. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляет собой агонист TLR4. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляет собой агонист TLR2/4. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляет собой агонист TLR5. Согласно определенному варианту осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляет собой агонист TLR6/2. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляет собой агонист TLR7. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляет собой агонист TLR8. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляет собой агонист TLR7/8. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляет собой агонист TLR9.

Примерами CpG ODN являются ODN 1585, ODN 2216, ODN 2336, ODN 1668, ODN 1826, ODN 2006, ODN 2007, ODN BW006, ODN D-SL01, ODN 2395, ODN M362 и ODN D-SL03.

Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой резиквимод. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой имиквимод.

Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой резиквимод в его свободной форме. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой конъюгаты, содержащие полимер, с которым конъюгированы одна или несколько фрагментов формулы (A-i)



где

пунктирная линия показывает присоединение к полимеру, и

n представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

Согласно определенным вариантам осуществления полимер, с которым конъюгированы один или несколько фрагментов формулы (A-i), представляет собой водорастворимый полимер. Согласно определенным вариантам осуществления таким водорастворимым полимером является полимер на основе ПЭГ или гиалуроновой кислоты. Согласно определенным вариантам осуществления полимером является полимер на основе ПЭГ. Согласно определенным вариантам осуществления полимер представляет собой гидрогель, такой как гидрогель на основе ПЭГ или гиалуроновой кислоты. Согласно определенным вариантам осуществления гидрогелем является гидрогель на основе ПЭГ. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (A-i) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (A-i) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (A-i) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (A-i) представляет собой 4.

Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой конъюгат, содержащий гидрогель на основе ПЭГ, с которым конъюгировано множество фрагментов формулы (A-i), где n в формуле (A-i) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой соединение 12 или 14 из WO2020/141221A1, как показано на стр. 217 и 219, соответственно, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой соединение 12 из WO2020/141221A1, как показано на стр. 217. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой соединение 14 из

WO2020/141221A1, как показано на стр. 219. Соединения 12 и 14 можно синтезировать, как описано в WO2020/141221A1.

Согласно определенным вариантам осуществления PRRA представляет собой NOD-подобного рецептора агонист. Если одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой NOD-подобного рецептора агонист, такой NOD-подобного рецептора агонист может быть выбран из группы, состоящей из агонистов NOD1, как например, C12-iE-DAP, C14-Tri-LAN-Gly, iE-DAP, iE-Lys, и Tri-DAP, и агонистов NOD2, как например, L18-MDP, MDP, M-TriLYS, мурабутида и N-гликолил-MDP. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляет собой агонист NOD1. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляет собой агонист NOD2.

Согласно определенным вариантам осуществления PRRA представляет собой RIG-I-подобного рецептора агонист. Если одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой RIG-I-подобного рецептора агонист, такой RIG-I-подобного рецептора агонист может быть выбран из группы, состоящей из 3p-hpPHK, 5'ppp-dsPHK, 5'ppp PHK (M8), 5'OH PHK с перегибом (CBS-13-BPS), 5'PPP SLR, KIN100, KIN 101, KIN1000, KIN1400, KIN1408, KIN1409, KIN1148, KIN131A, поли(dA:dT), SB9200, RGT100 и хилтонол.

Согласно определенным вариантам осуществления PRRA представляет собой агонист сенсора цетозольной ДНК. Если одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой агонист сенсора цетозольной ДНК, такой агонист сенсора цетозольной ДНК может быть выбран из группы, состоящей из cGAS агонистов, dsDNA-EC, G3-YSD, HSV-60, ISD, ODN TTAGGG (A151), поли(dG:dC) и VACV-70.

Согласно определенным вариантам осуществления PRRA представляет собой STING агонист. Если одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой STING агонист, такой STING агонист может быть выбран из группы, состоящей из МК-1454, ADU-S100 (MIW815), 2'3'-cGAMP, 3'3'-cGAMP, с-ди-AMP, с-ди-GMP, сAIMP (CL592), сAIMP дифтор (CL614), сAIM(PS)2 дифтор (Rp/Sp) (CL656), 2'2'-cGAMP, 2'3'-cGAM(PS)2 (Rp/Sp), 3'3'-cGAM фторированный, с-ди-AMP фторированный, 2'3'-с-ди-AMP, 2'3'-с-ди-AM(PS)2 (Rp,Rp), с-ди-GMP фторированный, 2'3'-с-ди-GMP, с-ди-IMP, с-ди-UMP и DMXAA (вадимезан, ASA404). Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой МК-1454. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько

дополнительных лекарственных средств представляют собой DU-S100 (MIW815). Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой 2'3'-сGAMP.

Согласно определенным вариантам осуществления PRRA представляет собой агонист арилуглеводородного рецептора. Если одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой агонист арилуглеводородного рецептора (AhR), такой агонист AhR может быть выбран из группы, состоящей из FICZ, ITE и L-кинурина.

Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой цитотоксический/химиотерапевтический агент. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой ингибиторы или антагонисты контрольных точек иммунного ответа. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой агонисты иммуноактивирующих рецепторов. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой мультиспецифическими лекарственными средствами. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC). Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой конъюгат антитело-адъювант (AAC). Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой радионуклиды или таргетные радионуклидные терапевтические средства. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой ингибиторы репарации повреждений ДНК. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой ингибиторы метаболизма опухоли. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой агонисты паттерн-распознающих рецепторов. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой ингибиторы протеинкиназы. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой агонисты хемокиновых и хемоаттрактантных рецепторов. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств

представляют собой хемокин или антагонист хемокинового рецептора. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой агонисты рецепторов цитокинов. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой агонисты рецепторов цитокинов. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой CD47 антагонист. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой SIRP α антагонист. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой агонисты рецепторов цитокинов. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой белок-преобразователь сигналов. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой эпигенетические модификаторы. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой опухолевые пептиды или противоопухолевые вакцины. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой ингибитор белка теплового шока (HSP). Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой протеолитический фермент. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой убиквитин и ингибитор протеасом. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой антагонисты молекул адгезии. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой гормоны, включая гормональные пептиды и синтетические гормоны.

Цитотоксический или химиотерапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из алкилирующих агентов, антрациклинов, пирролобензодиазепинов, азотистых ипритов, платиновых агентов, антиметаболитов, антимикротрубчаточковых агентов, ингибиторов топоизомеразы, цитотоксических антибиотиков, ауристатинов, энедицинов, лекситропсинов, дуокармицинов, циклопропилпирролиндиолов, пурамицина, доластатинов, производных майтанзина, алкилсульфонатов, триазенов и пиперазинов.

Алкилирующий агент может быть выбраны из группы, состоящей из азотистых ипритов, как например, мехлорэтамин, циклофосфамид, мелфалан, хлорамбуцил,

ифосфамид и бусульфан, нитрозомочевин, как например, N-нитрозо-N-метилмочевина, кармустин, ломустин, семустин, фотемустин и стрептозотоцин, тетразинов, как например, дакарбазин, митозоломид и темозоломид, этилениминов, как например, альтретамин, азиридинов, как например, тиотепа, митомицин и диазиквоин, цисплатина и его производных, как например, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, и неклассических алкилирующих агентов, как например, прокарбазин и гексаметилмеламин.

Антиметаболит может быть выбран из группы, состоящей из антифолатов, как например, метотрексат и пеметрексед, фторпиримидинов, как например, фторурацил и капецитабин, аналогов дезоксинуклеозидов, как например, цитарабин, гемцитабин, децитабин, азацитидин, флударабин, неларабин, кладрибин, клофарабин и пентостатин, и тиопуринов, как например, тиогуанин и меркаптопурин.

Агент, оказывающий воздействие на микротрубочки, может быть выбран из группы, состоящей из алкалоидов барвинка, как например, винкристин, винбластин, винорелбин, виндезин и винфлунин, таксанов, как например, паклитаксел и доцетаксел, подофиллотоксинов и их производных, как например, подофиллотоксин, этопозид и тенипозид, стильбеноид фенола и его производных, как, например, зибрестат (CA4P), и BNC105.

Ингибитор топоизомеразы может быть выбраны из группы, состоящей из ингибиторов топоизомеразы I, как например, иринотекан, топотекан и камптотецин, и ингибиторов топоизомеразы II, как например, этопозид, доксорубицин, митоксантрон, тенипозид, новобиоцин, мербарон и акларубицин.

Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой доксорубицин.

Цитотоксический антибиотик может быть выбран из группы, состоящей из антрациклинов, как например, доксорубицин, даунорубицин, эпирубицин и идарубицин, пирарубицина, акларубицина, блеомицина, митомицина С, митоксантрона, актиномицина, дактиномицина, адриамицина, митрамицина и тирапазамина.

Ауристин может быть выбран из группы, состоящей из топометил ауристинина E (ММАЕ) и монометилауристинина F (ММАF).

Ендиин может быть выбран из группы, состоящей из неокарзиностатина, лидамицина (С-1027), калихеамицинов, эсперамицинов, динемиицинов и гольфомицина А.

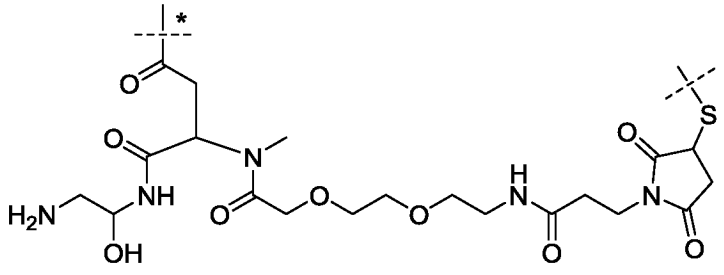
Производная майтансина может быть выбрана из группы, состоящей из ансамитоцина, мертансина (эмтансин, DM1) и равансина (соравтансин, DM4).

Ингибитор или антагонист иммунной контрольной точки могут быть выбраны из группы, состоящей из ингибиторов CTLA-4 (цитотоксический Т- лимфоцит-

ассоциированный белок 4), как например, ипилимумаб, тремелимумаб, МК -1308, FPT155, PRS010, BMS- 986249, BPI- 002, CBT509, JS007, ONC392, TE1254, IBI310, BR02001, CG0161, KN044, PBI5D3H5, BCD145, ADU1604, AGEN1884, AGEN1181, CS1002 и CP675206, ингибиторов PD-1 (запрограммированной смерти 1), как например, пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб, AMP- 224, BMS- 936559, цемиплимаб и PDR001, ингибиторов PD-L1 (белок запрограммированной клеточной смерти 1), как например, MDX -1105, MEDI4736, атезолизумаб, авелумаб, BMS- 936559 и дурвалумаб, ингибиторов PD-L2 (лиганд запрограммированной смерти 2), ингибиторов KIR (иммуноглобулин-подобный рецептор клеток- киллеров), как например, лирилумаб (IPH2102) и IPH2101, ингибиторов B7- H3, как например, MGA271, ингибиторов B7- H4, как например, FPA150, ингибиторов BTLA (аттенюатор В- и Т- лимфоцитов), ингибиторов LAG3 (ген активации лимфоцитов 3), как например, IMP321 (эфтилагимод альфа), релатлимаб, МК- 4280, AVA017, BI754111, ENUM006, GSK2831781, INCAGN2385, LAG3Ig, LAG525, REGN3767, Sym016, Sym022, TSR033, TSR075 и XmAb22841, ингибиторов TIM- 3 (Т- клеточный иммуноглобулин и муцин-домен содержащий- 3), как например, LY3321367, MBG453, и TSR- 022, ингибиторов VISTA (V- домен Ig супрессор Т клеточной активации), как например, JNJ-61610588, ингибиторов IL2/LILRB1 (Ig- подобный транскрипт 2/лейкоцит Ig- подобный рецептор 1), ингибитора IL3/LILRB4 (Ig- подобный транскрипт 3/лейкоцит Ig- подобный рецептор 4), ингибиторов IL4/LILRB2 (Ig- подобный транскрипт 4/лейкоцит Ig- подобный рецептор 2), как например, МК- 4830, ингибиторов TIGIT (Т клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM), как например, МК- 7684, PTZ-201, RG6058 и COM902, ингибиторов NKG2A, как например, IPH- 2201, и ингибиторов PVRIG, как например, COM701.

Одним примером ингибитора CTLA- 4 является анти-CTLA4 конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль, где указанный конъюгат содержит множество анти-CTLA4 фрагментов $-D_{CTLA4}$, ковалентно конъюгированных через по меньшей мере один фрагмент $-L^1$ L^2 с полимерным фрагментом Z, где $-L^1$ ковалентно и обратимо конъюгирован с $-D_{CTLA4}$, и $-L^2$ ковалентно конъюгирован с Z, и где $-L^1$ представляет собой линкерный фрагмент, и $-L^2$ представляет собой химическую связь или спейсерный фрагмент, где фрагменты $-L^1$, $-L^2$ и Z являются такими, как описано в настоящем документе для конъюгата согласно настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам осуществления $-D_{CTLA4}$ выбран из группы, состоящей из F_c анти-CTLA4 антител дикого типа, F_c , усиленных для эффекторной функции/ $Fc\gamma R$ связывания анти-CTLA4 антител, анти-CTLA4 антител, обычно активных в микроокружении опухоли, анти-CTLA4 малых молекул, CTLA4 антагонистических белков слияния, анти-CTLA4

антикалинов, анти-CTLA4 нанотел и анти-CTLA4 мультиспецифических биологических соединений на основе антител, scFV или других форматов. Согласно определенным вариантам осуществления $-D_{CTLA4}$ представляет собой ипилимумаб. Согласно определенным вариантам осуществления $-D_{CTLA4}$ представляет собой тремелимумаб. Согласно определенным вариантам осуществления анти-CTLA4 конъюгат имеет следующую структуру:



где

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к азоту аминной функциональной группы $-D_{CTLA4}$, в частности к азоту аминной функциональной группы ипилимумаба, и

неотмеченная пунктирная линия показывает присоединение к Z , как например, гидрогелю, в частности к сшитому гидрогелю на основе гиалуроновой кислоты.

Понятно, что множество фрагментов $-D_{CTLA4}-L^1-L^2$ соединены с Z , если Z представляет собой гидрогель, как например, сшитый гидрогель на основе гиалуроновой кислоты.

Согласно определенным вариантам осуществления азот аминной функциональной группы $-D_{CTLA4}$ и в частности ипилимумаба представляет собой амин или остаток лизин. Согласно определенным вариантам осуществления азот аминной функциональной группы $-D_{CTLA4}$ и в частности ипилимумаба представляет собой N- концевой амин.

Согласно определенным вариантам осуществления одним или более дополнительными лекарственными средствами являются ингибитор CTLA4, как описано выше.

Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой ингибитор PD-1 или PD-L1. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой ингибитор PD-1. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой ингибитор PD-L1. Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств пембролизумаб.

Агонист иммуноактивирующего рецептора может быть выбран из группы, состоящей из агонистов CD27, как например, рекомбинантный CD70, как например, HERA-CD27L, и варлилумаб (CDX -1127), агонистов CD28, как например, рекомбинантный CD80, рекомбинантный CD86, TGN1412 и FPT155, агонистов CD40, как например, рекомбинантный CD40L, CP- 870,893, декатузумаб (SGN- 40), Chi Lob 7/4, ADC-1013 и CDX1140, агонистов 4 -1BB (CD137), как например, рекомбинантный 4 -1BBL, урелумаб, утомилумаб и АТОР-1017, агонистов OX40, как например, рекомбинантный OX40L, MEDI0562, GSK3174998, MOXR0916 и PF- 04548600, агонистов GITR, как например, рекомбинантный GITRL, TRX518, MEDI1873, INCAGN01876, МК -1248, МК- 4166, GWN323 и BMS- 986156, и агонистов ICOS, как например, рекомбинантный ICOSL, JTX-2011 и GSK3359609.

Мультиспецифическое лекарственное средство может быть выбрано из группы, состоящей из биологических препаратов и низкомолекулярных ингибиторов иммунных контрольных точек. Примерами биологических препаратов являются мультиспецифические ингибиторы иммунных контрольных точек, такие как мультиспецифические CD137/HER2, антагонисты PD-(L)1/LAG3 (например, FS118, MGD013), антагонисты CTLA4/LAG3 (например, XmAb22841) и CTLA4/PD-(антагонисты L)1 (например, XmAb20717, MGD019); агонисты мультиспецифических иммуноактивирующих рецепторов, иммуноцитокينات и мультиспецифические агонисты иммунных контрольных точек. Такие мультиспецифические агонисты иммунных контрольных точек могут быть выбраны из группы, состоящей из агонистов суперсемейства Ig, таких как, как например, ALPN-202, FPT155, TGN1412, GSK3359609, JTX-2011, агонистов суперсемейства TNF, как например, FAP-4-1BBL (RG7826), OX40-41BB (FS120) АТОР-1015, АТОР-1144, ALG.APV-527, липокалин/PRS-343, PRS344/ONC0055, FAP-CD40 DARPIn, MP0310 DARPIn, FAP-OX40 DARPIn, EGFR-CD40 DARPIn, EGFR41BB/CD137 DARPIn, EGFR-OX40/DARFPin, HER2-CD40 DARPIn, HER2-41BB/CD137 DARPIn, HER2-OX40 DARPIn, FIBRONECTIN ED-B-CD40 DARPIn, FIBRONECTIN ED-B-41BB/CD137 и FIBRONECTIN ED-B-OX40 DARPIn, CD3 мультиспецифических агонистов, как например, агонистов суперсемейства, MEDI-565, эртумаксамаб, анти-HER2/CD3, 1Fab-иммуноглобулин G TDB, GBR 1302, MGD009, MGD007, EGFRBi, EGFR-CD Probody, RG7802, PF-06863135, PF-06671008, AMG212/BAY2010112, CD3-5T4, XmAb14045, XmAb13676, XmAb18087, S80880, REGN1979, REGN5458, REGN4018, RG6026, Mosunetuzumab, EM801, ERY974, RG6194, AMG420, AMG330, AMG 212, AMG 596, AMG 160, AMG 427, AMG 562, AMG 673, AMG 701, AMG 757, AFM13, AMF24, AFM26, AFM11. TNB-486, TNB-383B, GEN3013, JNJ-

63709178, JNJ-63898081, JNJ-64007957, JNJ-64407564, JNJ-67571244, AMV564, APVO414 (MOR209, ES414), APVO436, HPN424, HPN536, HPN217, HPN 328 и других мультиспецифических агонистов CD3 или агонистов Т-клеточного рецептора (TCR), включая агонисты $\gamma\delta$ TCR, нацеленные на активность Т-клеток в отношении антигена опухолевой клетки или вирусного антигена или экспрессирующей клетки, мультиспецифических агонистов рецептора естественных клеток-киллеров (NK), нацеленные на активирующий NK-рецептор и антиген опухолевой клетки-мишени, таких как мультиспецифические агонисты NKG2D, мультиспецифические агонисты NKp30, мультиспецифические агонисты NKp44, мультиспецифические агонисты NKp46, мультиспецифические агонисты NKp80, мультиспецифические агонисты NKG2C, 2B4 (CD244) мультиспецифические агонисты, мультиспецифические агонисты CD32a, мультиспецифические агонисты CD64, мультиспецифические агонисты, которые связываются с опухолевым антигеном, а также активируют рецепторы, такие как NKG2D или NKp30, или другие рецепторы NK, перечисленные выше, а также связываются с рецепторами Fc, такими как TrNKеTs, и мультиспецифических CD16 агонистов, таких как, как например, 1633 ViKE, 161533 TriKE, OXS-3550, OXS-C3550, AFM13 и AFM24, и других терапевтических антител, способных связывать антиген-мишень, а также рецепторы Fc, такие как CD16, CD32a, CD64.

Другие примеры агонистов иммуноактивирующих рецепторов включают агонисты дектина (Imprime PGG), рекомбинантные лиганды NKG2D, лиганды или модификаторы передачи сигналов $\gamma\delta$ TCR, такие как моноклональные антитела против BTN3A1 или моноклональные антитела против BTN2A1, или лиганды, активирующие TCR $V\gamma9/V\delta2$, такие как фосфоантигены и пирофосфатные антигены или агенты, которые увеличивают количество эндогенных лигандов $V\gamma9/V\delta2$, такие как бисфосфонаты, такие как памидронат и золедронат.

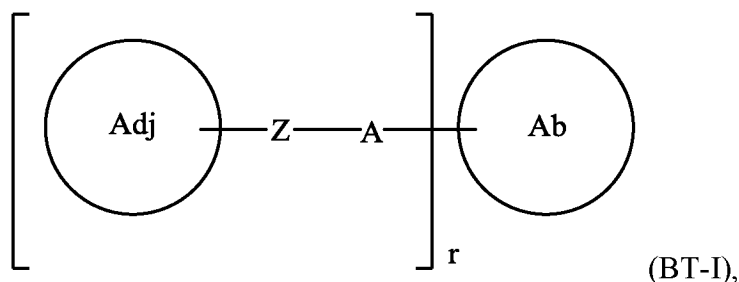
Пример низкомолекулярного ингибитора иммунной контрольной точки представляет собой CA- 327 (антагонист TIM3/PD-L1).

Конъюгат антитело- лекарственное средство может быть выбран из группы, состоящей из ADC, нацеленных на гематопэтический рак, как например, гемтузумаб озогамин, брентуксимаб ведотин, инотузумаб озогамин, SAR3419, BT062, SGN-CD19A, IMGN529, MDX -1203, полатузумаб ведотин (RG7596), пинатузумаб ведотин (RG7593), RG7598, милатузумаб- доксорубин и OXS -1550, и ADC, нацеленных на антигены солидных опухолей, как например, трастузумаб эмтанзин, глембатумомаб ведотин, SAR56658, AMG -172, AMG- 595, BAY- 94- 9343, ВПВ015, ворсетузумаб мафодотин (SGN- 75), ABT- 414, ASG- 414, ASG- ASG- 5ME, энфортумаб ведотин (ASG-

22ME), ASG -16M8F, IMGN853, индусатумаб ведотин (MLN- 0264), вадортузумаб ведотин (RG7450), софитузумаб ведотин (RG7458), лифастузумаб ведотин (RG7599), RG7600, DEDN6526A (RG7636), PSMA TTC, 1095 из Progenics Pharmaceuticals, лорвотузумаб мертанзин, лорвотузумаб эмтанзин, IMMU -130, сакитузумаб говитекан (IMMU -132), PF-06263507 и MEDI0641.

Конъюгат антитело-адъювант может представлять собой boltbody, как например, boltbody, описанное в WO2018112108A1 и WO2018009916A1. Согласно определенным вариантам осуществления boltbody выбрано из группы, состоящей из BDC-1001 и bDC-2034. Согласно определенным вариантам осуществления boltbody представляет собой BDC-1001. Согласно определенным вариантам осуществления boltbody представляет собой BDC-2034.

Согласно определенным вариантам осуществления boltbody имеет структуру формулы (BT-I)



где Ab представляет собой фрагмент антитела;

A представляет собой немодифицированную боковую цепь аминокислоты в фрагменте антитела или модифицированную боковую цепь аминокислоты в фрагменте антитела;

Z представляет собой связывающий фрагмент;

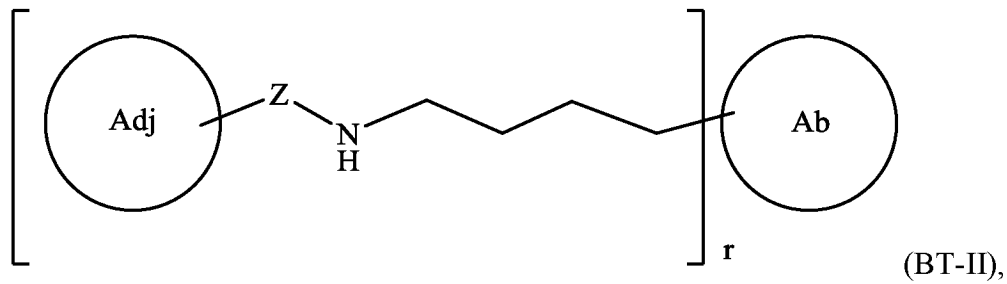
Adj представляет собой адъювантную группу; и

r представляет собой целое число от 1 до 10.

Понятно, что r аминокислотных боковых цепей фрагмента Ab формулы (BT-I) соединены с фрагментом Adj-Z.

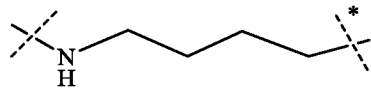
Согласно определенным вариантам осуществления A формулы (BT-I) содержит аминокислотную боковую цепь в фрагменте антитела, содержащем функциональную группу амина.

Согласно определенным вариантам осуществления boltbody имеет структуру формулы (BT-II)



где

Ab представляет собой фрагмент антитела,



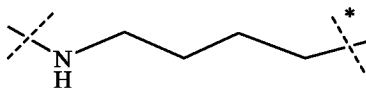
представляет собой боковую цепь остатка лизина Ab,

где непомеченная пунктирная линия указывает на присоединение к Z, а пунктирная линия, отмеченная звездочкой, указывает на присоединение к альфа-углероду остатка лизина,

Adj представляет собой адьювантную группу;

r представляет собой целое число от 1 до 10;

и Z представляет собой двухвалентный связующий фрагмент, имеющий группу этиленгликоля или остаток глицина.

Понятно, что фрагмент  формулы (BT-II) соответствует

A формулы (BT-I). Подобным образом, понятно, что r фрагментов лизиновых боковых цепей фрагмента Ab формулы (BT-II) соединены с фрагментом Adj-Z.

Согласно определенным вариантам осуществления Z формулы (BT-I) и (BT-II) связаны с Adj через амидную связь, одинарную связь C-N, одинарную связь C-O или одинарную связь C-C и с Ab через амидную связь или одинарную связь C-N.

Согласно определенным вариантам осуществления Z формул (BT-I) и (BT-II) связан с группой азота Adj и группой азота Ab. Согласно таким вариантам осуществления Z формулы (BT-I) и (BT-II) связаны с соседними группами азота через амидные связи, одинарные связи C-N или их комбинацию.

Согласно некоторым вариантам осуществления Z формул (BT-I) и (BT-II) содержит фрагмент ПЭГ.

Согласно определенным вариантам осуществления Z формул (BT-I) и (BT-II) содержит по меньшей мере 2 группы этиленгликоля, как например, по меньшей мере 3 группы этиленгликоля, по меньшей мере 4 группы этиленгликоля, по меньшей мере 5 группы этиленгликоля, по меньшей мере 6 группы этиленгликоля, по меньшей мере 7

группы этиленгликоля, по меньшей мере 8 группы этиленгликоля, по меньшей мере 9 группы этиленгликоля, по меньшей мере 10 группы этиленгликоля, по меньшей мере 11 группы этиленгликоля, по меньшей мере 12 группы этиленгликоля, по меньшей мере 13 группы этиленгликоля, по меньшей мере 14 группы этиленгликоля, по меньшей мере 15 группы этиленгликоля, по меньшей мере 16 группы этиленгликоля, по меньшей мере 17 группы этиленгликоля, по меньшей мере 18 группы этиленгликоля, по меньшей мере 19 группы этиленгликоля, по меньшей мере 20 группы этиленгликоля, по меньшей мере 21 группы этиленгликоля, по меньшей мере 22 группы этиленгликоля, по меньшей мере 23 группы этиленгликоля, по меньшей мере 24 группы этиленгликоля, или по меньшей мере 25 группы этиленгликоля.

Согласно определенным вариантам осуществления Z формул (BT-I) и (BT-II) содержит 2 группы этиленгликоля, 3 группы этиленгликоля, 4 группы этиленгликоля, 5 группы этиленгликоля, 6 группы этиленгликоля, 8 группы этиленгликоля, 12 группы этиленгликоля, 24 группы этиленгликоля, или 25 группы этиленгликоля.

Согласно определенным вариантам осуществления Z формул (BT-I) и (BT-II) содержит остаток глицина.

Согласно определенным вариантам осуществления Z формул (BT-I) и (BT-II) содержит по меньшей мере 2 остатка глицина, как например, по меньшей мере 3 остатка глицина, по меньшей мере 4 остатков глицина, по меньшей мере 5 остатков глицина, по меньшей мере 6 остатков глицина, по меньшей мере 7 остатков глицина, по меньшей мере 8 остатков глицина, по меньшей мере 9 остатков глицина, по меньшей мере 10 остатков глицина, по меньшей мере 11 остатков глицина, по меньшей мере 12 остатков глицина, по меньшей мере 13 остатков глицина, по меньшей мере 14 остатков глицина, по меньшей мере 15 остатков глицина, по меньшей мере 16 остатков глицина, по меньшей мере 17 остатков глицина, по меньшей мере 18 остатков глицина, по меньшей мере 19 остатков глицина, по меньшей мере 20 остатков глицина, по меньшей мере 21 остатков глицина, по меньшей мере 22 остатков глицина, по меньшей мере 23 остатков глицина, по меньшей мере 24 остатков глицина, или по меньшей мере 25 остатков глицина.

Согласно определенным вариантам осуществления Z формул (BT-I) и (BT-II) содержит 2 остатков глицина, 3 остатков глицина, 4 остатков глицина, 5 остатков глицина, 6 остатков глицина, 8 остатков глицина, 12 остатков глицина, 24 остатков глицина, или 25 остатков глицина.

Согласно определенным вариантам осуществления Z формул (BT-I) и (BT-II) дополнительно содержит двухвалентную циклогексиленовую группу

Согласно определенным вариантам осуществления Ab формул (BT-I) и (BT-II) содержит домен связывания антитела, который связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из CDH1, CD19, CD20, CD29, CD30, CD38, CD40, CD47, CEA, EpCAM, MUC1, MUC16, EGFR, VEGF, HER2, SLAMF7, PDGFR α , gp75, CTLA4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, B7-H4, KIR, TNFRSF4, OX40L, IDO-1, IDO-2, CEACAM1, BTLA, TIM3, A2Ar, VISTA, CLEC4C (BDCA-2, DLEC, CD303, CLECSF7), CLEC4D (MCL, CLECSF8), CLEC4E (Mincle), CLEC6A (Dectin-2), CLEC5A (MDL-1, CLECSF5), CLEC1B (CLEC-2), CLEC9A (DNGR-1) и CLEC7A (Dectin-1).

Согласно определенным вариантам осуществления Ab формул (BT-I) и (BT-II) содержит домен связывания антитела, который связывается с HER2. Согласно определенным вариантам осуществления Ab формул (BT-I) и (BT-II) содержит домен связывания антитела, который связывается с EGFR. Согласно определенным вариантам осуществления Ab формул (BT-I) и (BT-II) содержит домен связывания антитела, который связывается с CCR8. Согласно определенным вариантам осуществления Ab формул (BT-I) и (BT-II) содержит домен связывания антитела, который связывается с PD-L1. Согласно определенным вариантам осуществления Ab формул (BT-I) и (BT-II) содержит домен связывания антитела, который связывается с CEA.

Согласно определенным вариантам осуществления Ab формул (BT-I) и (BT-II) содержит антитело, выбранное из группы, состоящей из пембролизумаба, ниволумаба, атезолизумаба, авелумаба, ипилимумаба, обинутузумаба, трастузумаба, цетуксимаба, ритуксимаба, пертузумаба, бевацизумаба, даратумумаба, этанерцепта, оларатумаба, элотузумаба, маргетуксимаба и их биоаналогов.

Согласно определенным вариантам осуществления Ab формул (BT-I) и (BT-II) содержит трастузумаб. Согласно определенным вариантам осуществления Ab формул (BT-I) и (BT-II) содержит пембролизумаб. Согласно определенным вариантам осуществления Ab формул (BT-I) и (BT-II) содержит ниволумаб.

Согласно определенным вариантам осуществления Adj формул (BT-I) и (BT-II) содержит PRRA.

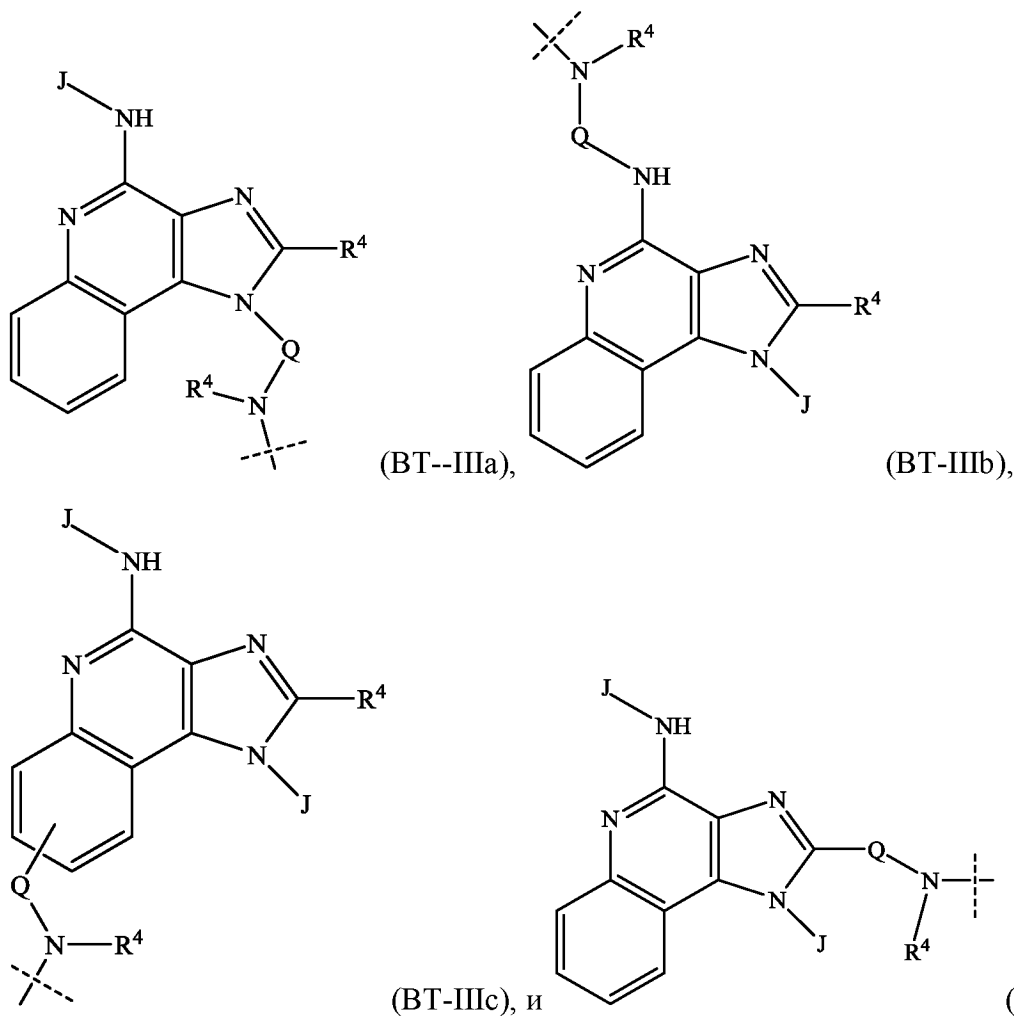
Согласно определенным вариантам осуществления Adj формул (BT-I) и (BT-II) представляет собой PRRA, выбранный из группы, состоящей из toll-подобных рецепторов (TLR) агонистов, агонистов лектиновых рецепторов с-типа (CLR), NOD-подобных рецепторов (NLR) агонистов, Rig-I-подобных рецепторов (RLR) агонистов, агонистов стимуляторов генов интерферона (STING) и их комбинации.

Согласно определенным вариантам осуществления Adj формул (BT-I) и (BT-II) представляет собой TLR агонист, как например, TLR агонист, выбранный из группы,

состоящей из TLR1 агонистов, TLR2 агонистов, TLR3 агонистов, TLR4 агонистов, TLR5 агонистов, TLR6 агонистов, TLR7 агонистов, TLR7/8 агонистов, TLR8 агонистов, TLR9 агонистов, TLR10 агонистов, TLR11 агонистов и их комбинации.

Согласно определенным вариантам осуществления Adj формул (BT-I) и (BT-II) представляет собой TLR агонист, выбранный из группы, состоящей из CL264, CL401, CL413, CL419, CL553, CL572, Pam₃CSK₄ и Pam₂CSK₄.

Согласно определенным вариантам осуществления, Adj формул (BT-I) и (BT-II) выбрано из группы, состоящей из



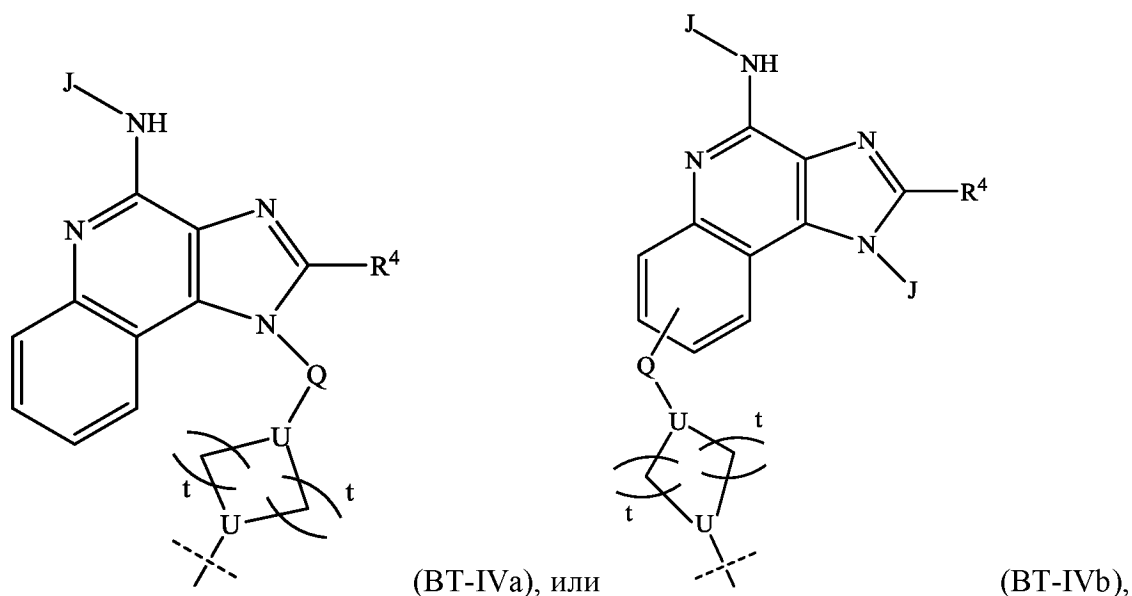
где

каждый -J независимо выбран из группы, состоящей из -H, -OR⁴, и -R⁴,

каждый -R⁴ независимо выбран из группы, состоящей из -H, алкила, гетероалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, арилалкила и гетероарилалкила, содержащих 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 атомов углерода,

-Q- отсутствует или выбран из группы, состоящей из алкила, гетероалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, арилалкила и гетероарилалкила, содержащих 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 атомов углерода, и пунктирная линия показывает присоединение к Z.

Согласно определенным вариантам осуществления Adj формул (BT-I) и (BT-II) имеет формулу



где

каждый -J независимо выбран из группы, состоящей из -H, -OR⁴, или -R⁴,

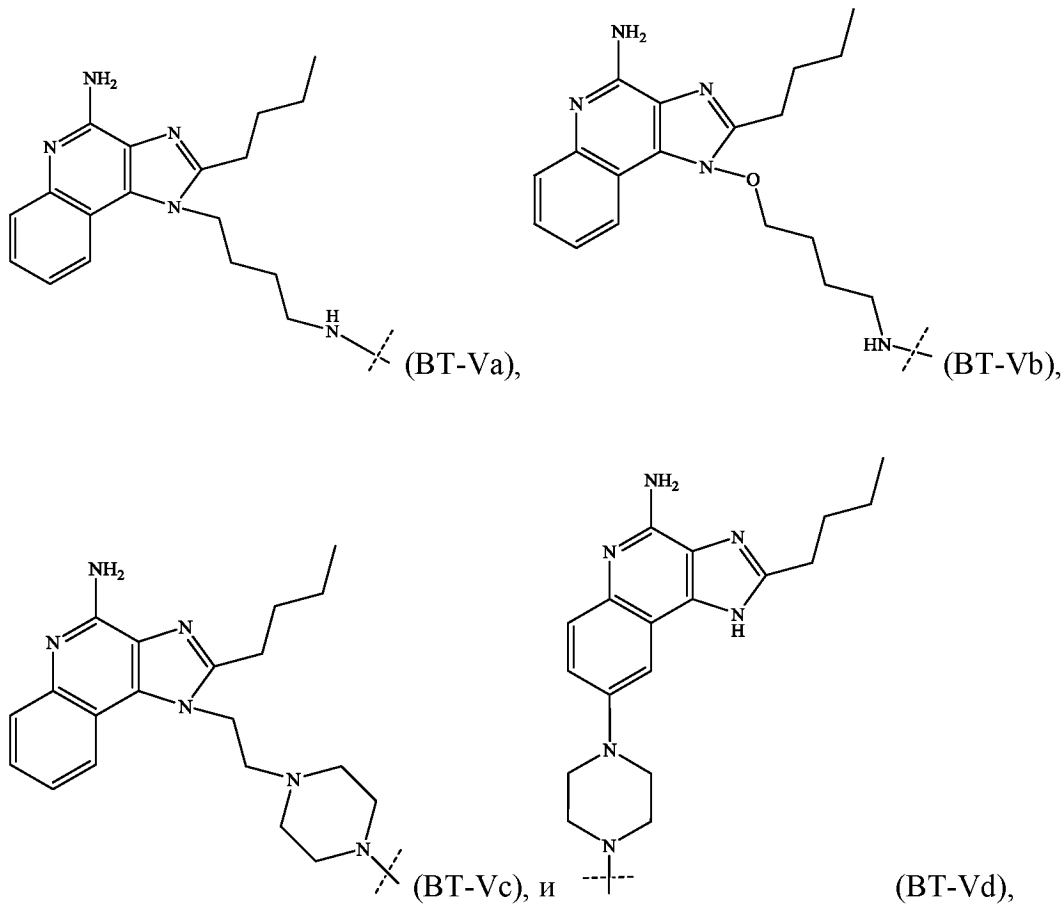
каждый -R⁴ независимо выбран из группы, состоящей из -H, алкила, гетероалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, арилалкила и гетероарилалкила, содержащих 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 атомов углерода,

каждый -U- представляет собой независимо -CH- или -N-, где по меньшей мере один -U- представляет собой -N-,

каждый t представляет собой независимо целое число, выбранное из 1, 2 и 3,

-Q- отсутствует или выбран из группы, состоящей из алкила, гетероалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, арилалкила и гетероарилалкила, содержащих 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 атомов углерода, и пунктирная линия показывает присоединение к Z.

Согласно определенным вариантам осуществления, Adj формул (BT-I) и (BT-II) выбран из группы, состоящей из формул

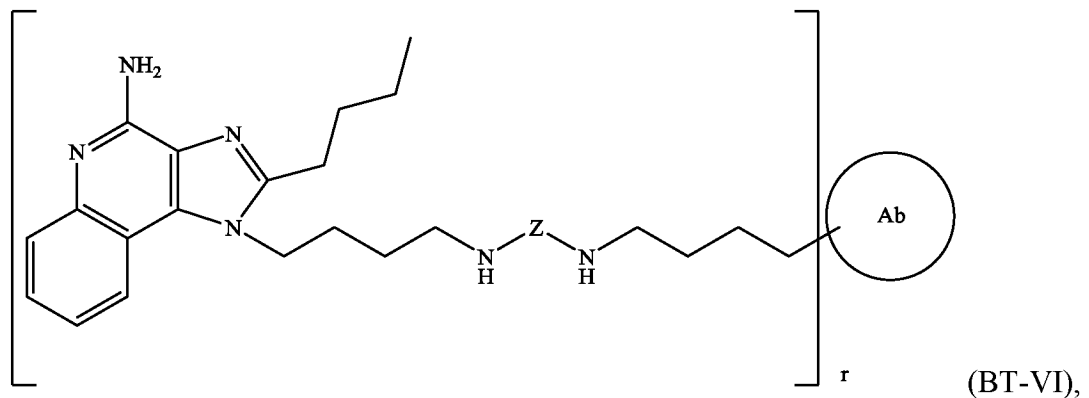


где пунктирная линия показывает присоединение к Z.

Согласно определенным вариантам осуществления Adj формул (BT-I) и (BT-II) выбраны из адьювантных фрагментов, раскрытых в пунктах [118] - [136] в WO2018112108A1.

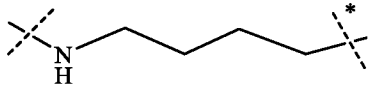
Согласно определенным вариантам осуществления boltbody содержит более одного отдельного адьювантного фрагмента.

Согласно определенным вариантам осуществления boltbody имеет структуру формулы (BT-VI)



где

Ab представляет собой фрагмент антитела,



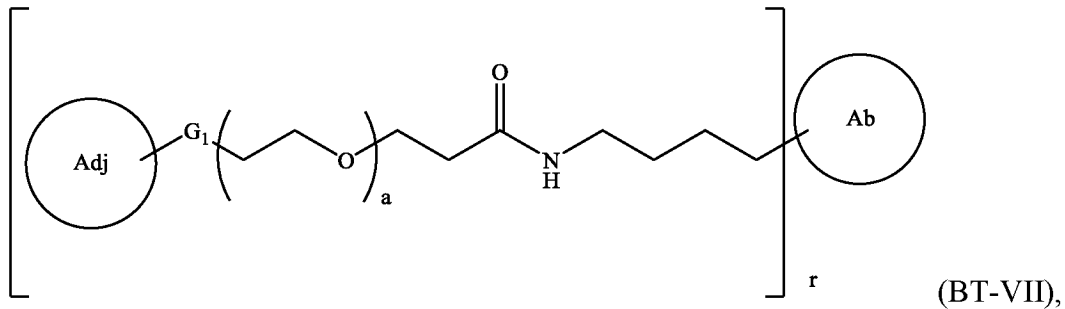
представляет собой боковую цепь остатка лизина Ab, где непомеченная пунктирная линия указывает на присоединение к Z, а пунктирная линия, отмеченная звездочкой, указывает на присоединение к альфа-углероду остатка лизина,

r представляет собой целое число, выбранное из 1 - 10, и

Z представляет собой двухвалентную связующую группу, содержащую по меньшей мере одну группу этиленгликоля или по меньшей мере один остаток глицина.

Согласно определенным вариантам осуществления Z формулы (BT-VI) имеет значения, как определено для формул (BT-I) и (BT-II).

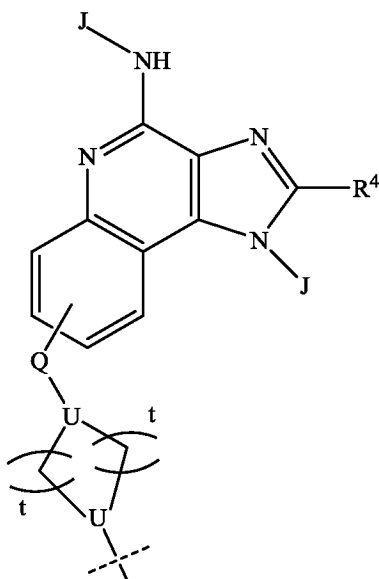
Согласно определенным вариантам осуществления boltbody имеет структуру формулы (BT-VII)



где

Ab представляет собой фрагмент антитела, содержащий (i) антигенсвязывающий домен и (ii) домен Fc,

Adj представляет собой адъювантный фрагмент формулы (BT-IVb)



где

$-R^4$ выбрано из группы, состоящей из алкила, гетероалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, арилалкила и гетероарилалкила, содержащих от 1 до 8 атомов углерода,

каждый -J представляет собой -H,

каждый -U- представляет собой -N-,

каждый t представляет собой 2,

-Q- отсутствует,

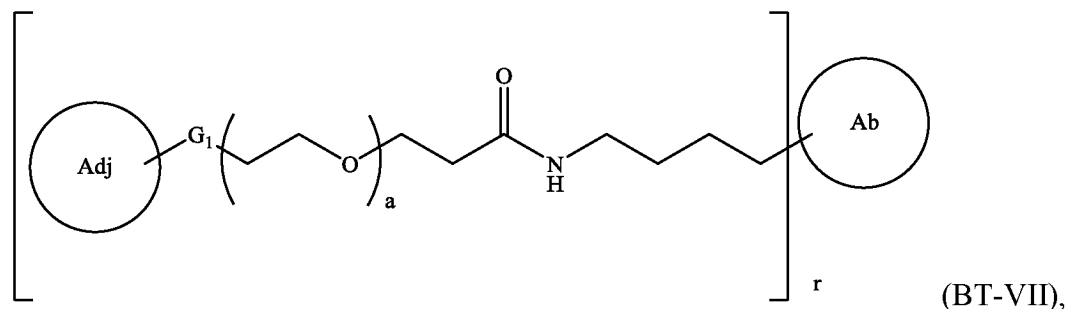
пунктирная линия показывает присоединение к G_1 ,

$-G_1$ - представляет собой связь,

a представляет собой целое число, выбранное из 1 - 40, и

r представляет собой целое число, выбранное из 1 - 10.

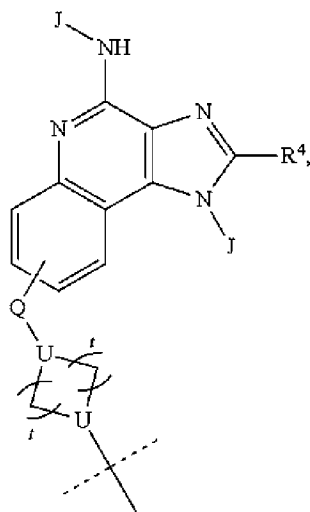
Согласно определенным вариантам осуществления *boltbody* имеет структуру формулы (BT-VII)



где

Ab представляет собой трастузумаб;

Adj представляет собой адьювантный фрагмент формулы (BT-IVb)

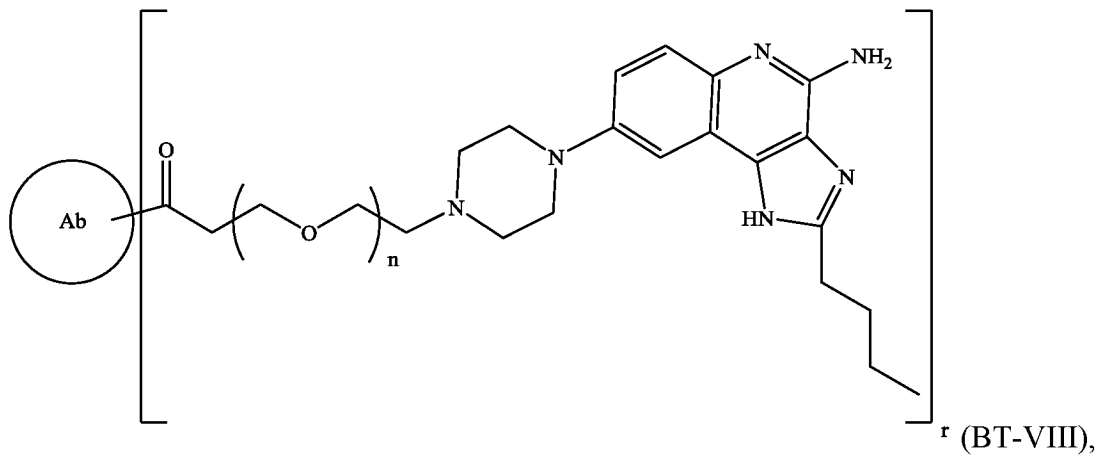


где

$-R^4$ представляет собой бутил,

каждый -J представляет собой -H,
 каждый -U- представляет собой -N-,
 каждый t представляет собой 2,
 -Q- отсутствует,
 пунктирная линия показывает присоединение к -G₁-,
 -G₁- представляет собой связь,
 а представляет собой целое число, выбранное из 1 - 40, и
 г представляет собой целое число, выбранное из 1 - 4.

Согласно определенным вариантам осуществления boltbody имеет структуру формулы (BT-VIII)



где

г представляет собой целое число, выбранное из 1 - 10,
 n представляет собой целое число, выбранное из от около 2 до около 25, и
 Ab представляет собой фрагмент антитела.

Согласно определенным вариантам осуществления г формулы (BT-VIII) представляет собой 1. Согласно определенным вариантам осуществления г формулы (BT-VIII) представляет собой 2. Согласно определенным вариантам осуществления г формулы (BT-VIII) представляет собой 3. Согласно определенным вариантам осуществления г формулы (BT-VIII) представляет собой 4.

Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (BT-VIII) представляет собой целое число, выбранное из 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (BT-VIII) представляет собой целое число, выбранное из 8, 9, 10, 11 и 12. Согласно определенным вариантам осуществления n формулы (BT-VIII) представляет собой 10.

Согласно определенным вариантам осуществления Ab формулы (BT-VIII) содержит антигенсвязывающий домен, который связывает HER2, EGFR, PD-L1 или CEA.

Согласно определенным вариантам осуществления фрагмент антитела формулы (BT-VIII) содержит антигенсвязывающий домен, который связывает HER2. Согласно определенным вариантам осуществления Ab формулы (BT-VIII) содержит антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR. Согласно определенным вариантам осуществления Ab формулы (BT-VIII) содержит антигенсвязывающий домен, который связывает PD-L1. Согласно определенным вариантам осуществления Ab формулы (BT-VIII) содержит антигенсвязывающий домен, который связывает SEA.

Только в контексте формул (BT-IIIa), (BT-IIIb), (BT-IIIc), (BT-IIId), (BT-IVa) и (BT-IVb) используемые термины имеют следующее значение:

Термин «алкил» относится к линейному или разветвленному насыщенному алифатическому радикалу, имеющему указанное число атомов углерода. Алкил может включать любое количество атомов углерода, например, C₁₋₂, C₁₋₃, C₁₋₄, C₁₋₅, C₁₋₆, C₁₋₇, C₁₋₈, C₁₋₉, C₁₋₁₀, C₂₋₃, C₂₋₄, C₂₋₅, C₂₋₆, C₃₋₄, C₃₋₅, C₃₋₆, C₄₋₅, C₄₋₆ и C₅₋₆. Например, C₁₋₆ алкил включает метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, изопентил, гексил. Алкил может также содержать алкильные группы, содержащие до 30 атомов углерода, такие как гептил, октил, нонил, децил. Алкильные группы могут быть замещены или незамещены. «Замещенные алкильные» группы могут быть замещены одной или несколькими группами, выбранными из галогена, гидроксигруппы, аминогруппы, оксо (=O), алкиламино, амидо, ацила, нитро, циано и алкокси.

Термин «арил» относится к ароматической кольцевой системе, имеющей любое подходящее количество атомов в кольце и любое подходящее количество колец. Арильные группы могут содержать любое подходящее количество атомов в кольце, такое как 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 атомов в кольце, а также от 6 до 10, от 6 до 12, или от 6 до 14 членов кольца. Арильные группы могут быть моноциклическими, конденсированными с образованием бициклических или трициклических групп или связанными с образованием биарильной группы. Типичные арильные группы включают фенил, нафтил и бифенил. Другие арильные группы включают бензил, имеющий метиленовую связывающую группу. Некоторые арильные группы имеют от 6 до 12 членов в кольце, например, фенил, нафтил или бифенил. Другие арильные группы имеют от 6 до 10 членов в кольце, например, фенил или нафтил.

Термин «карбоцикл» относится к насыщенной или частично ненасыщенной, моноциклической, конденсированной бициклической или полициклической кольцевой системе, содержащей от 3 до 12 атомов в кольце или указанное число атомов. Карбоциклы могут включать любое количество атомов углерода, например, C₃₋₆, C₄₋₆, C₅₋₆, C₃₋₈, C₄₋₈, C₅₋₈, C₆₋₈, C₃₋₉, C₃₋₁₀, C₃₋₁₁ и C₃₋₁₂. Насыщенные моноциклические карбоциклические кольца

включают, например, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и циклооктил. Насыщенные бициклические и полициклические карбоциклические кольца включают, например, норборнан, [2.2.2]бициклооктан, декагидронафталин и адамантан. Карбоциклические группы также могут быть частично ненасыщенными, имеющими одну или несколько двойных или тройных связей в кольце. Типичные частично ненасыщенные карбоциклические группы включают, но не ограничиваются ими, циклобутен, циклопентен, циклогексен, циклогексадиен (1,3- и 1,4-изомеры), циклогептен, циклогептадиен, циклооктен, циклооктадиен (1,3-, 1, 4- и 1,5-изомеры), норборнен и норборнадиен.

Термин «гетероалкил» относится к алкильной группе, в которой один или несколько атомов углерода необязательно и независимо заменены гетероатомом, выбранным из N, O и S.

Термин «гетероцикл» относится к гетероциклоалкильным группам и гетероарильным группам. «Гетероарил», сам по себе или как часть другого заместителя, относится к моноциклическому или конденсированному бициклическому или трициклическому ароматическому кольцу, содержащему от 5 до 16 атомов в кольце, где от 1 до 5 атомов в кольце представляют собой гетероатом, такой как N, O или S. Также могут быть полезны дополнительные гетероатомы, такие как B, Al, Si и P. Гетероатомы могут быть окислены с образованием фрагментов, таких как $-S(O)-$ и $-S(O)_2-$. Гетероарильные группы могут включать любое количество атомов в кольце, например, от 3 до 6, от 4 до 6, от 5 до 6, от 3 до 8, от 4 до 8, от 5 до 8, от 6 до 8, от 3 до 9, от 3 до 10, от 3 до 11 или от 3 до 12 членов кольца. В гетероарильные группы может быть включено любое подходящее количество гетероатомов, такое как 1, 2, 3, 4 или 5, или от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 3, от 2 до 4, от 2 до 5, от 3 до 4 или от 3 до 5. Гетероарильная группа может включать такие группы, как пиррол, пиридин, имидазол, пиразол, триазол, тетразол, пиразин, пиримидин, пиридазин, триазин (1,2,3-, 1,2,4- и 1,3,5-изомеры), тиофен, фуран, тиазол, изотиазол, оксазол и изоксазол. Гетероарильные группы также могут быть конденсированы с ароматическими кольцевыми системами, такими как фенильное кольцо, с образованием членов, таких как бензопирролы, такие как индол и изоиндол, бензопиридины, такие как хинолин и изохинолин, бензопиразин (хиноксалин), бензопиримидин (хиназолин), бензопиридазины, такие как фталазин и циннолин, бензотиофен и бензофуран. Другие гетероарильные группы включают гетероарильные кольца, связанные связью, такие как бипиридин. Другие гетероарильные группы включают гетероарильные кольца, связанные связью, такие как бипиридин. Гетероарильные группы могут быть замещены или незамещены. «Замещенные

гетероарильные» группы могут быть замещены одной или несколькими группами, выбранными из галогена, гидроксидной, аминной, оксо ($=O$), алкиламино, амидо, ацила, нитро, циано и алкокси. Гетероарильные группы могут быть связаны через любое положение в кольце. Например, пиррол включает 1-, 2- и 3-пиррол, пиридин включает 2-, 3- и 4-пиридин, имидазол включает 1-, 2-, 4- и 5-имидазол, пиразол включает 1-, 3-, 4- и 5-пиразол, триазол включает 1-, 4- и 5-триазол, тетразол включает 1- и 5-тетразол, пиримидин включает 2-, 4-, 5- и 6-пиримидин, пиридазин включает 3- и 4-пиридазин, 1,2,3-триазин включает 4- и 5-триазин, 1,2,4-триазин включает 3-, 5- и 6-триазин, 1,3,5-триазин включает 2-триазин, тиофен включает 2- и 3-тиофен, фуран включает 2- и 3-фуран, тиазол включает 2-, 4- и 5-тиазол, изотиазол включает 3-, 4- и 5-изотиазол, оксазол включает 2-, 4- и 5-оксазол, изоксазол включает 3-, 4- и 5-изоксазол, индол, такой как 1-, 2- и 3-индол, изоиндол, такой как 1- и 2-изоиндол, хинолин, такой как 2-, 3- и 4-хинолин, изохинолин, такой как 1-, 3- и 4-изохинолин, хиназолин, такой как 2- и 4-хиназолин, циннолин, такой как 3- и 4-циннолин, бензотиофен, такой как 2- и 3-бензотиофен и бензофуран, такой как 2- и 3-бензофуран.

Термин «гетероциклоалкил» сам по себе или как часть другого заместителя относится к насыщенной кольцевой системе, имеющей от 3 до 12 кольцевых членов и от 1 до 4 гетероатомов N, O и S. Также могут быть полезны дополнительные гетероатомы, такие как B, Al, Si и P. Гетероатомы могут быть окислены с образованием фрагментов, таких как $-S(O)-$ и $-S(O)_2-$. Гетероциклоалкильные группы могут включать любое количество атомов в кольце, например, от 3 до 6, от 4 до 6, от 5 до 6, от 3 до 8, от 4 до 8, от 5 до 8, от 6 до 8, от 3 до 9, от 3 до 10, 3 до 11 или от 3 до 12 членов кольца. В гетероциклоалкильные группы может быть включено любое подходящее количество гетероатомов, такое как 1, 2, 3 или 4, или от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 2 до 3, от 2 до 4 или от 3 до 4. Гетероциклоалкильная группа может включать такие группы, как азиридин, азетидин, пирролидин, пиперидин, азепан, азокан, хинуклидин, пиразолидин, имидазолидин, пиперазин (1,2-, 1,3- и 1,4-изомеры), оксиран, оксетан, тетрагидрофуран, оксан (тетрагидропиран), оксепан, тиран, тиетан, тиолан (тетрагидротиофен), тиан (тетрагидротиопиран), оксазолидин, изоксазолидин, тиазолидин, изотиазолидин, диоксолан, дитиолан, морфолин, тиоморфолин, диоксан или дитиан. Гетероциклоалкильные группы также могут быть конденсированы с ароматическими или неароматическими кольцевыми системами с образованием элементов, таких как индолин. Гетероциклоалкильные группы могут быть незамещенными или замещенными. «Замещенные гетероциклоалкильные» группы могут быть замещены одной или несколькими группами, выбранными из галогена, гидроксидной, аминной, оксо ($=O$),

алкиламино, амидо, ацила, нитро, циано и алкокси. Гетероциклоалкильные группы могут быть связаны через любое положение в кольце. Например, азиридин может быть 1- или 2-азиридином, азетидин может быть 1- или 2-азетидином, пирролидин может быть 1-, 2- или 3-пирролидином, пиперидин может быть 1-, 2-, 3- или 4- пиперидин, пиразолидин может быть 1-, 2-, 3- или 4-пиразолидином, имидазолидин может быть 1-, 2-, 3- или 4-имидазолидином, пиперазин может быть 1-, 2-, 3- или 4-пиперазином, тетрагидрофуран может быть 1- или 2-тетрагидрофураном, оксазолидин может быть 2-, 3-, 4- или 5-оксазолидином, изоксазолидин может быть 2-, 3-, 4- или 5-изоксазолидином, тиазолидин может быть 2-, 3-, 4- или 5-тиазолидин, изотиазолидин может представлять собой 2-, 3-, 4- или 5-изотиазолидин, а морфолин может представлять собой 2-, 3- или 4-морфолин

Термин «арилалкил» относится к любому арильному производному алкильной группы. Согласно выбору варианта осуществления одна или несколько арильных частей могут быть связаны с остальной частью молекулы через алкильную связь. При таких обстоятельствах заместитель будет называться арилалкилом, что указывает на то, что алкиленовая группа находится между арильной частью и молекулой, с которой связан арил. Репрезентативные арилалкильные группы включают фенилметил, фенилэтил, фенилпропил, фенилизопропил, фенилбутил, фенилизобутил, фенил-втор-бутил, фенил-трет-бутил, фенилпентил, фенил-изопентил, фенилгексил, нафтилметил, нафтилэтил, нафтилпропил, нафтилизопропил, нафтилбутил, нафтил-изобутил, нафтил-втор-бутил, нафтил-трет-бутил, нафтилпентил, нафтил-изопентил, нафтилгексил, бифенилметил, бифенилэтил, бифенилпропил, бифенилизопропил, бифенилбутил, бифенил-изобутил, бифенил-втор-бутил, бифенил-трет-бутил, бифенилпентил, бифенил-изопентил и бифенилгексил,

Термин «гетероарилалкил» относится к арилалкильной группе, в которой один или несколько атомов углерода необязательно и независимо заменены гетероатомом, выбранным из N, O и S.

Согласно определенным вариантам осуществления одно или несколько дополнительных лекарственных средств представляют собой радионуклеотиды могут быть выбраны из группы, состоящей из β -излучателей, как например, ^{177}Lu Лютеций, ^{166}Gd гольмий, ^{186}Re рений, ^{188}Re рений, ^{67}Cu медь, ^{149}Pm прометий, ^{199}Au золота, ^{77}Br бром, ^{153}Sm самарий, ^{105}Rh родий, ^{89}Sr стронций, ^{90}Y иттрий, ^{131}I иод, α -излучателей, как например, ^{213}Bi висмут, ^{223}Ra радий, ^{225}Ac актиний, ^{211}At астат, и излучателей электрона Оже, как например, ^{77}Br бром, ^{111}I иод, ^{123}I иод и ^{125}I иод.

Нацеленные радионуклеотидные терапевтические средства могут быть выбраны из группы, состоящей из зевалина (^{90}Y -ибритумомаб тиуксетан), бексара (^{131}I -тозитумомаб),

онколима (^{131}I -Lym 1), лимфоцида (^{90}Y - эпратузумаб), котара (^{131}I -ChTNN-1/B), лабетузумаба (^{90}Y или ^{131}I -CEA), терагина (^{90}Y -пемтумомаба), ликартина (^{131}I -метуксимаба), радретумаба (^{131}I -L19) PAM4 (^{90}Y -кливатузумаб тетраксетана), ксофиго (^{223}Ra дихлорида), (^{177}Lu -DOTA-Тур $^{3-}$ октреотата) и ^{131}I - MIBG.

Ингибитор репарации повреждения ДНК может быть выбран из группы, состоящей из ингибиторов поли(ADP- рибоза)полимеразы (PARP), как например, олапариб, рукапариб, нирапариб, велипариб, CEP 9722 и E7016, CHK1/CHK2 двойных ингибиторов, как например, AZD7762, V158411, CBP501 и XL844, CHK1 селективных ингибиторов, как например, PF477736, MK8776/SCH900776, CCT244747, CCT245737, LY2603618, LY2606368/прексазертиб, AB- IsoG, ARRY575, AZD7762, CBP93872, ESP01, GDC0425, SAR020106, SRA737, V158411 и VER250840, CHK2 ингибиторов, как например, CCT241533 и PV1019, ATM ингибиторов, как например, AZD0156, AZD1390, KU55933, M3541 и SX-RDS1, ATR ингибиторов, как например, AZD6738, BAY1895344, M4344 и M6620 (VX- 970), и ДНК-ПК ингибиторов, как например, M3814.

Ингибитор метаболизма опухоли может быть выбран из группы, состоящей из ингибиторов аденозинового пути, ингибиторов метаболизма триптофана и ингибиторов аргининового пути.

Примерами ингибиторов аденозинового пути являются ингибиторы A2AR (рецептор аденозина A2A), как например, ATL- 444, истрадефиллин (KW-6002), MSX- 3, преладенант (SCH- 420,814), SCH- 58261, SCH412,348, SCH- 442,416, ST-1535, кофеин, VER-6623, VER-6947, VER-7835, випаденант (BIB-014), ZM- 241,385, PBF-509 и V81444, ингибиторы CD73, как например, IPH53 и SRF373, и ингибиторы CD39, как например, IPH52.

Примерами ингибитора метаболизма триптофана являются ингибиторы IDO, как например, индоксимод (NLG8189), эпакадостат, навоксимод, BMS-986205 и МК-7162, ингибиторы TDO, как например, 680C91, и двойные ингибиторы IDO/TDO.

Примерами ингибиторов аргининового пути являются ингибиторы аргиназы, как например, INCB001158.

Ингибитор протеинкиназы может быть выбран из группы, состоящей из ингибиторов рецепторной тирозинкиназы, ингибиторов внутриклеточной киназы, ингибиторов циклинзависимой киназы, ингибиторов фосфоинозитид-3-киназы, ингибиторов митоген-активируемой протеинкиназы, ингибиторов ядерного фактора каппа- β киназы (ИКК) и ингибиторов Wee-1.

Примерами ингибиторов рецепторной тирозинкиназы являются ингибиторы рецептора EGF, как например, афатиниб, цетуксимаб, эрлотиниб, гефитиниб, пертузумаб

и маргетуксимаб, ингибиторы рецептора VEGF, как например, акситиниб, ленватиниб, пегаптаниб и линифаниб (ABT- 869), ингибиторы рецепторов С-КИТ, как например, CDX0158 (КТN0158), ингибиторы ERBB2 (HER2), например, герцептин (трастузумаб), ингибиторы рецептора ERBB3, как например, CDX3379 (MEDI3379, КТN3379) и AZD8931 (сапитиниб), ингибиторы рецептора FGF, как например, эрдафитиниб, ингибиторы рецептора AXL, как например, BGB324 (BGB 324, R 428, R428, бемцентиниб) и SLC391, и ингибиторы рецепторов MET, как например, CGEN241.

Примерами ингибиторов внутриклеточной киназы являются ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК), например, ибрутиниб, акалабрутиниб, GS- 4059, спебрутиниб, BGB- 3111, HM71224, занубрутиниб, ARQ531, BI- ВТК1 и векабрутиниб, ингибиторы тирозинкиназы селезенки, как например, фостаматиниб, ингибиторы тирозинкиназы Vcr- Abl, например, иматиниб и нилотиниб, ингибиторы янус- киназы, например, руксолитиниб, тофацитиниб и федратиниб, и мультиспецифические ингибиторы тирозинкиназы, например, босутиниб, кризотиниб, кабозантиниб, дазатиниб, энтректиниб, лапатиниб, мубритиниб, пазопаниб, сорафениб, сунитиниб, SU6656 и вандетаниб.

Одним примером ингибитора тирозинкиназы является конъюгат ингибитора тирозинкиназы (“ТКИ”) или его фармацевтически приемлемая соль, где указанный конъюгат содержит множество фрагментов ТКИ $-D_{TKI}$, ковалентно конъюгированных через по меньшей мере один фрагмент $-L^1-L^2$ -с полимерным фрагментом Z, где $-L^1$ - ковалентно и обратимо конъюгирован с $-D_{TKI}$ и $-L^2$ -ковалентно конъюгирован с Z, и где $-L^1$ представляет собой линкерный фрагмент и $-L^2$ представляет собой химическую связь или спейсерный фрагмент, где фрагменты $-L^1$, $-L^2$ и Z являются такими, как описано в настоящем документе для конъюгата согласно настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам осуществления $-D_{TKI}$ выбран из группы, состоящей из ингибиторов тирозинкиназного рецептора, внутриклеточных киназных ингибиторов, ингибиторов циклин-зависимой киназы, ингибиторов фосфоинозитид- 3-киназы (PI3K), митоген-активируемых ингибиторов протеинкиназы, ингибиторов ядерного фактора каппа- β киназы (ИКК) и ингибиторов Wee -1. Согласно определенным вариантам осуществления $-D_{TKI}$ представляет собой акситиниб. Согласно определенным вариантам осуществления $-D_{TKI}$ представляет собой ленватиниб. Согласно определенным вариантам осуществления $-D_{TKI}$ представляет собой пегаптаниб. Согласно определенным вариантам осуществления $-D_{TKI}$ переставляет собой линифаниб.

Примерами ингибиторов циклинзависимой киназы являются рибоциклиб, палбоциклиб, абемациклиб, трилациклиб, пурваланол А, оломуцин II и МК- 7965.

Примерами ингибиторов фосфоинозитид-3-киназы являются IPI549, GDC-0326, пиктилизиб, серабелисиб, IC-87114, AMG319, селеталисиб, идеалисиб и CUDC907.

Примерами ингибиторов митоген-активируемой протеинкиназы являются ингибиторы Ras/фарнезил трансферазы, такие как типирафиниб и LB42708, ингибиторы Raf, такие как регорафениб, энкорафениб, вемурафениб, дабрафениб, сорафениб, PLX-4720, GDC-0879, AZ628, лифирафениб, PLX7904 и RO5126766, ингибиторы MEK, такие как кобиметиниб, траметиниб, биниметиниб, селуметиниб, пимасертиб, рефаметиниб и PD0325901, ингибиторы ERK, такие как МК-8353, GDC-0994, уликсертиниб и SCH772984.

Примерами ингибиторов ядерного фактора каппа- β киназы (ИКК) являются VPI-003 и AS602868.

Примером ингибитора Wee-1 является адавосертиб.

Хемокиновый рецептор и агонист хемоаттрактантного рецептора могут быть выбраны из группы, состоящей из хемокиновых рецепторов CXС, хемокиновых рецепторов CC, хемокиновых рецепторов C, хемокиновых рецепторов CX3C и рецепторов для хемоаттрактанта.

Хемокиновый рецептор CXС может быть выбран из группы, состоящей из агонистов CXCR1, как например, рекомбинантный CXCL8 и рекомбинантный CXCL6, агонистов CXCR2, как например, рекомбинантный CXCL8, рекомбинантный CXCL1, рекомбинантный CXCL2, рекомбинантный CXCL3, рекомбинантный CXCL5, рекомбинантный CXCL6, MGTA 145 и SB251353, агонистов CXCR3, как например, рекомбинантный CXCL9, рекомбинантный CXCL10, рекомбинантный CXCL11 и рекомбинантный CXCL4, агонистов CXCR4, как например, рекомбинантный CXCL12, ATI2341, CTCE0214, CTCE0324 и NNZ4921, агонистов CXCR5, как например, рекомбинантный CXCL13, агонистов CXCR6, как например, рекомбинантный CXCL16, и агонистов CXCL7, как например, рекомбинантный CXCL11.

Хемокиновый рецептор CC может быть выбран из группы, состоящей из агонистов CCR1, как например, рекомбинантный CCL3, ECI301, рекомбинантный CCL4, рекомбинантный CCL5, рекомбинантный CCL6, рекомбинантный CCL8, рекомбинантный CCL9/10, рекомбинантный CCL14, рекомбинантный CCL15, рекомбинантный CCL16, рекомбинантный CCL23, PB103, PB105 и MPIF1, агонистов CCR2, как например, рекомбинантный CCL2, рекомбинантный CCL8, рекомбинантный CCL16, PB103 и PB105, агонистов CCR3, как например, рекомбинантный CCL11, рекомбинантный CCL26, рекомбинантный CCL7, рекомбинантный CCL13, рекомбинантный CCL15, рекомбинантный CCL24, рекомбинантный CCL5, рекомбинантный CCL28 и

рекомбинантный CCL18, агонистов CCR4, как например, рекомбинантный CCL3, ECI301, рекомбинантный CCL5, рекомбинантный CCL17 и рекомбинантный CCL22, агонистов CCR5, как например, рекомбинантный CCL3, ECI301, рекомбинантный CCL5, рекомбинантный CCL8, рекомбинантный CCL11, рекомбинантный CCL13, рекомбинантный CCL14, рекомбинантный CCL16, PB103 и PB105, агонистов CCR6, как например, рекомбинантный CCL20, агонистов CCR7, как например, рекомбинантный CCL19 и рекомбинантный CCL21, агонистов CCR8, как например, рекомбинантный CCL1, рекомбинантный CCL16, PB103 и PB105, агонистов CCR9, как например, рекомбинантный CCL25, агонистов CCR10, как например, рекомбинантный CCL27 и рекомбинантный CCL28, и агонистов CCR11, как например, рекомбинантный CCL19, рекомбинантный CCL21 и рекомбинантный CCL25.

Хемокиновые рецепторы C могут представлять собой агонист XCR1, как например, рекомбинантный XCL1 или рекомбинантный XCL2.

Хемокиновые рецепторы CX3C могут представлять собой агонист CX3CR1, как например, рекомбинантный CX3CL1.

Хемоаттрактантные рецепторы могут быть выбраны из группы, состоящей из агонистов рецепторов формилпептида, как, например, N- формилпептиды, N-формилметионин-лейцил- фенилаланин, энфувиртид, T21/DP107, аннексин A1, Ac2-26 и Ac9- 25, агонисты рецептора C5a, и агонисты хемокин-подобного рецептора 1, как например, хемерин.

Хемокиновые антагонисты могут быть выбраны из группы, состоящей из ингибиторов хемокинов CXCL, как например, UNBS5162, ингибиторов CXCL8, как например, BMS986253 и PA620, ингибиторов CXCL10, как например, TM110, эльделумаб и NI0801, ингибиторов CXCL12, как например, NOX-A12 и JVS100, ингибиторов CXCL13, как например, VX5, ингибиторов CCL2, как например, PA508, ABN912, AF2838, BN83250, BN83470, C243, CGEN54, CNTO888, NOXE36, VT224 и SSR150106, ингибиторов CCL5, как например, HGS1025 и NI0701, ингибиторов CCL2/CCL5, как например, ВКТР46, ингибиторов CCL5/FMLP рецептора, как например, RAP160, ингибиторов CCL11, как например, бертилимумаб и RAP701, ингибиторов CCL5/CXCL4, как например, СТ2008 и СТ2009, ингибиторов CCL20, как например, GSK3050002, и ингибиторов CX3CL1, как например, кетмолимаб.

Антагонисты хемокинового рецептора могут быть выбраны из группы, состоящей из ингибиторов CXCR1, как например репертаксин, CCX832, FX68 и KB03, ингибиторов CXCR2, как например AZD5069, AZD5122, AZD8309, GSK1325756, GSK1325756H, PS291822, SB332235 и SB656933, ингибиторов CXCR1/CXCR2, как например DF1970,

DF2156A, DF2162, DF2755A, репариксин, SX576, SX682, PACG31P, AZD4721 и PA401, ингибиторов CXCR3, ингибиторов CXCR4, как например BL8040, ингибиторов CXCR4/E-селектин, как например GMI1359, ингибиторов CXCR6, как например CCX5224, ингибиторов CCR1, как например AZD4818, BAY865047, BMS817399, CCX354, CCX634, CCX9588, CP481715, MLN3701, MLN3897, PS031291, PS375179 и PS386113, ингибиторов CCR2, как например AZD2423, BL2030, BMS741672, CCX140, CCX598, CCX872, CCX915, CNTX6970, INCB3284, INCB3344, INCB8696, JNJ17166864, JNJ27141491, MK0812, OPLCCL2LPM, PF4136309, сероцион, STIB0201, STIB0211, STIB0221, STIB0232, STIB0234, TAK202, TPI526, ингибиторов CCR2/CCR5, как например PF04634817, RAP103 и TBR652, ингибиторов CCR2/CCR5/CCR8, как например RAP310, ингибиторов CCR3, как например ASM8, AXP1275, BMS639623, CM101, DPC168, GW766994, GW824575, MT0814, OPLCCL11LPM и QAP642, ингибиторов CCR4, как например AT008, AZD2098, CCX6239, FLX193, FLX475, GBV3019, GSK2239633, IC487892 и потелигео, ингибиторов CCR5, как например 5P12-RANTES, AZD5672, AZD8566, CMPD167, ESN196, GSK706769, GW873140, HGS004, INCB15050, INCB9471, L872, микробицид, PF232798, PRO140, RAP101, SAR113244, SCH350634, SCH351125, SCH417690, селзентри, TAK779, TBR220, TD0232 и VX286, ингибиторов CCR5/CXCR4, как например AMD887, ND401 и SP01A, ингибиторов CCR6, как например CCX507, CCX9664 и STIB100X, ингибиторов CCR6, как например CCX025, CCX507, CCX807, eut22, MLN3126, POL7085, трафицет- EN, ингибиторов CXCR3, как например AMG487, AT010, STIA120X, ингибиторов CXCR4, как например AD114, AD214, ALX0651, ALX40- 4C, AMD070, AT007, AT009, BKT170, BMS936564, селиксафор, CTCE9908, GBV4086, GSK812397, KRH2731, KRH3140, LY2510924, LY2624587, мозобил, OPLCXCL12LPM, PF06747143, POL6326, Q122, ревиксил, TG0054, USL311, X4P001 и X4P002, и ингибиторов CXCR7, как например CCX650 и CCX662.

Агонисты цитокинового рецептора могут быть выбраны из группы, состоящей из мРНК, ДНК или плазмид, кодирующих гены IL- 2, IL -15, IL- 7, IL-10, IL -12, IL- 21, IFN α 1- 17, IFN β , IFN γ , IL -18, IL- 27, TNF α , GM-CSF, FLT3L, LT α , LT β и TRAIL и рекомбинантные белки, как например, агонисты IL- 2/IL -15 β/γ рецепторов, агонисты IL- 10 рецептора, агонисты IL -12 рецептора, агонисты IL -18 рецептора, агонисты IL- 21 рецептора, агонисты IL- 7 рецептора, агонисты IFN α/β рецептора, агонисты IFN γ рецептора, агонисты FLT3 рецептора, агонисты GM-CSF рецептора, агонисты LT α рецептора, агонисты LT β рецептора и агонисты TNF α рецептора.

Примерами агонистов IL-10 рецептора являются AG011, декавил, EG10, IL10Nаносар, илодекакин, AM0010, теновил и VT310 VIRON.

Примерами агонистов IL-12 рецептора являются рекомбинантный IL-12 p70, рекомбинантный IL-12 p35, AM0012, AS1409, dodekin, НемаМах, LipoVIL12, MSB0010360N, Ad-RTS-hIL-12, тавокиноген телсеплазида, ехoIL-12 и NHS-IL12.

Примером агониста IL -18 рецептора является SB485232.

Примером агониста IL- 21 рецептора является BMS982470 (дененикокин).

Примерами агониста IL- 7 рецептора являются CYT107, CYT99007 и GX- I7.

Примером агониста FLT3R является CDX-301.

Примерами агониста TNF α рецептора являются L19-TNF α , ауримун, беромун, BreMel/TNF α , фибромун, рефнот и TNFPEG20.

Агонисты рецепторов смерти могут быть выбраны из группы, состоящей из TRAILR1/DR4 агонистов, как например, AMG951 (дуланермин), APG350, APG880, HGSETR1 (мапатумумаб) и SL231, и TRAILR2/DR5 агонистов, как например, AMG655, DS8273, HGSETR2 (лексатумумаб), HGSTR2J, IDD004/GEN1029, INBRX109, LBY135, MEDI3039, PRO95780, RG7386 и TAS266.

Антагонисты CD47 могут быть выбраны из группы, состоящей из ALX148, CC-90002, Hu5F9G4, SRF231, TI061, TTI-621, TTI-622, AO176, IBI188, IMC002, рекомбинантный SIRP α и LYN00301.

Примером антагониста SIRP α является FSI89 или рекомбинантный CD47.

Примерами онколитических лекарственных средств являются CAVATAK, BCG, мобилан, TG4010, Pexa- Vec (JX- 594), JX- 900, JX- 929 и JX- 970.

Примерами преобразующих сигнал белков являются Fn14-TRAIL (KAHR101), CD80-Fc (FTP155), CTLA4-FasL (KAHR102), PD1-41BBL (DSP 105), PD-L1-41BB (PRS-344, NM21-1480, FS222), PD1-CD70 (DSP 106) и SIRP α -41BBL (DSP 107).

Эпигенетические модификаторы могут быть выбраны из группы, состоящей из ингибиторов ДНК метилтрансферазы, ингибиторов лизин-специфической деметилазы 1, ингибиторов Zeste гомолога 2, ингибиторов белка бромодомена и внеконцевого мотива (BET), как например, GSK525762, и ингибиторов гистондеацетилазы (HDAC), как например, beleodaq, SNDX275 и CKD- M808.

Примерами опухолевых пептидов/противоопухолевых вакцин являются NY-ESO, WT1, MART-1, IO102 и PF-06753512, а также персонализированные противораковые вакцины с использованием опухолевых последовательностей или неоантигенов, полученных от пациентов.

Примерами ингибиторов белка теплового шока (HSP) являются ингибиторы HSP90, как например, PF- 04929113 (SNX- 5422).

Примерами протеолитических ферментов являются рекомбинантная гиалуронидаза, как например, гHuPH20 и PEGPH20.

Убиквитиновые и протеасомные ингибиторы могут быть выбраны из группы, состоящей из ингибиторов убиквитин-специфической протеазы (USP), например, P005091, ингибиторов протеасомы 20S, как например, бортезомиб, карфилзомиб, иксазомиб, опрозомиб, деланзомиб и целастрол, и ингибиторов иммунопротеасом, как например, ONX-0914.

Антагонисты молекул адгезии могут быть выбраны из группы, состоящей из антагонистов β 2-интегрина, как например, и антагонистов селектина.

Гормоны могут быть выбраны из группы, состоящей из агонистов рецепторов гормонов и антагонистов рецепторов гормонов.

Примером агониста рецептора гормона является агонисты соматостатинового рецептора, как например, соматостатин, ланреотид, октреотид, FX125L, FX141L и FX87L.

Примерами антагонистов рецепторов гормонов являются антиандрогены, антиэстрогены и антипрогестагены. Примерами антиандрогенов являются стероидные антиандрогены, как например, ципротерон ацетат, мегестрол ацетат, хлормадион ацетат, спиронолактон, оксендолон и осатерон ацетат, нестероидные антиандрогены, например, флутамид, бикалутамид, нилутамид, топилутамид, энзалутамид и апалутамид, ингибиторы синтеза андрогенов, например, кетоконазол, абиратерона ацетат, севитеронел, аминоглютетимид, финастерид, дутастерид, эпристерид и альфатрадиол. Примерами антиэстрогенов являются селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), как например, тамоксифен, кломифен, фарестон и ралоксифен, молчащие антагонисты ER и селективный деградатор рецепторов эстрогена (SERD), например, фулвестрант, ингибиторы ароматазы, как, например, анастрозол, летрозол, экземестан, ворозол, форместан и фадрозол, и антигонадотропины, как например, тестостерон, прогестагены и аналоги GnRH. Примерами антипрогестагенов являются мифепристон, лилопристон и онапристон.

Примеры клеточной терапии включают терапию CAR, такую как терапия CAR-T, такая как тисагенлеклеуцел, аксикабтаген цилолеуцел, bb21217, LCAR-B38M, JCARH125, MCARH171, JNJ-4528, идекабтагеновая виклеуцель (bb2121), SCRI-CAR19x22; CAR-терапии, нацеленные на опухолевые антигены, такие как CAR-терапии, нацеленные на клетки, экспрессирующие CD19, CAR-терапии, нацеленные на клетки, экспрессирующие CD22, CAR-терапии, нацеленные на клетки, экспрессирующие BCMA, CAR-терапии, нацеленные на клетки, экспрессирующие HER2, CAR-терапии, нацеленные на клетки, экспрессирующие CD138, CAR-терапии, нацеленные на клетки, экспрессирующие CD133,

CAR терапия, нацеленная на клетки, экспрессирующие BCMA, терапия CAR, нацеленная на клетки, экспрессирующие SEA, терапия CAR, нацеленная на клетки, экспрессирующие Claudin 18.2, терапия CAR, нацеленная на клетки, экспрессирующие EGFR, терапия CAR, нацеленная на клетки, экспрессирующие EGFRvIII, терапия CAR, нацеленная на клетки, экспрессирующие Eph2A, терапия CAR, нацеленная на клетки, экспрессирующие EpCAM, CAR терапия, нацеленная на клетки, экспрессирующие GD2, терапия CAR, нацеленная на клетки, экспрессирующие GPC3, терапия CAR, нацеленная на клетки, экспрессирующие MSLN, терапия CAR, нацеленная на клетки, экспрессирующие 5T4, терапия CAR, нацеленная на клетки, экспрессирующие LMP1, терапия CAR, нацеленная на клетки, экспрессирующие PD-L1, терапия CAR, нацеленная на клетки, экспрессирующие PSMA, Терапия CAR, нацеленная на клетки, экспрессирующие FR α , и терапия CAR, нацеленная на клетки, экспрессирующие MUC1. Примеры клеточной терапии включают терапию TIL, NK-терапию, цитокин-индуцированную терапию NK-клетками памяти, терапию NK-клетками с размноженными *ex vivo* клетками. Примеры клеточной терапии включают терапию $\alpha\beta$ или $\gamma\delta$ Т-клетками, которые могут быть сконструированы для экспрессии опухолевого антигена или опухолевого неоантиген-специфического Т-клеточного рецептора или которые могут быть размножены в контексте опухолевого антигена или опухолевых неоантигенов.

Согласно определенным вариантам осуществления белок IL-2 формулы (I), конъюгат IL-2 или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению, вместе с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами вызывают распространение эпитопа. Распространение эпитопов имеет преимущества, описанные в другом месте настоящего документа. Согласно определенным вариантам осуществления одним таким дополнительным лекарственным средством является конъюгат, содержащий полимер, к которому присоединены один или несколько фрагментов формулы (Ai), как описано в другом месте настоящего документа.

Согласно определенным вариантам осуществления пациент представляет собой млекопитающего, такого как пациент-человек.

Введение белка IL-2 формулы (I), конъюгата IL-2 или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, можно осуществлять путем наружного применения, инъекции или инфузии, включая внутрисуставное, периартикулярное, внутрисуставное, подкожное, внутримышечное, внутривенное, внутрикостное, внутрибрюшинное введение, интратекальная, интракапсулярная, интраорбитальная, интравитреальная, интратимпанальная, внутрипузырная, интракардиальная, транстрахеальная, субкутикулярная, субкапсулярная, субарахноидальная,

интраспинальная, интравентрикулярная, интрастернальная инъекция и инфузия, прямая доставка в головной мозг с помощью имплантированного устройства, позволяющего доставлять изобретение или тому подобное в головной мозг тканевые или мозговые жидкости (например, резервуар Оммайя), прямая интрацеребровентрикулярная инъекция или инфузия, инъекция или инфузия в мозг или связанные с мозгом области, инъекция в субхориоидальное пространство, ретроорбитальная инъекция и инстилляция в глаза, предпочтительно посредством подкожной инъекции. Согласно определенным вариантам осуществления введение осуществляется посредством подкожной инъекции.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат П-2 согласно настоящему изобретению содержит белок П-2 формулы (I), экспрессированный в системе млекопитающих.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат П-2 согласно настоящему изобретению, содержащий белок П-2 формулы (I), экспрессированный в системе экспрессии млекопитающих, может после введения яванским макакам проявлять по меньшей мере в 1,1 раза более продолжительное, например, по меньшей мере, в 1,2 - кратное, 1,3-кратное, 1,4-кратное, 1,5-кратное или 2-кратное фармакокинетическое время полужизни *in vivo* высвобожденного белка П-2, чем у соответствующего конъюгата П-2, содержащего белок П-2, имеющий последовательность белка П-2 формулы (I) без N-концевого аланина, где белок П-2 без N-концевого аланина экспрессировали в системе экспрессии *E. coli*.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат П-2 согласно настоящему изобретению, содержащий белок П-2 формулы (I), экспрессированный в системе экспрессии млекопитающих, может после введения яванским макакам проявлять по меньшей мере в 1,1 раза более продолжительное, например, по меньшей мере, в 1,2 - кратный, 1,3-кратный, 1,4-кратный, 1,5-кратный или 2-кратный период полувыведения конъюгата П-2 из циркуляции *in vivo* по сравнению с соответствующим конъюгатом П-2, содержащим белок П-2, имеющий последовательность белка П-2 формула (I) без N-концевого аланина, где белок П-2 без N-концевого аланина был экспрессирован в системе экспрессии *E. coli*.

Согласно определенным вариантам осуществления конъюгат П-2 согласно настоящему изобретению, содержащий белок П-2 формулы (I), экспрессированный в системе экспрессии у млекопитающих, проявляет после введения яванским макакам по меньшей мере в 1,1 раз более высокое, например по меньшей мере 1,2-кратное, 1,3-кратное, 1,4-кратное, 1,5-кратное или 2-кратное, значение пика или площади под кривой (AUC) по меньшей мере для одного типа клеток, выбранного из группы, состоящей из

CD8+ Т клеток, (CD28+ CD95+) CD8+ Т клеток памяти, NK клеток, $\gamma\delta$ Т клеток, процента Ki67+ клеток в CD8+ Т клетках, процента Ki67+ клеток в (CD28+ CD95+) CD8+ Т клетках памяти, процента Ki67+ клеток в NK клетках и процента Ki67+ клеток в $\gamma\delta$ Т клетках по сравнению с введением соответствующего конъюгата П-2, содержащего белок П-2, имеющего последовательность белка П-2 формулы (I) без N-концевого аланина, где белок П-2 без N-концевого аланина экспрессировали в системе экспрессии *E. coli*.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к последовательности белка П-2 формулы (I-i)

SEQ A – Cys* – SEQ B (I-i),

где

SEQ A имеет по меньшей мере 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO:1,

SEQ B имеет по меньшей мере 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO:2,

Cys* представляет собой остаток цистеина.

Конкретные варианты осуществления SEQ A и SEQ B являются такими, как раскрыто для белка П-2 формулы (I).

Согласно определенным вариантам осуществления белок П-2 формулы (I-i) имеет последовательность SEQ ID NO:21.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к олигонуклеотидной последовательности, кодирующей белок П-2 формулы (I-i). Конкретные варианты осуществления таких олигонуклеотидов раскрыты в настоящем документе для олигонуклеотидов, кодирующих белок П-2 формулы (I).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к конъюгату, содержащему один или несколько белков П-2 формулы (I-i). Конкретные варианты осуществления этого конъюгата, содержащего один или несколько белков П-2 формулы (I-i) раскрыты в настоящем документе для конъюгатов, содержащих один или несколько белков П-2 формулы (I).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один белок П-2 формулы (I-i) или по меньшей мере один конъюгат П-2, содержащей один или несколько таких белков П-2 формулы (I-i) и по меньшей мере один эксципиент. Конкретные варианты осуществления такой фармацевтической композиции раскрыты в настоящем документе для фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один белок П-2 формулы (I) или по меньшей мере один конъюгат П-2, содержащий один или несколько белков П-2 формулы (I).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к белку П-2 формулы (I-i), конъюгату П-2, содержащему по меньшей мере один белок П-2 формулы (I-i), или фармацевтической композиции, содержащей такой белок П-2 или конъюгат П-2, для применения в качестве лекарственного средства.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к белку П-2 формулы (I-i), конъюгату П-2, содержащему по меньшей мере один белок П-2 формулы (I-i) или фармацевтическую композицию, содержащую такой белок П-2 или конъюгат П-2, для применения для лечения заболевания, которое можно лечить с помощью П-2. Конкретные варианты осуществления заболевания, которое можно лечить с помощью П-2, раскрыты в настоящем документе.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к белку П-2 формулы (I-i), конъюгату П-2, содержащему по меньшей мере один белок П-2 формулы (I-i), или фармацевтическую композицию, содержащую такой белок П-2 или конъюгат П-2, для получения лекарственного средства для лечения заболевания, которое можно лечить с помощью П-2. Конкретные варианты осуществления заболевания, которое можно лечить с помощью П-2, раскрыты в настоящем документе.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения, контроля, отсрочки или предотвращения у пациента-человека, нуждающегося в лечении, одного или нескольких заболеваний, которые можно лечить с помощью П-2, включающему стадию введения указанному пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества белка П-2 формулы ((I-i), конъюгата П-2, содержащего по меньшей мере один белок П-2 формулы ((I-i), или фармацевтической композиции, содержащей такой белок П-2 или конъюгат П-2. Конкретные варианты осуществления заболевания, которое можно лечить с помощью П-2, раскрыты в настоящем документе.

Согласно определенным вариантам осуществления белок П-2 формулы (I-i), конъюгат П-2, содержащий по меньшей мере один белок П-2 формулы (I-i), или фармацевтическую композицию, содержащую такой белок П-2 или конъюгат П-2, вводят пациенту до, одновременно с или после введения одного или нескольких дополнительных лекарственных средств. Конкретные варианты осуществления такого одного или нескольких дополнительных лекарственных средств раскрыты в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления П-2 имеет последовательность SEQ ID NO:21, и одно дополнительное лекарственное средство, которое должно быть введено пациенту, представляет собой конъюгат, содержащий полимер, с которым конъюгированы

один или несколько фрагментов формулы (A_i), как описано в другом месте настоящего документа.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к последовательности белка PL-2 формулы (I-ii)

X – SEQ A – Cys* – SEQ B (I-ii),

где

SEQ A имеет по меньшей мере 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO:1,

SEQ B имеет по меньшей мере 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO:2,

X представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина, и

Cys* представляет собой остаток цистеина.

Конкретные варианты осуществления SEQ A и SEQ B являются такими, как раскрыто для белка PL-2 формулы (I).

Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток аргинина. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток аспарагина. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток аспарагиновой кислоты. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток цистеина. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток глутамина. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток глутаминовой кислоты. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток глицина. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток гистидина. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток изолейцина. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток лейцина. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток лизина. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток метионина. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток фенилаланина. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток серина. Согласно

определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток треонина. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток триптофана. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток тирозина. Согласно определенным вариантам осуществления X формулы (I-ii) представляет собой остаток валина.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к олигонуклеотидной последовательности, кодирующей белок П-2 формулы (I-ii). Конкретные варианты осуществления таких олигонуклеотидов раскрыты в настоящем документе для олигонуклеотидов, кодирующих белок П-2 формулы (I), за исключением того, что белок П-2 формулы (I) замещен белком П-2 формулы (I-ii).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к конъюгату, содержащему один или несколько белков П-2 формулы (I-ii). Конкретные варианты осуществления этого конъюгата, содержащего один или несколько белков П-2 формулы (I-ii) раскрыты в настоящем документе для конъюгатов, содержащих один или несколько белков П-2 формулы (I), за исключением того, что белок П-2 формулы (I) замещен белком П-2 формулы (I-ii).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один белок П-2 формулы (I-ii) или по меньшей мере один конъюгат П-2, содержащей один или несколько таких белков П-2 формулы (I-ii) и по меньшей мере один эксципиент. Конкретные варианты осуществления такой фармацевтической композиции раскрыты в настоящем документе для фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один белок П-2 формулы (I) или по меньшей мере один конъюгат П-2, содержащий один или несколько белков П-2 формулы (I), за исключением того, что белок П-2 формулы (I) замещен белком П-2 формулы (I-ii).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к белку П-2 формулы (I-ii), конъюгату П-2, содержащему по меньшей мере один белок П-2 формулы (I-ii), или фармацевтической композиции, содержащей такой белок П-2 или конъюгат П-2, для применения в качестве лекарственного средства/

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к белку П-2 формулы (I-ii), конъюгату П-2, содержащему по меньшей мере один белок П-2 формулы (I-ii) или фармацевтическую композицию, содержащую такой белок П-2 или конъюгат П-2, для применения для лечения заболевания, которое можно лечить с помощью П-2. Конкретные

варианты осуществления заболевания, которое можно лечить с помощью П-2, раскрыты в настоящем документе.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к белку П-2 формулы (I-ii), конъюгату П-2, содержащему по меньшей мере один белок П-2 формулы (I-ii), или фармацевтическую композицию, содержащую такой белок П-2 или конъюгат П-2, для получения лекарственного средства для лечения заболевания, которое можно лечить с помощью П-2. Конкретные варианты осуществления заболевания, которое можно лечить с помощью П-2, раскрыты в настоящем документе.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения, контроля, отсрочки или предотвращения у пациента-млекопитающего, предпочтительно пациента-человека, нуждающегося в лечении, одного или нескольких заболеваний, которые можно лечить с помощью П-2, включающему стадию введения указанному пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества белка П-2 формулы ((I-ii), конъюгата П-2, содержащего по меньшей мере один белок П-2 формулы ((I-ii), или фармацевтической композиции, содержащей такой белок П-2 или конъюгат П-2. Конкретные варианты осуществления заболевания, которое можно лечить с помощью П-2, раскрыты в настоящем документе.

Согласно определенным вариантам осуществления белок П-2 формулы (I-ii), конъюгат П-2, содержащий по меньшей мере один белок П-2 формулы (I-ii), или фармацевтическую композицию, содержащую такой белок П-2 или конъюгат П-2, вводят пациенту до, одновременно с или после введения одного или нескольких дополнительных лекарственных средств. Конкретные варианты осуществления такого одного или нескольких дополнительных лекарственных средств раскрыты в настоящем документе.

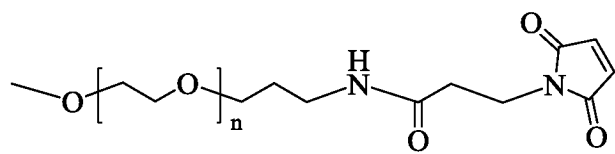
Материалы и способы

Материалы

Все материалы были коммерчески доступны, если не указано иное.

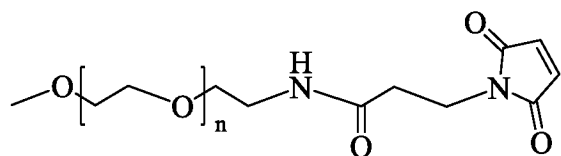
Определение концентрации белковых растворов проводили на Tecan Infinite M200 с использованием УФ-кюветы micro (neoLAB) и следующих условиях: длина оптического пути 1 см; длина волны поглощения 280 нм; полоса пропускания длин волн поглощения 5 нм; эталонная длина волны 338 нм; полоса опорной длины волны 25 нм; количество вспышек 25. Расчет концентрации был основан на расчетной молекулярной массе белка без учета гликозилирования или ПЭГилирования и расчете коэффициента экстинкции на основе последовательности.

Малеимид ПЭГ 5 кДа был приобретен у NOF Europe (Sunbright ME-050MA, CAS 883993-35-9, NOF Europe N.V., Grobendonk, Belgium) и имел структуру



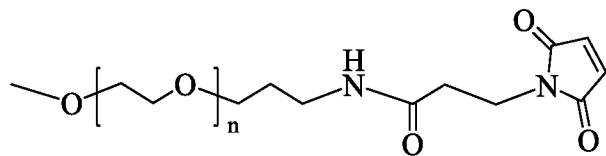
, где n представляет собой целое число в интервале от 100 до 125, и среднюю молекулярную массу 5 кДа.

Малеимид ПЭГ 5 кДа был приобретен у компании Jenkem Technology (M-Mal-5000, Jenkem Technology Co., Beijing, China) и имел структуру



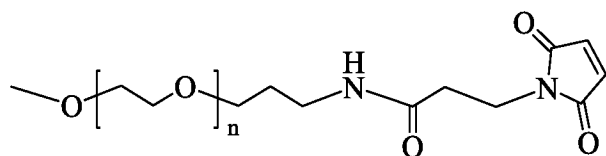
, где n представляет собой целое число в интервале от 100 до 125, и среднюю молекулярную массу 5 кДа.

Малеимид ПЭГ 10 кДа был приобретен у NOF Europe (Sunbright ME-100MA, CAS 883993-35-9, NOF Europe N.V., Grobendonk, Belgium) и имел структуру



, где n представляет собой целое число в интервале от 200 до 250, и среднюю молекулярную массу 10 кДа.

Малеимид ПЭГ 30 кДа был приобретен у NOF Europe (Sunbright ME-300MA, CAS 883993-35-9, NOF Europe N.V., Grobendonk, Belgium) и имел структуру



, где n представляет собой целое число в интервале от 650 до 700, и среднюю молекулярную массу 30 кДа.

Примеры

Пример 1: Экспрессия мутеинов M1 и Ala-M1 IL-2 в *Pichia pastoris*

Последовательности ДНК, кодирующие мутеин IL-2 M1 (SEQ ID NO:16) и мутеин IL-2 Ala-M1 (SEQ ID NO:17), были получены обратной трансляцией аминокислотных последовательностей (M1 = эталонный материал без N-концевого аланина, SEQ ID NO:18 и Ala-M1, SEQ ID NO:14). Последовательности ДНК были созданы на основе обратно транслированных аминокислотных последовательностей и впоследствии оптимизированы по кодонам для экспрессии в *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*). ДНК, кодирующая M1

и Ala-M1, была специально синтезирована и клонирована. В этих клонирующих векторах последовательности ДНК, кодирующие M1 и Ala-M1, фланкированы сайтами рестрикции BspQ1.

Вектор экспрессии содержал промотор *GI-3* (индуцируемый глюкозой), сайт интеграции *AOXI* TT (единственная копия), сигнальную последовательность альфа-фактора спаривания (α MF), фрагмент *lacZ* только для целей клонирования и устойчивость к Zeocin™. Для экспрессии M1 в *Pichia pastoris*, плазмиду pCSP1007 (SEQ ID NO:19) конструировали путем лигирования линейного фрагмента BspQ1 размером примерно 4440 п.о. экспрессионного вектора, содержащего лидерную последовательность α MF, с линейным расщепленным фрагментом BspQ1 размером 399 п.о. из клонирующего вектора. Для экспрессии Ala-M1 в *Pichia pastoris* плазмиду pCKP1036 (SEQ ID NO:20) конструировали аналогичным образом путем лигирования фрагмента BspQ1 длиной приблизительно 4440 п.о. экспрессионного вектора с линейным расщепленным фрагментом BspQ1 длиной 402 п.о. из клонирующего вектора. Затем химически компетентные клетки DH10B трансформировали смесью для лигирования. После очистки плазмиды и рестрикционного анализа представляющий интерес ген во вновь созданных плаزمиде подтверждали секвенированием, и штамм LP2 (CBS7435) трансформировали линейаризованными плаزمидами pCSP1007 или pCKP1036 для последующего множественного скрининга копий.

После линейаризации плазмид pCSP1007 и pCKP1036 с помощью AscI штамм LP2 трансформировали линейаризованными плазмидами и высевали на чашки с агаром, содержащие различные концентрации Zeocin™ (Invitrogen) (500 и 1000 мкг/мл). После инкубации при 30°C в течение 48 часов отбирали 11–12 клонов на интеграцию хозяин/плазида и высевали штрихами на планшеты master (содержащие 100 мкг/мл Zeocin™) для последующего скрининга экспрессии в 24-луночных планшетах.

Эксперименты по экспрессии проводили на 24-луночных планшетах (GE Healthcare Life Sciences), содержащих сложные среды. Основные культуры (2 мл) инокулировали до начальной OD600, равной 4, ночными культурами, выращенными при 30°C в YPG (дрожжевой пептон-глицерин). Затем культуры инкубировали при 25°C и встряхивании со скоростью 260 об/мин и индуцировали ограничением уровня глюкозы в течение 48 часов.

Обнаружение продукта в культуральном супернатанте проводили с помощью SDS-PAGE с окрашиванием кумасси. SDS-PAGE проводили в восстанавливающих условиях. Готовые гели Criterion 12% Bis-Tris SDS (Bio-Rad) использовали с буфером MES (Bio-Rad). Образцы смешивали с загрузочным буфером NuPAGE 4x LDS (Invitrogen) и инкубировали в течение 5 мин при 95°C. На каждую дорожку загружали 20 мкл образца

(30 мкл культурального супернатанта плюс 10 мкл 4х загрузочного буфера LDS). В качестве стандарта молекулярной массы загружали Mark12 (Invitrogen). В качестве эталона загружали 2 мкг рекомбинантного IL-2, приобретенного у Abcam. Электрофорез проводили в течение примерно 80 мин при 200 В. Разделенные белки визуализировали путем окрашивания реагентом GelCode Blue Stain Reagent (Thermo Scientific) в течение 1–2 ч и обесцвечивали водой в течение ночи.

Обнаружение продукта также проводили вестерн-блоттингом. Для этой цели проводили SDS-PAGE в восстанавливающих условиях. Готовые гели Criterion 12% Bis-Tris SDS (Bio-Rad) использовали с буфером MES (Bio-Rad). Образцы смешивали с загрузочным буфером NuPAGE 4x LDS, восстанавливающими условиями (Invitrogen) и инкубировали в течение 5 мин при 95°C. На каждую линию загружали 20 мкл образца (30 мкл культурального супернатанта плюс 10 мкл 4х загрузочного буфера LDS). В качестве стандарта молекулярной массы загружали SuperSignal Enhanced Molecular Weight Protein Ladder (Thermo Scientific). В качестве эталона загружали 0,5 мкг рекомбинантного IL-2, приобретенного у Abcam. Электрофорез проводили в течение около 60 мин при 200 В. Разделенные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) с помощью Turboblot (Bio-Rad) в течение 7 минут при 25 В. Затем блоты инкубировали в течение 1 ч в блокирующем буфере (TBS + 5 % сухого молока (Merck)). Затем мембрану инкубировали в течение 1 часа в растворе первичного антитела (TBST + 1,5% сухое молоко + 0,1-0,2 мкг/мл кроличьего антитела к IL-2 (AbCam)). После промывки в течение 3х5 минут в воде MQ мембрану инкубировали в течение 60 минут в растворе вторичных антител (TBST + 1,5% сухое молоко + 1:1000 антикроличий IgG-HRP (AbCam)). После промывки (4 раза по 5 минут в TBST) блот помещали в раствор субстрата Lumi-Light (набор Roche LumiLight) и анализировали с помощью системы визуализации GeneGnome.

Результаты: Среди протестированных клонов M1 с помощью SDS-PAGE/окрашивания Кумасси можно было идентифицировать отсутствие или очень небольшое количество секретируемого продукта M1 в культуральном супернатанте. Отобранные образцы анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антител против IL-2, подтверждая наличие продукта M1 в культуральном супернатанте. Однако при ожидаемой молекулярной массе можно было обнаружить только очень слабую полосу, тогда как в дополнение к слабым полосам разложения наблюдалась значительная агрегация продукта.

В отличие от M1 вестерн-блот для образцов, содержащих Ala-M1, показал полосу ожидаемого размера, подтверждающую экспрессию и секрецию Ala-M1. Также была обнаружена слабая полоса, указывающая на образование димера.

Пример 2: Экспрессия мутеина IL-2 M1 и мутеина IL-2 Ala-M1 в CHO

Клетку-хозяина CHO K1 культивировали в среде CD CHO (Invitrogen), содержащей 4 mM глутамин (JT Baker) и 1% добавки HT (Invitrogen) к PDL 30-100, перед транзиентной трансфекцией продуктом. Клетки-хозяева CHO K1 культивировали в пакете WAVE (36,5 °C, pH 6,9-7,2, DO 40-100%).

Аминокислотные последовательности M1 (SEQ ID NO:18) и Ala-M1 (SEQ ID NO:14) были обратно транслированы и оптимизированы по кодонам для экспрессии в клетках CHO, каждая в комбинации с двумя разными N-концевыми сигнальными последовательностями секреции, S1 (SEQ ID NO:47) и S2 (SEQ ID NO:48). Полученные последовательности ДНК, кодирующие S1-M1, S2-M1, S1-Ala-M1 и S2-Ala-M1, были специально синтезированы и клонированы в вектор экспрессии по ходу транскрипции от промотора цитомегаловируса человека (CMV). В дополнение к промотору CMV вектор экспрессии содержал сигнал полиаденилирования тимидинкиназы (TK рA), начало репликации рUC и ген устойчивости к ампициллину (bla). Полученные плазмиды (P1 для S1-M1, P2 для S2-M1, P3 для S1-Ala-M1 и P4 для S2-Ala-M1) maxi-препарировали из клеток *E.coli Top10* с использованием набора NucleoBond Xtra Maxi Kit (Macherey Nagel) для транзиентной экспрессии в клетках CHO K1.

Транзиентную трансфекцию проводили во встряхиваемых колбах путем смешивания клеток-хозяев CHO K1 с полиэтиленимином и плазмидной ДНК. 6 мг ДНК трансфицировали в каждый 1 л клеток при $\sim 16 \times 10^6$ клеток/мл, и массовое соотношение между ДНК и PEI составляло 1:3. Клетки-хозяева CHO K1 культивировали путем перфузии со средой CD CHO в пакетах WAVE за 96 часов до трансфекции. Плотность клеток подсчитывали с использованием Vi-CELL (Beckman Coulter). Фиксированный объем культуры клеток-хозяев разводили средой BM003H (WuXi Biologics) в соотношении 1:1. Плотность клеток доводили до приблизительно 18×10^6 клеток/мл предварительно подогретой свежей средой BM017H перед трансфекцией. Разбавленные клетки-хозяева перед использованием инкубировали в шейкере (36,5 °C, влажность 85%, 6% CO₂, 120 об/мин).

Культуры трансфицированных клеток инкубировали в шейкерах Kuhner при 36,5 °C, влажности 85%, 6% CO₂, 120 об/мин в течение 4 часов. Добавляли добавки и затем трансфицированные культуры инкубировали в шейкере Kuhner при 31 °C, влажности 85%, 6% CO₂, 120 об/мин в течение 14 дней. Добавки вводили на 4-й, 7-й и 11-й день после трансфекции в зависимости от жизнеспособности клеток и VCD. В культуры добавляли

глюкозу для поддержания уровня глюкозы > 2 г/л. Культуры собирали на 14-й день или когда жизнеспособность клеток была ниже 60%.

Детекцию продукта проводили вестерн-блоттингом. Посевы собирали на 14-й день после трансфекции. 0,5 мл клеточной культуры центрифугировали при 12 000 g в течение 30 мин, супернатанты сохраняли для вестерн-блоттинга. Осадки клеток собирали и повторно суспендировали в 0,5 мл PBS, а затем разрушали ультразвуком при 4 °C. Раствор для обработки ультразвуком центрифугировали при 12 000 g в течение 30 мин. Общий раствор для обработки ультразвуком и супернатант, разделенные центрифугированием, собирали для Вестерн-блоттинга.

1 мкл образца из супернатантов среды для культивирования клеток (CMS), супернатантов после ультразвукового лизиса клеток (CLS) и общего лизиса клеток под действием ультразвука (CLT) добавляли в 10 мкл 2X буфера для образцов с уменьшенным содержанием LDS (Invitrogen). Восстановленные смеси нагревали при 95°C в течение 5 мин. Все восстановленные образцы загружали в предварительно отлитые гели NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Invitrogen). SDS-PAGE проводили при постоянном напряжении 180 В в течение 40 мин. Образцы переносили с SDS-PAGE на мембрану PVDF. Процесс переноса выполнялся при 25 В и 1,3 А в течение 7 мин. Мембрану PVDF инкубировали с буфером Blocker (Bio-Rad) в течение 30 мин. После блокирования мембрану PVDF инкубировали с первичным антителом (антитело к IL-2, полученное у кур, Sigma) в течение 2 ч при комнатной температуре. Мембрану PVDF промывали TBST 3 раза по 5 мин. После этого мембрану PVDF инкубировали со вторичным антителом (вторичное антитело козы против куриного IgY (H+L), HRP, Invitrogen) в течение 2 ч при комнатной температуре. Мембрану PVDF промывали TBST 3 раза по 5 мин. Субстратные растворы ECL A и B (Bio-Rad) смешивали и добавляли к мембране PVDF для инкубации в течение 2 минут. Мембрану PVDF анализировали с помощью системы визуализации Chemi DOC MP (Bio-Rad).

Вестерн-блот анализ уменьшенных образцов культуральных супернатантов из клеток, трансфицированных S1-M1 P1 и S2-M1 P2, показал почти неопределяемые уровни продукта IL-2 ожидаемого размера, тогда как в супернатантах клеток, трансфицированных S1-Ala-M1 P3 и S2-Ala-M1 P4 обнаруживали полосы чистого продукта ожидаемого размера. Для всех образцов наблюдалась двойная полоса продукта IL-2, как и ожидалось для негликозилированного и O-гликозилированного продукта. Концентрация секретируемого продукта в супернатантах была определена количественно и составила приблизительно 6 мг/л для S1-M1 P1 и S2-M1 P2, 76 мг/л для S1-Ala-M1 P3 и 148 мг/л для S2-Ala-M1 P4.

Вестерн-блот анализ уменьшенных образцов из лизированных клеток показал четкую полосу ожидаемого размера для всех образцов. Концентрация продукта в образцах лизиса клеток была определена количественно и составила 153 мг/л для S1-M1 P1, 161 мг/л для S1-Ala-M1 P3 и 209 мг/л для S2-Ala-M1 P4. Таким образом, доля секретируемого продукта в общем продукте (секретируемый продукт/[секретируемый продукт + внутриклеточный продукт]) составляла приблизительно 4 % для S1-M1 P1, 32 % для S1-Ala-M1 P3 и 41 % для S2-Ala-M1 P4).

Пример 3: Очистка культуральных супернатантов

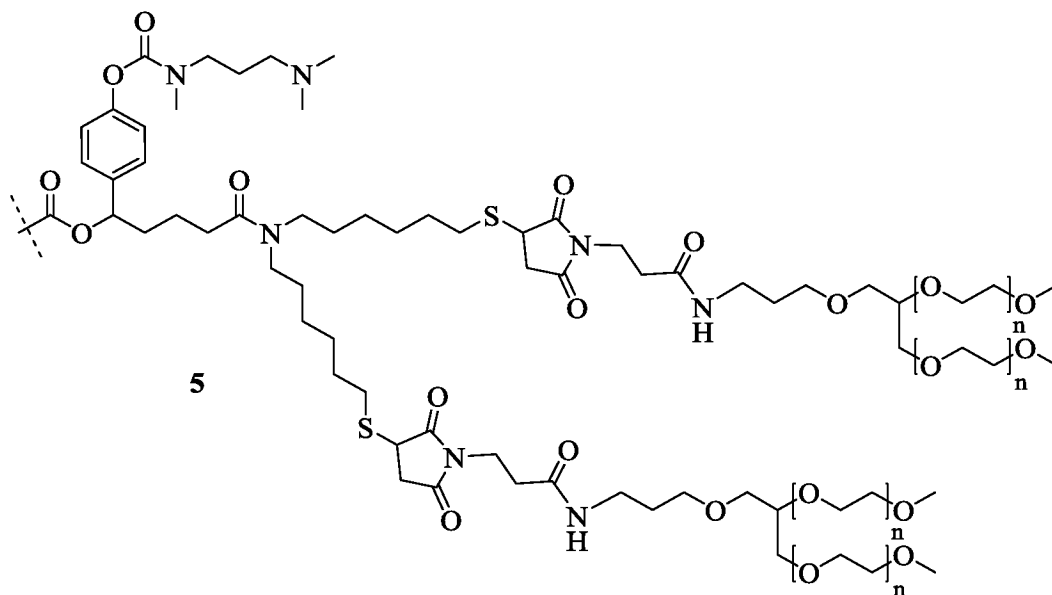
Посевы собирали на 14-й день центрифугированием при 8000 g в течение 40 мин. Отфильтрованные супернатанты очищали для дальнейшей характеристики мутеина IL-2 Ala-M1. Супернатант концентрировали и наносили на колонку для препаративания Superdex 75 (GE Healthcare Life Sciences, теперь Cytiva), уравновешенную 25 мМ Трис, 200 мМ NaCl, pH 8,0. Фракции анализировали с помощью SDS-PAGE и объединяли фракции, содержащие целевой белок. Дальнейшую очистку проводили катионообменной хроматографией на колонке SP Sepharose HP (GE Healthcare Life Sciences, теперь Cytiva), уравновешенной 25 мМ Na-ацетатом, pH 5,5. Перед загрузкой белковый пул доводили до pH 5,5 и разбавляли водой. Элюцию проводили линейным градиентом соли. Фракции анализировали с помощью SDS-PAGE, и фракции, содержащие целевой белок, объединяли, чтобы получить очищенный мутеин IL-2 Ala-M11 (SEQ ID NO:14 с дополнительным цистеином или глутатионом, связанным с тиоловой группой цистеина в положении 38 через дисульфидный мостик).

Пример 4: Получение полимерного пролекарства 5 мутеина IL-2 Ala-M1

45 мл очищенного мутеина IL-2 Ala-M1 1 (SEQ ID NO:14), составленный в концентрации 0,2 мг/мл в 25 мМ ацетата натрия, 200 мМ NaCl, pH 5,5, смешивали с 13,5 мл 0,5 М фосфата натрия, pH 7,4 и концентрировали в Amicon Ultra-15, Ultracel 3K фильтрах с центрифугированием (Merck Millipore) до 3,1 мл с 1 на 2,5 мг/мл. 9,1 мг ТСЕР растворяли в 635 мкл PBS, pH 7,4, с получением 50 мМ раствора. Регулировку pH не проводили. 37 мкл раствора ТСЕР добавляли к концентрированному белковому раствору. Образец инкубировали при температуре окружающей среды в течение 30 мин. Затем к реакционному раствору добавляли 507 мкл 5 мМ 5 кДа ПЭГ малеимида (Sunbright ME-050MA, CAS 883993-35-9, NOF Europe NV, Гроббендонк, Бельгия) в PBS, pH 7,4 (5 мол. экв.). После инкубации при температуре окружающей среды в течение 30 мин образование конъюгатов подтверждали с помощью аналитической эксклюзионной

хроматографии. Буфер смеси для конъюгации заменяли на 100 мМ борат, pH 9,0, используя систему Aekta, снабженную колонкой HiPrep Desalting 26/10. Образец инкубировали при 25°C в течение ночи с получением неочищенного конъюгата мутеина П-2 Ala-M1-5кДа ПЭГ **3**. Затем реакционную смесь концентрировали до 5,2 мг/мл с использованием фильтров с центрифугированием Amicon Ultra-15, Ultracel 3 K (Merck Millipore). 0,109 г 40 кДа мПЭГ-линкерного реагента (синтез можно проводить, как описано для соединения 17са в патенте WO 2009/133137, пример 7, с использованием соединения 16с и 1А из того же патента) растворяли в 1,26 мл холодной воды с получением сток-раствора $2,1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Раствор хранили на льду. 1,34 мл раствора белка разбавляли до 4 мг/мл добавлением 100 мМ бората, pH 9,0, затем добавляли 873 мкл охлажденного сток-раствора реагента 40 кДа мПЭГ-линкер (соответствует 4 мол. экв. по отношению к белку).

Смесь для конъюгации помещали на водяную баню при 14°C на 2 часа. pH доводили до pH 4 добавлением 872 мкл воды и 3,488 мл 200 мМ ацетата натрия, pH 3,6. После инкубации при 25°C в течение ночи конъюгат с одним присоединенным линкером мПЭГ 40 кДа (моноконъюгат) выделяли из реакционной смеси с использованием колонки HiScreen Capto MMC ImpRes (размер колонки: 0,77 x 10 см), соединенной с системой Aekta. Применяли скорость потока 1,2 мл/мин и линейный градиент от 10 мМ янтарной кислоты, pH 5,5, до 80% 10 мМ янтарной кислоты, 1 М NaCl, pH 5,5 в 12 объемах колонки. Пик, содержащий в основном моноконъюгат, элюирующийся во время градиента, идентифицировали с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии. Содержание соли этой фракции доводили до 150 мМ NaCl добавлением 10 мМ янтарной кислоты, 1 М NaCl, pH 5,5, затем фракцию концентрировали до 2,48 мл на фильтрах Amicon Ultra-15, Ultracel 10 K (Merck Millipore). Концентрированный раствор (2,48 мл) разбавляли 130 мкл 10 мМ янтарной кислоты, 150 мМ NaCl, 1% Tween20, pH 5,5 и 165 мкл 10 мМ янтарной кислоты, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween20, pH 5,5 до конечной концентрации 1 мг/мл **1** эквивалента (на основе молекулярной массы белка без учета гликозилирования) с получением соединения **5**, которое имеет следующую структуру



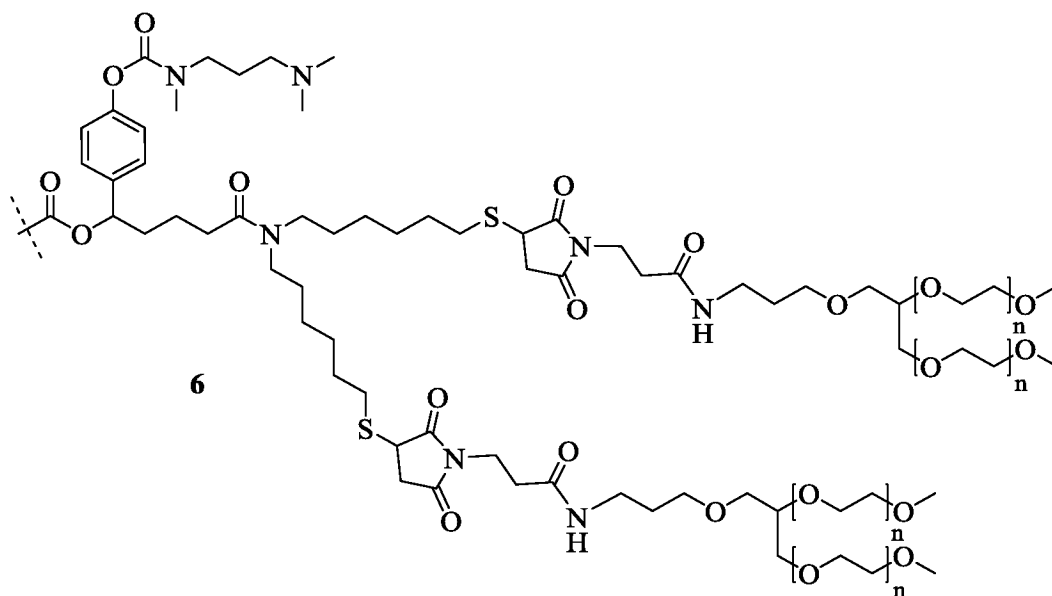
где пунктирная линия указывает на присоединение к атому азота первичного амина N-конца или боковой цепи лизина **3**, и каждый n представляет собой целое число от 200 до 250.

Пример 5: Получение полимерного пролекарства **6** мутеина IL-2 Ala-M1

12 мл очищенного мутеина IL-2 Ala-M11 (SEQ ID NO:14), приготовленного в концентрации 2,5 мг/мл в 20 мМ фосфате натрия, 140 мМ NaCl, pH 7,4. 15,3 мг TCEP · HCl растворяли в 1068 мкл PBS, pH 7,4, с получением 50 мМ раствора. Регулировку pH не проводили. 93,3 мкл раствора TCEP добавляли к концентрированному белковому раствору. Образец инкубировали при температуре окружающей среды в течение 30 мин. Затем к реакционному раствору добавляли 1123 мкл 5 мМ 5 кДа малеимида ПЭГ (M-Mal-5000, Jenkem Technology Co., Beijing, China) в PBS, pH 7,4 (3 мол. экв.). После инкубации при температуре окружающей среды в течение 30 мин образование конъюгатов подтверждали с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии. Буфер смеси для конъюгации заменяли на 100 мМ борат, pH 9,0, используя систему Aekta, снабженную колонкой HiPrep Desalting 26/10. Образец инкубировали при 25°C в течение ночи с получением неочищенного конъюгата мутеина IL-2 Ala-M1-5 кДа ПЭГ **4**. Затем реакционную смесь концентрировали до 4,4 мг/мл с использованием фильтров с центрифугированием Amicon Ultra-15, Ultracel 3 K (Merck Millipore). 0,307 г 40 кДа mПЭГ-линкерного реагента (синтез можно проводить, как описано для соединения 17са в патенте WO 2009/133137, пример 7, с использованием соединения 16с и 1А из того же патента) растворяли в 3,55 мл холодной воды с получением сток-раствора $2,1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Раствор хранили на льду. 5,8 мл раствора белка разбавляли до 4 мг/мл добавлением 100

мМ бората, рН 9,0, затем добавляли 3,21 мл охлажденного 40 кДа сток-раствора реагента мПЭГ-линкер (соответствует 4 мол. экв. по отношению к белку).

Смесь для конъюгации помещали на водяную баню при 14°C на 2 часа. рН доводили до рН 4 добавлением 3,21 мл воды и 12,83 мл 200 мМ ацетата натрия, рН 3,6. После инкубации при 25°C в течение ночи конъюгат с одним присоединенным линкером мПЭГ 40 кДа (моноконъюгат) выделяли из реакционной смеси с использованием колонки HiScreen Capto MMC ImpRes (размер колонки: 0,77 x 10 см), соединенной с системой Аекта. Применяли скорость потока 1,2 мл/мин и линейный градиент от 10 мМ янтарной кислоты, рН 5,0 до 80% 10 мМ янтарной кислоты, 1 М NaCl, рН 5,0 в 12 объемах колонки. Пик, содержащий в основном моноконъюгат, элюирующийся во время градиента, идентифицировали с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии. Содержание соли этой фракции доводили до 150 мМ NaCl добавлением 10 мМ янтарной кислоты, 1 М NaCl, рН 5,0, затем фракцию концентрировали до 3,64 мл на фильтрах Amicon Ultra-15, Ultracel 10 К (Merck Millipore). Концентрированный раствор (3,64 мл) разбавляли 192 мкл 10 мМ янтарной кислоты, 150 мМ NaCl, 1% Tween20, рН 5,0 и 3,59 мл 10 мМ янтарной кислоты, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween20, рН 5,0 до конечной концентрации 1 мг/мл 1 эквивалента (на основе молекулярной массы белка без учета гликозилирования) с получением соединения **6**, которое имеет следующую структуру



где пунктирная линия указывает на присоединение к атому азота первичного амина N-конца или боковой цепи лизина **4**, и каждый n представляет собой целое число от 200 до 250.

Пример 6: Получение конъюгата мутеина IL-2 Ala-M1-5кДа ПЭГ 3

Соединение **3** было получено в процессе очистки полимерного пролекарства **5** мутеина IL-2 Ala-M1. Во время разделения соединения **5** на смоле Capto MMC ImpRes был собран более поздний пик элюирования, содержащий **3**. Собранную фракцию разбавляли 10 mM янтарной кислотой, pH 5,0, чтобы снизить проводимость до около 14 мСм/см и дополнительно очищали в системе Äkta, оснащенной колонкой HiScreen Capto Blue, с использованием буфера А (20 mM фосфата натрия, pH 7,5), буфера В (20 mM фосфата натрия, 1 M NaCl, pH 7,5) и градиента от 0 до 50% буфера В в 6 объемах колонки. Основной пик собирали и концентрировали с помощью центрифуги Amicon Ultra (3 кДа MWCO). Концентрированный раствор заменяли буфером на 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% полисорбата 20, pH 7,4, используя систему Äkta и колонку HiPrep 26/10, и концентрацию доводили до 0,25 мг/мл с получением соединения **3**.

Пример 7: Получение конъюгата мутеина IL-2 Ala-M1-5кДа ПЭГ 3

Соединение **3** очищали после конъюгации с малеимидом ПЭГ 5 кДа и инкубации в течение ночи при pH 9,0, как описано в процессе очистки полимерного пролекарства **5** мутеина IL-2 Ala-M1 в примере 4. Реакционный раствор после инкубации в течение ночи при 25°C и pH 9,0 наносили на колонку AEX Poros GoPure XQ объемом 5 мл с использованием буферов А (20 mM Tris, pH 8,5) и буфера В (20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8,5) и применяя линейный градиент от 0 до 30% буфер В в 11 объемах колонки. Фракции, содержащие **3**, собирали и заменяли буфер на 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% полисорбата 20, pH 7,4, используя колонку HiPrep 26/10 в системе Äkta. Концентрацию белка с замененным буфером доводили до 0,25 мг/мл и стерильно фильтровали с получением соединения **3**.

Пример 8: Приготовление смеси 7 полимерного пролекарства с высвобождением мутеина IL-2 Ala-M1

pH 250 мкл **5** сдвигали до pH 9,0 путем разбавления 205 мкл 50 mM бората с pH 10,0. Образец инкубировали при 37°C в инкубаторе в течение 24 часов. После инкубации процент высвобожденного Ala-M1-5кДа ПЭГ **3** определяли методом ОФ-ВЭЖХ с использованием колонки Acquity UPLC Peptide BEH C18 (Waters, 300 Å, 2,1 x 50 мм, 1,7 мкм) на системе 1260 Infinity II (Agilent Technologies). Температуру колонки поддерживали на уровне 30°C, а скорость потока устанавливали на 0,25 мл/мин. УФ-детектирование проводили при 215 нм. Содержание высвобожденного **3** определяли по калибровочной кривой очищенного **3** в пяти различных объемах инъекции в диапазоне 0,25–2 мкг IL2 на колонке с использованием тех же условий ОФ-ВЭЖХ. Смесь для

высвобождения полимерного пролекарства мутеина IL-2 Ala-M1 7 использовали без очистки, и поэтому она в основном содержит Ala-M1-5кДа ПЭГ 3 и расщепленный 40 кДа мПЭГ-линкер, а также незначительные количества остатка 5.

Пример 9: Получение конъюгата мутеина IL-2 Ala-M1-10кДа ПЭГ 14

2,0 мл соединения 1 с концентрацией 2,3 мг/мл, приготовленного в 20 mM фосфата натрия, 140 mM NaCl, pH 7,4, сначала подвергали удалению защиты с помощью гидрохлорида TCEP (Sigma-Aldrich, CAS 51805-45-9, каталожный номер: 75259-10G, сток: 50). mM в PBS, pH 7,4) при конечной концентрации 0,4 mM TCEP при комнатной температуре в течение 30 мин. Последующую конъюгацию проводили путем добавления 10 кДа мПЭГ-Mal (NOF, Sunbright ME-100MA, сток-раствор: 5 mM в PBS, pH 7,4) в трехкратном молярном избытке по отношению к белку и инкубации при комнатной температуре в течение 10 мин. После замены буфера на 0,1 M борат, pH 9, с использованием системы Äkta, оснащенной тремя последовательно соединенными колонками для обессоливания HiTrap (GE Healthcare, по 5 мл каждая), собранную белковую фракцию инкубировали при 25 °C в течение примерно 18 ч для достижения гидролиза тиосукцинимидного кольца с образованием 14. После шестикратного разбавления деионизированной водой 14 очищали с помощью AIEХ с использованием системы Äkta, оснащенной колонкой Poros XQ (Thermo Scientific, 5 мл) и солевым градиентом в диапазоне от 20 mM TRIS, pH 8,5 до 20 mM TRIS, 300 mM NaCl, pH 8,5 в 11 CV при скорости потока 1,67 мл/мин и приблизительной белковой нагрузке 0,5 мг на мл смолы. Собранную фракцию 14 затем подвергали замене буфера на 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05 % Tween 20, pH 7,4 с использованием системы Äkta, оснащенной обессоливающей колонкой HiPrep 26/10 (GE Healthcare, 53 мл), после чего концентрировали до 0,26 мг/мл 1 экв (по молекулярной массе белка без учета гликозилирования) с использованием центрифужных фильтров (Amicon Ultra-15, Merck, Ultracel-3k) и при стерильной фильтрации (0,22 мкм, PVDF) при хранении при -80°C.

Пример 10: Получение конъюгата мутеина IL-2 Ala-M1-30 кДа ПЭГ 15

2,2 мл 1 в концентрации 2,3 мг/мл, приготовленной в 20 mM фосфата натрия, 140 mM NaCl, pH 7,4, сначала подвергали удалению защиты с помощью гидрохлорида TCEP (Sigma-Aldrich, партия: 75259-10G, сток: 50 mM в PBS, pH 7,4) до конечной концентрации 0,4 mM TCEP при комнатной температуре в течение 30 мин. Последующую конъюгацию осуществляли путем добавления 30 кДа мПЭГ-Mal (NOF, Sunbright ME-300MA, исходный раствор: 5 mM в PBS, pH 7,4) в трехкратном молярном избытке по отношению к белку и

инкубации при комнатной температуре в течение 10 мин. После замены буфера на 0,1 М борат, pH 9, с использованием системы Äkta, оснащенной тремя последовательно соединенными колонками для обессоливания HiTrap (GE Healthcare, каждая по 5 мл), собранную белковую фракцию инкубировали при 25 °С в течение 20 ч для достижения гидролиза тиосукцинимидного кольца с получением **15**. После шестикратного разбавления деионизированной водой **15** очищали с помощью AIEХ с использованием системы Äkta, оснащенной колонкой Poros XQ (Thermo Scientific, 5 мл) и солевого градиента в диапазоне от 20 mM TRIS, pH 8,5 до 20 mM TRIS, 300 mM NaCl, pH 8,5 в 11 CV при скорости потока 1,67 мл/мин и приблизительной белковой нагрузке 0,5 мг на мл смолы. Собранную фракцию **15** затем подвергали замене буфера на 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05 % Tween 20, pH 7,4 с использованием системы Äkta, оснащенной обессоливающей колонкой HiPrep 26/10 (GE Healthcare, 53 мл), после чего концентрировали до 0,26 мг/мл **1** экв (по молекулярной массе белка без учета гликозилирования) с использованием центрифужных фильтров (Amicon Ultra-15, Merck, Ultracel-10k) и при стерильной фильтрации (0,22 мкм, PVDF) при хранении при -80°С.

Пример 11: Получение альдеслейкина 11 для исследований связывания с рецептором

1 мл рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 **11** (альдеслейкин, Acrop Biotechnology, AK9993-CSTM, номер партии 15104181285) (SEQ ID NO:15) в концентрации 2 мг/мл оставляли стоять при температуре окружающей среды до полного исчезновения белого осадка. Добавляли 4 мл метанола с последующим легким встряхиванием вручную. Затем к раствору добавляли 1 мл хлороформа, который затем встряхивали до тех пор, пока не была видна только одна фаза. Наконец, добавляли 3 мл воды и тщательно встряхивали образец. При центрифугировании (6 мин, 9384 об/мин) верхнюю органическую фазу удаляли, не нарушая интерфазы. Добавляли 3 мл метанола, образец встряхивали и центрифугировали (3 мин, 9384 gcf). Затем надосадочную жидкость осторожно удаляли, а белковый осадок слегка подсушивали азотом. Добавляли 500 мкл 50 mM уксусной кислоты, pH 3,0, получая раствор белка с концентрацией 3 мг/мл, как определено фотометрическим измерением при 280 нм с использованием коэффициента экстинкции $0,614 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Затем 453 мкл вышеупомянутого раствора разбавляли 50 mM уксусной кислотой, pH 3, до 2 мг/мл. После смешивания с 140 mM HEPES, 300 mM хлорида натрия, 6 mM ЭДТА- Na_2 , 0,1 % Tween-20, pH 8,2 в гравиметрическом

соотношении 1:1 и последующей стерильной фильтрации (0,22 мкм, PVDF) получали **11** и далее применяли в исследованиях связывания рецепторов.

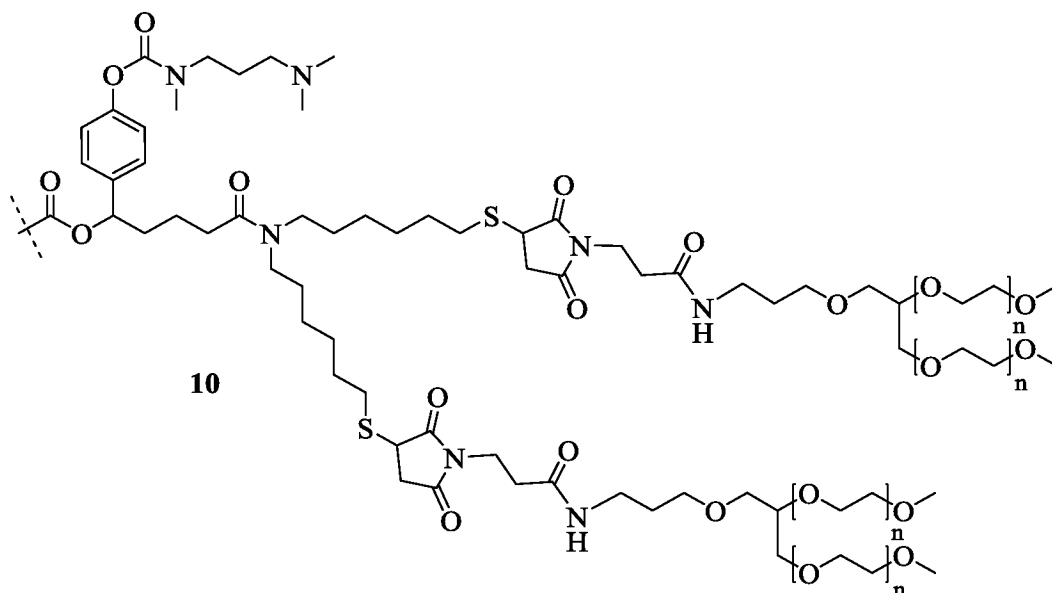
Пример 12: Приготовление гидрогеля 8, содержащего резиквимод.

Соединение **8** получали, как описано в WO 2020/141221 (пример 5, см. соединение 12с), и получали в виде суспензии в буфере РТР с содержанием резиквимода 2673 мкг экв./мл.

Пример 13: Получение полимерного пролекарства 10 мутеина IL-2 M1

45,2 мл мутеина IL-2 M1 (SEQ ID NO:18) **2**, полученного в концентрации 1,84 мг/мл в 10 mM фосфата натрия, 145 mM NaCl, 10% глицерина, pH 7,4, смешивали с 13,6 мл 0,5 M фосфата натрия, pH 7,4. 23,2 мг ТСЕР растворяли в 1619 мкл PBS, pH 7,4, с получением 50 mM раствора. Регулировку pH не проводили. 710 мкл раствора ТСЕР добавляли к концентрированному белковому раствору. Образец инкубировали при температуре окружающей среды в течение 30 мин. Затем к реакционному раствору добавляли 5527 мкл 5 mM 5 кДа ПЭГ малеимида (Sunbright ME-050MA, CAS 883993-35-9, NOF Europe NV, Гроббендонк, Бельгия) в PBS, pH 7,4 (5 мол. экв.). После инкубации при температуре окружающей среды в течение около 20 мин образование конъюгатов подтверждали аналитической эксклюзионной хроматографией. Буфер смеси для конъюгации заменяли на 100 mM борат, pH 9,0, используя систему Aekta, снабженную колонкой HiPrep Desalting 26/10. Образец инкубировали при 25°C в течение ночи с получением неочищенного конъюгата мутеина IL-2 M1-5кДа ПЭГ **9**. Затем реакционную смесь концентрировали до 5,3 мг/мл с использованием фильтров для центрифугирования Amicon Ultra-15, Ultracel 3 K (Merck Millipore). 0,847 г 40 кДа mПЭГ-линкерного реагента (синтез можно проводить, как описано для соединения 17са в патенте WO 2009/133137, пример 7, с использованием соединения 16с и 1А из того же патента) растворяли в 9,746 мл холодной воды с получением сток-раствора $2,1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Раствор хранили на льду. 12,87 мл раствора белка разбавляли до 4 мг/мл добавлением 100 mM бората, pH 9,0, затем добавляли 8477 мкл охлажденного 40 кДа исходного раствора реагента mПЭГ-линкер (что соответствует 4 мол. экв. по отношению к белок). Смесь для конъюгации помещали на водяную баню при 14°C на 2 часа. pH доводили до pH 4 добавлением 8,4 мл воды и 33,5 мл 200 mM ацетата натрия, pH 3,6. После инкубации при 25°C в течение ночи конъюгат с одним присоединенным линкером mПЭГ 40 кДа (моноконъюгат) выделяли из реакционной смеси с помощью HiScreen Capto MMC ImpRes (размер колонки: 0,77 x 10 см), соединенного с системой Aekta. Применяли скорость потока 1,2 мл/мин и линейный

градиент от 10 мМ янтарной кислоты, рН 5,5, до 80% 10 мМ янтарной кислоты, 1 М NaCl, рН 5,5 в 12 объемах колонки. Было проведено три цикла очистки. Пик, содержащий в основном моноконъюгат, элюирующийся во время градиента, идентифицировали с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии. Содержание соли этой фракции довели до 150 мМ NaCl добавлением 10 мМ янтарной кислоты, 1 М NaCl, рН 5,5, затем фракцию концентрировали до 8,1 мл на фильтрах Amicon Ultra-15, Ultracel 10 К (Merck Millipore). Концентрированный раствор разбавляли 425 мкл 10 мМ янтарной кислоты, 150 мМ NaCl, 1% Tween20, рН 5,5 и 14,36 мл 10 мМ янтарной кислоты, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween20, рН 5,5 до конечной концентрации 1 мг/мл мутеина М1 IL-2 **2** эквивалентов (в расчете на молекулярную массу белка) с получением соединения **10**, которое имеет следующую структуру



где пунктирная линия указывает на присоединение к атому азота боковой цепи лизина **9**, и каждый n представляет собой целое число от 200 до 250.

Пример 14: Фармакодинамические эффекты полимерного пролекарства **5** или **6** мутеина IL-2 Ala-M1 у яванских макак (Суно) (обезьяны)

Было проведено два исследования для измерения фармакодинамических эффектов либо альдеслейкина (Prometheus, National Drug Code 65483011607) (SEQ ID NO:15), либо **11** или **5** у яванских макак. В первом исследовании четверем яванским макакам весом от 7,77 до 10,6 кг (в среднем 9,2 кг) вводили внутривенно пять последовательных ежедневных доз по 0,4 мг соединения **11** в дни 1-5 (в среднем мг/кг: 0,044). Во втором исследовании четверем яванским макакам весом от 2,46 до 3,69 кг (в среднем 3,13 кг) вводили однократно внутривенно дозу 0,1 мг/кг ($n=2$) или 0,3 мг/кг ($n=2$) **5**. Все животные

были обучены стулу перед исследованием. Для обоих исследований образцы периферической крови были взяты до и после лечения в различные моменты времени, как указано, и проанализированы на количество лимфоцитов, количество эозинофилов и цитокинов. Для животных, получавших 5, проводили дополнительные эксперименты по проточной цитометрии. Для измерения (абсолютного) количества лимфоцитов и количества эозинофилов цельную кровь обрабатывали на гематологических анализаторах. Для измерения цитокинов IL-5 и IL-6 сыворотку обрабатывали из цельной крови и анализировали с помощью ELISA или MSD. Для измерений проточной цитометрии (иммунофенотипирование, IPT, FACS) цельную кровь обезьян *Synomolgus* собирали в антикоагулянте ЭДТА и хранили при комнатной температуре до обработки для проточной цитометрии. Кровь лизировали и образцы окрашивали на внеклеточные поверхностные маркеры и внутриклеточные фенотипические и линейные маркеры стандартными методами. Популяции клеток анализировали с использованием следующих фенотипов и определяли процент клеток, которые были положительными в отношении маркера пролиферации Ki67.

Таблица 1: Фенотипы клеток, проанализированные с помощью проточной цитометрии:

Фенотипы	Маркеры
лимфоциты	CD14-, низкое боковое рассеяние, CD45+
Популяции в лимфоцитах:	
Все Т Клетки	CD45+CD3+
CD4 Т Клетки	CD45+CD3+CD4+
CD8 Т Клетки	CD45+CD3+CD8+
Т регуляторные клетки	CD3+CD4+CD25+FOXP3+
естественные клетки-киллеры	CD45+CD3-CD159a+
γδ Т клетки	CD45+CD3+CD4-CD8- γδ TCR+

Для профилирования проточной цитометрии использовали следующие реагенты (см. Таблицу 2):

Таблица 2: Сводка антител, используемых для проточной цитометрии:

Реагент и цвет	Клон	Метод окрашивания
-----------------------	-------------	------------------------------

CD3 BV605	SP34-2	внеклеточный
CD4 BV711	L200	внеклеточный
CD8 AF700	SK1	внеклеточный
CD14 BUV737	M5E2	внеклеточный
CD25 BUV395	2 A3	внеклеточный
CD28 PE-Cy5	CD28.2	внеклеточный
CD45 BV786	D058-1283	внеклеточный
CD95 BV421	DX2	внеклеточный
CD159a PC7	Z199	внеклеточный
FOXP3 PE	259D/C7	Внутриклеточный
Гранзим В Alexa Fluor® 647	GB11	Внутриклеточный
Ki-67 Alexa Fluor® 488	B56	Внутриклеточный
TCR $\gamma\delta$ APC/Fire™ 750	B1	внеклеточный

Популяции, перечисленные в таблице 1, анализировали на процентное содержание клеток Ki67+ в каждой популяции. Популяции, перечисленные в Таблице 1, анализировали на количество клеток путем умножения количества лимфоцитов в каждый момент времени на анализируемую проточной цитометрией частоту этого типа клеток в проточной цитометрии анализируемых лимфоцитов. Измерения изменения кратности проводили путем измерения отношения количества клеток в данный момент времени к исходному моменту времени до введения дозы на День -4. Соотношения CD8/Treg, отношения NK/Treg и отношения $\gamma\delta$ Т-клеток/Treg рассчитывали с использованием частот каждого типа клеток в анализируемых воротах лимфоцитов с помощью проточной цитометрии в заданный момент времени.

Количество лимфоцитов и эозинофилов: Обезьяны, обработанные соединением **11**, продемонстрировали в среднем 2,77-кратное и 2,79-кратное увеличение количества лимфоцитов на 8-й и 10-й дни соответственно, при этом демонстрируя среднее 6,92-кратное и 5,94-кратное увеличение количества эозинофилов на 8-й и 10-й дни соответственно (таблица 3).

Обезьяны, получавшие 0,1 мг/кг **5** продемонстрировали в среднем 3,62-кратное и 2,53-кратное увеличение количества лимфоцитов на 8 и 10-й день соответственно, а также продемонстрировали среднее 1,13-кратное и 1,39-кратное увеличение количества эозинофилов на 8-й и 10-й дни соответственно (таблица 4).

Обезьяны, получавшие 0,3 мг/кг **5** продемонстрировали значительно большее увеличение количества лимфоцитов, в среднем 27,4-кратное и 10,82-кратное увеличение количества лимфоцитов на 8-й и 10-й дни соответственно, при этом существенного увеличения эозинофилов не наблюдалось. Среднее увеличение числа эозинофилов в 1,32 раза наблюдалось на 10-й день, а на 8-й день в гематологическом анализе образцов периферической крови животных, получавших 0,3 мг/кг, эозинофилы не обнаруживались (таблица 4).

Таблица 3: Количество лимфоцитов и эозинофилов в периферической крови у яванских макак, обработанных **11**:

День исследования	Количество лимфоцитов / мкл				Количество эозинофилов / мкл			
	Животное 1	Животное 2	Животное 3	Животное 4	Животное 1	Животное 2	Животное 3	Животное 4
	~0,044 мг/кг	~0,044 мг/кг	~0,044 мг/кг	~0,044 мг/кг	~0,044 мг/кг	~0,044 мг/кг	~0,044 мг/кг	~0,044 мг/кг
-5 (Исходный уровень)	4074	3530.6	4719	4376.3	0	292.1	195	535
-4 (Исходный уровень)	4032	4514.4	4189.5	3564	168	422.4	117.6	396
1	4995	4670.6	4845	4617.6	0	411.4	255	691.2
2	4246	2473.5	2551.5	2086.5	965	523.8	451.5	567.1
3	4898	2040	2692.8	2387	632	397.8	198	539
4	3739.1	2646	2703.2	3034	1042.5	392	228.9	738
5	4144.5	3990	3784	3990	985.5	114	0	570
8	11186	11088	8086	14958	476	756	2177	2770

9	10260	10045	9548	13878	228	735	5852	3598
10	8316	10664	12079	14885	945	3224	4112	2061
11	7304	9640	8736	7720	332	3615	5824	2123
12	5652	9520	8325	7518	785	2856	4070	1432
15	6720	9700	5468.3	6198.4	210	1746	2324.4	1311.2
19	2385.6	3965.5	2067	3139.5	142	607.7	74.2	161

Таблица 4: Количество лимфоцитов и эозинофилов в периферической крови яванских макак, обработанных **5**

День исследования	Количество лимфоцитов / мкл				Количество эозинофилов / мкл			
	Животное 1 0,1 мг/кг	Животное 2 0,1 мг/кг	Животное 3 0,3 мг/кг	Животное 4 0,3 мг/кг	Животное 1 0,1 мг/кг	Животное 2 0,1 мг/кг	Животное 3 0,3 мг/кг	Животное 4 0,3 мг/кг
-4	7580	8610	3140	7910	310	370	200	490
2	2370	4780	1650	2120	210	170	50	350
8	36480	20830	133950	96000	540	190	0	0
10	20490	20210	43040	62760	600	310	300	560
15	11180	10550	7040	20740	310	400	220	890

Результаты по цитокинам: Обезьяны, получавшие **11**, продемонстрировали явное и существенное увеличение IL-5 у всех животных со средним пиковым уровнем IL-5 в сыворотке 117,78 пг/мл (таблица 5). Напротив, обезьяны, получавшие 0,1 или 0,3 мг/кг **5** продемонстрировали минимальное увеличение IL-5. У трех из четырех протестированных животных в анализируемые моменты времени не обнаруживался сывороточный IL-5, в то время как у 4^{-го} животного значение 6,41 пг/мл наблюдалось на 5-й день исследования (таблица 6). Обезьяны, получавшие **11**, продемонстрировали явное и существенное увеличение IL-6 у всех животных со средним пиковым уровнем IL-6 в сыворотке 58,66 пг/мл (таблица 5). Напротив, обезьяны, получавшие 0,1 или 0,3 мг/кг **5**

продемонстрировали минимальное увеличение IL-6. У двух из четырех протестированных животных IL-6 в сыворотке не определялся в анализируемые моменты времени, в то время как у двух из четырех животных значения 5,26 и 3,44 пг/мл наблюдались в один момент времени через 6 часов после введения дозы (таблица 6).

Таблица 5: Уровни цитокинов IL-5 и IL-6 в периферической крови яванских макак, получавших 11

День исследования	IL-5 пг/мл				IL-6 пг/мл			
	Животное 1	Животное 2	Животное 3	Животное 4	Животное 1	Животное 2	Животное 3	Животное 4
	~0,044 мг/кг	~0,044 мг/кг	~0,044 мг/кг	~0,044 мг/кг	~0,044 мг/кг	~0,044 мг/кг	~0,044 мг/кг	~0,044 мг/кг
-3	0.28	0.1895	0.2445	0.233	0.40	0.21	0.10	0.29
1	0.35	0.223	0.231	0.578	0.27	0.10	0.12	0.30
1.25	6.40	36.65	10.75	26.55	7.83	23.6	64.35	26.7
2	9.62	78.6	15.15	45.2	5.67	1.95	1.00	4.80
2.25	17.1	237.5	58.55	65.9	6.79	9.02	7.69	9.95
2.29	18.7	186	47.2	55.6	120	12.1	8.85	15.7
3	6.2	74.95	14.15	13.7	3.80	0.79	1.93	0.91
3.25	15.8	179	57.55	57.1	4.77	6.11	2.58	5.45
4	5.855	39.95	12.2	8.46	1.54	0.36	0.34	0.63
4.25	25.8	268	71.55	69.95	4.02	3.2	1.46	2.46
5	4.92	44.85	16.35	8.06	0.75	0.81	0.46	0.48
5.25	38.85	288	74.3	50.6	3.67	3.59	2.42	4.21
6	4.96	44.75	9.99	3.695	0.83	2.46	0.23	0.57
8	<LLOQ	0.542	0.07745	0.0219	0.25	0.20	0.08	0.27
10	0.0331	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	0.74	0.12	0.07	0.21

12	0.0811	0.048	<LLOQ	<LLOQ	0.29	0.51	0.19	0.18
15	<LLOQ	<LLOQ	0.00682	<LLOQ	0.11	0.21	0.05	0.12

LLOQ (IL-15) = 0.260 пг/мл, LLOQ (IL-6) = 0.178 пг/мл

Таблица 6: Уровни цитокинов IL-5 и IL-6 в периферической крови яванских макаков, получавших лечение 5

День исследования	IL-5 пг/мл				IL-6 пг/мл			
	Животное 1	Животное 2	Животное 3	Животное 4	Животное 1	Животное 2	Животное 3	Животное 4
	0.1 мг/кг	0.1 мг/кг	0.3 мг/кг	0.3 мг/кг	0.1 мг/кг	0.1 мг/кг	0.3 мг/кг	0.3 мг/кг
1	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
1.25	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	5.26	<LLOQ	3.44	<LLOQ
2	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	2.48	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
5	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	6.41	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
8	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ
15	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	2.95	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ

LLOQ (IL-5) = 2.44 пг/мл, LLOQ (IL-6) = 2.44 пг/мл

Результаты проточной цитометрии:

Данные, описанные в настоящем документе, получены из внутреннего гейт-анализа необработанных данных проточной цитометрии, собранных внешней CRO, и представляют собой предварительный анализ перед получением окончательных данных от CRO. Обезьяны, получавшие 0,1 мг/кг 5, продемонстрировали очень сильное увеличение процента пролиферирующих клеток Ki67+ в NK-клетках со средними значениями 96,8% и 91,4%, наблюдаемыми на 6-й и 10-й день соответственно (таблица 7). Аналогично, обезьяны, получавшие 0,1 мг/кг 5, продемонстрировали устойчивое увеличение процента пролиферирующих клеток Ki67+ в Т-клетках CD8 со средними

значениями 68,3% и 49,2%, наблюдаемыми на 6-й и 10-й день соответственно (таблица 7). Кроме того, обезьяны, получавшие 0,1 мг/кг **5**, продемонстрировали значительное увеличение процента пролиферирующих клеток Ki67+ в $\gamma\delta$ Т-клетках со средними значениями 95,5% и 89,5%, наблюдаемыми на 6-й и 10-й день соответственно (таблица 7).

Обезьяны, получавшие 0,3 мг/кг **5**, продемонстрировали очень сильное увеличение процента пролиферирующих клеток Ki67+ в NK-клетках со средними значениями 98,7% и 90,7%, наблюдаемыми на 6-й и 10-й день соответственно (таблица 7). Аналогично, обезьяны, получавшие 0,3 мг/кг **5**, продемонстрировали очень сильное увеличение процента пролиферирующих клеток Ki67+ в Т-клетках CD8 со средними значениями 91,1% и 71,3%, наблюдаемыми на 6-й и 10-й день соответственно (таблица 7). Кроме того, обезьяны, получавшие 0,3 мг/кг **5** продемонстрировали очень сильное увеличение процента пролиферирующих клеток Ki67+ внутри $\gamma\delta$ Т-клеток со средними значениями 99,5% и 95,3%, наблюдаемыми на 6-й и 10-й день соответственно (таблица 7).

Таблица 7: Процент Ki67+ NK-клеток периферической крови, CD8 Т-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток у яванских макак, получавших **5**

День исследования	% Ki67+ NK клеток				% Ki67+ CD8 Т клеток			
	Животное 1 0.1 мг/кг	Животное 2 0.1 мг/кг	Животное 3 0.3 мг/кг	Животное 4 0.3 мг/кг	Животное 1 0.1 мг/кг	Животное 2 0.1 мг/кг	Животное 3 0.3 мг/кг	Животное 4 0.3 мг/кг
-4	38.3	31.6	20.4	28.5	21.7	10.8	7.67	15.4
1	34.5	23.7	22.8	28.3	24.8	9.87	9.78	11.3
5	99	92	97.6	99	70.6	44.6	78	78
6	99.4	94.2	98	99.3	77.5	59.1	90.1	92.1
8	97.6	94.1	95.2	98.2	72.9	46.8	81.4	89.4
10	93.5	89.2	86.9	94.5	58.3	40	65.5	77.1
15	24.5	27.8	19.7	34.3	19.2	14.7	14.5	25.8
	% Ki67+ $\gamma\delta$ Т клеток							
День исследования	Животное 1 0.1 мг/кг	Животное 2	Животное 3 0.3 мг/кг	Животное 4 0.3 мг/кг				

Добавля		0.1 мг/кг			
-4	25.3	18.1	8.7	19.5	
1	26.6	18.9	16.3	18.2	
5	90.8	88.5	98.0	94.5	
6	94.9	96.1	99.6	99.3	
8	95.1	95.5	98.3	99.20	
10	85.2	93.8	93.4	97.2	
15	18.0	15.3	12.9	15.4	

Обезьяны, получавшие 0,1 мг/кг **5**, продемонстрировали устойчивое увеличение кратности изменений по сравнению с исходным уровнем NK-клеток со средними значениями кратности изменения 7,28 и 4,42, наблюдаемыми на 8-й и 10-й день соответственно (таблица 8). Аналогично, обезьяны, получавшие 0,1 мг/кг **5**, продемонстрировали устойчивое увеличение кратности изменений по сравнению с исходным уровнем Т-клеток CD8 со средними значениями кратности 3,78 и 2,26, наблюдаемыми на 8-й и 10-й день соответственно (таблица 8). Кроме того, обезьяны, получавшие 0,1 мг/кг **5**, продемонстрировали еще более сильное увеличение кратности изменений по сравнению с исходным уровнем $\gamma\delta$ Т-клеток со средними значениями кратности изменения 26,47 и 24,94, наблюдаемыми на 8-й и 10-й день соответственно (таблица 8).

Обезьяны, получавшие 0,3 мг/кг **5**, продемонстрировали сильное увеличение кратности изменений по сравнению с исходным уровнем NK-клеток со средними значениями кратности изменения 24,69 и 12,56, наблюдаемыми на 8-й и 10-й день соответственно (таблица 8). Аналогично, обезьяны, получавшие 0,3 мг/кг **5**, продемонстрировали устойчивое увеличение кратности изменений по сравнению с исходным уровнем Т-клеток CD8 со средними значениями кратности изменения 17,34 и 7,57, наблюдаемыми на 8-й и 10-й день соответственно (таблица 8). Кроме того, обезьяны, получавшие 0,1 мг/кг **5**, продемонстрировали еще более существенное увеличение кратности изменений по сравнению с исходным уровнем $\gamma\delta$ Т-клеток со средними значениями кратности изменения 607,34 и 213,27, наблюдаемыми на 8-й и 10-й день соответственно (таблица 8).

Таблица 8: Кратность изменения по сравнению с исходным уровнем количества NK-клеток, CD8 T-клеток и $\gamma\delta$ T-клеток периферической крови у яванских макаков, получавших пролекарство **5**

День исследования	Кратность изменения количества NK-клеток				Кратность изменения количества T-клеток CD8			
	Животное 1 0.1 мг/кг	Животное 2 0.1 мг/кг	Животное 3 0.3 мг/кг	Животное 4 0.3 мг/кг	Животное 1 0.1 мг/кг	Животное 2 0.1 мг/кг	Животное 3 0.3 мг/кг	Животное 4 0.3 мг/кг
-4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2	0.01	0.03	0.01	0.01	0.29	0.60	0.48	0.18
8	8.75	5.81	31.37	18.00	4.89	2.67	21.16	13.51
10	4.23	4.61	12.05	13.06	2.35	2.17	7.97	7.17
15	1.85	1.83	2.17	3.21	1.52	1.27	3.31	3.47
Кратность изменения количества $\gamma\delta$ T-клеток								
День исследования	Животное 1 0.1 мг/кг	Животное 2 0.1 мг/кг	Животное 3 0.3 мг/кг	Животное 4 0.3 мг/кг				
-4	1.0	1.0	1.0	1.0				
2	0.14	0.27	0.22	0.11				
8	28.32	24.61	1005.54	209.14				
10	16.49	33.38	294.19	132.34				
15	4.70	8.78	19.45	28.93				

Обезьяны, получавшие 0,1 мг/кг **5**, продемонстрировали явное увеличение отношения NK-клеток к Tregs со средним соотношением NK/Treg на исходном уровне перед введением дозы (день -4) 7,10 и на 8-й день 31,97 (таблица 9). Аналогичным образом, у обезьян, получавших 0,1 мг/кг, продемонстрировано явное увеличение соотношения T-клеток CD8 и Treg со средним соотношением CD8/Treg при исходном уровне до введения дозы 12,61 и на 8-й день 29,23 (таблица 9). Кроме того, у обезьян, получавших 0,1 мг/кг **5**, продемонстрировано явное увеличение отношения $\gamma\delta$ T-клеток к

Treg со средним соотношением $\gamma\delta$ /Treg до введения дозы 2,24 и на 8-й день 35,23 (таблица 9).

Обезьяны, получавшие 0,3 мг/кг **5**, продемонстрировали явное увеличение отношения NK-клеток к Tregs со средним соотношением NK/Treg до введения дозы 4,19 и на 8-й день 28,06 (таблица 9). Аналогичным образом, у обезьян, получавших 0,3 мг/кг **5**, продемонстрировано явное увеличение соотношения T-клеток CD8 и Treg со средним соотношением CD8/Treg при исходном уровне до введения дозы 7,63 и на 8-й день 36,35 (таблица 9). Кроме того, у обезьян, получавших 0,3 мг/кг **5**, продемонстрировано явное увеличение отношения $\gamma\delta$ T-клеток к Treg со средним значением отношения $\gamma\delta$ /Treg до введения дозы на исходном уровне 1,90 и на 8-й день 287,33 (Таблица 9).

Таблица 9: Соотношение CD8/Treg, NK/Treg и $\gamma\delta$ /Treg в периферической крови у яванских макак, получавших лечение **5**

День исследования	Соотношения NK / Treg				Соотношения CD8 T / Treg			
	Животное 1 0.1 мг/кг	Животное 2 0.1 мг/кг	Животное 3 0.3 мг/кг	Животное 4 0.3 мг/кг	Животное 1 0.1 мг/кг	Животное 2 0.1 мг/кг	Животное 3 0.3 мг/кг	Животное 4 0.3 мг/кг
-4	9.4	4.8	3.64	4.73	14.7	10.52	6.07	9.19
1	7.92	10.29	3.43	4.17	15.56	18.33	8.6	10.63
5	18.13	12.54	9.84	4.04	32.6	20.77	14.95	11.83
6	33.71	18.5	28.21	14.16	41.29	24.77	46.32	30.39
8	44.9	19.04	27.44	28.67	39.22	19.23	30.88	41.82
10	33.39	17.42	19.44	26.92	28.98	17.96	21.44	28.72
15	19.75	11.28	6.34	15.62	25.38	17.16	16.15	32.8
День исследования	Соотношения $\gamma\delta$ / Treg							
	Животное 1 0.1 мг/кг	Животное 2 0.1 мг/кг	Животное 3 0.3 мг/кг	Животное 4 0.3 мг/кг				
-4	3.46	1.01	1.79	2.01				
1	3.31	1.73	1.74	1.79				

5	11.15	4.23	38.74	5.89
6	20.86	10.56	331.58	44.42
8	53.53	16.92	433.13	141.52
10	47.97	26.45	233.70	115.90
15	18.50	11.38	28.02	59.80

В целом, соединение **5** индуцировало несколько ожидаемых фармакологических эффектов для терапии IL-2 со сниженным связыванием IL-2R α у яванских макаков на основе общедоступных данных, включая увеличение CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток с минимальным увеличением эозинофилов или индукцией IL-5 (Joseph et al. 2019, Rafei 2020). Это примечательно, поскольку IL-5-индуцированная экспансия эозинофилов и активация, как предполагается, являются основным механизмом, с помощью которого IL-2 вызывает эффекты, такие как VLS (Rand 1991, Van Haelst et al. 1991, Van Gool et al. 2014, Abo et al. 2019). Лечение соединением **5** индуцировало заметное окно между реакциями лимфоцитов и эозинофилов (т.е. 27,4-кратное увеличение лимфоцитов и 1,32-кратное увеличение эозинофилов при дозе 0,3 мг/кг) по сравнению с историческими препаратами сравнения. Обработка соединением **5** также индуцировала мощные (>200-кратное увеличение) ответы пролиферации $\gamma\delta$ Т-клеток.

В дополнительных исследованиях шести яванским макакам вводили однократно внутривенно дозу 0,7 мг/кг (n=3 самцы) или 0,6 мг/кг (n=3 самки) **6**, и образцы периферической крови брали до и после лечения в различных моменты времени и анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием методов, аналогичных описанным выше. В этих экспериментах эффекты **6** на субпопуляции $\gamma\delta$ Т-клеток, такие как субпопуляция эффективных противоопухолевых $\gamma\delta 2$ Т-клеток, измеряли с использованием $\gamma 9$ - специфических антител (Biolegend, Clone B3). Соединение **6** продемонстрировало аналогичные эффекты на $\gamma\delta 2$ Т-клеток по сравнению с общим количеством $\gamma\delta$ Т-клеток (т.е. среднее кратное увеличение у всех животных на 8-й день 399,87 против 438,56 соответственно), демонстрируя, что соединение **6** сильно увеличивает количество $\gamma\delta 2$ Т-клеток (таблица 10).

Таблица 10: Соединение **6** индуцировало кратность изменений на 8-й день для $\gamma\delta 2$ Т-клеток или всех $\gamma\delta$ Т-клеток.

Пол	Доза (мг/кг)	Кратность изменения γ 9 δ 2 Т клеток на день 8	Кратность изменения γ 8 Т клеток на день 8
Самец	0.7	529.87	434.70
Самец	0.7	263.38	226.49
Самец	0.7	714.29	827.17
Самка	0.6	334.06	399.91
Самка	0.6	210.29	363.13
Самка	0.6	347.33	379.93
В среднем	все	399.87	438.56

Пример 15. Противоопухолевая активность полимерного пролекарства 10 М1 мутеина П-2 в комбинации с гидрогелем 8, нагруженным резиквимодом.

Исследование проведено на самках мышей BALB/C в возрасте 9-11 недель на день перевивки опухоли. Мышам имплантировали 5×10^5 опухолевых клеток СТ26 в правый задний бок. Когда опухоли были выращены до среднего объема опухоли около 85 мм^3 , мышей рандомизировали в лечебные когорты (день 0) и вводили либо одну внутривенную дозу в день 0, либо одну внутривенную дозу в день 6, либо одну внутривенную дозу в день 16 200 мкл контрольного буфера, одну внутриопухолевую дозу 50 мкл инъекции **8** в День 0 или комбинацию одной внутривенной дозы в День 0 и одной внутривенной дозы в День 6 и одной внутривенной дозы в День 16 200 мкл 60 мкг **10** и однократную внутриопухолевую инъекцию 50 мкл 134 мкг **8** в День 0.

Чтобы проверить иммунную память в отношении зараженной опухоли, мышам, у которых полностью исчезли опухоли СТ26, происходящие из толстой кишки, или мышам с размерами опухолей меньше, чем первоначальные объемы опухоли (полные респондеры, CR), повторно вводили путем инокуляции 5×10^5 опухолевых клеток СТ26 в противоположный бок от исходных опухолей СТ26 через 73 дня после первоначального начала дозирования. В качестве контроля интактным мышам BALB/c также вводили 5×10^5 опухолевых клеток СТ26. Чтобы проверить способность лечения защищать от отдельных опухолей, мышам, которые были способны отторгнуть повторно вводимые опухоли СТ26, полученные из толстой кишки, вводили путем инокуляции в третьем отдельном месте 5×10^5 опухолевых клеток ЕМТ6, полученных из молочной железы. В качестве контроля

интактным мышам BALB/c также вводили 5×10^5 опухолевых клеток ЕМТ6. После начала лечения противоопухолевую эффективность оценивали путем определения объемов опухоли в различные моменты времени на основании измерений размера опухоли штангенциркулем. Объемы опухоли рассчитывали по формуле: Объем опухоли = $(L \times W^2) \times 0,5$, где L — длина опухоли, а W — ширина (оба в мм). Мышей исключали из исследования, как только опухоли превышали 3000 мм^3 .

На 14-й день после начала лечения исходных опухолей СТ26 средний объем опухоли у контрольных обработанных мышей составлял $1643,66 \text{ мм}^3$, мыши, получавшие **8**, имели статистически более низкий средний объем ($455,58 \text{ мм}^3$, значение р-критерия $T < 0,001$) по сравнению с контрольными мышами (таблица 11). Точно так же мыши, обработанные комбинацией **10** и **8**, также имели статистически более низкий средний объем ($373,46 \text{ мм}^3$, р-значение Т-теста $< 0,001$) по сравнению с контрольными мышами (таблица 11).

На 23-й день мыши, получавшие комбинацию **10** и **8**, также имели статистически более низкий средний объем ($653,10 \text{ мм}^3$, значение р для Т-теста $0,01$) по сравнению с мышами, получавшими только **8** ($2156,90 \text{ мм}^3$, таблица 12), демонстрируя что лечение **10** может усиливать лечебные эффекты других иммунотерапевтических средств, таких как лечение **8**. Аналогичным образом, к 100 дню 6/8 мышей, получавших комбинацию **10** и **8**, продемонстрировали полный ответ без обнаруживаемых опухолей по сравнению только с 2/8 мышами, получавшими только **8** (таблица 12).

Таблица 11: Размеры исходных опухолей СТ26 на 14-й день после начала лечения

Лечение	День 14			
	N	Средний размер опухоли мм^3	SD	Т-тест р-значение по сравнению с контрольной группой
Контроль	8	1643.66	693.04	1.00
8	8	455.58	182.84	< 0.001

8 + 10	8	373.46	207.71	<0.001
---------------	---	--------	--------	--------

Таблица 12: Размеры исходных опухолей СТ26 на 23-й день после начала лечения и число полных респондеров (CR) через 100 дней после начала лечения

Лечение	день 23				день 100
	N	Средний размер опухоли мм ³	SD	Т-тест р-значение по сравнению с только TLR	# CR
8	8	2156.90	1236.93	1.00	2 of 8
8 + 10	8	653.10	719.81	0.010	6 of 8

WT-наивным необработанным мышам или мышам, демонстрирующим полный ответ или имеющим опухоли размером менее 80 мм³ при начальной рандомизации, повторно вводили СТ26 путем инокуляции в противоположный бок через 73 дня после начала первоначального лечения. На 21-й день после повторной стимуляции у «наивных» мышей наблюдался явный рост опухоли со средним размером опухоли 1320,28 мм³, в то время как мыши, ранее получавшие **8** или комбинацию **8** и **10**, все отторгали повторно вводимые опухолевые клетки толстой кишки СТ26, демонстрируя иммунный ответ памяти (таблица 13).

Таблица 13: Размеры опухолей повторно вводимых опухолей СТ26 на 21-й день после начала лечения и количество полных респондеров (CR) через 21 день после начала лечения

День 21 после повторного введения СТ26					
Животные	N	Средний размер опухоли	SD	Т-тест р-значение по	Количество ответов на новое введение СТ26

		мм ³		сравнению с наивными мышами	
Наивные	8	1320.28	340.65	1.00	0 of 8
CR обработки 8	2	0	0	< 0.001	2 of 2
CR обработки 8 + 10	6	0	0	< 0.001	6 of 6

WT-наивным необработанным мышам или мышам, демонстрирующим полный ответ на повторную стимуляцию СТ26, вводили опухолевые клетки ЕМТ6 молочной железы путем инокуляции в третьем отдельном месте через 28 дней после повторной стимуляции СТ26. На 18-й день после введения ЕМТ6 у не получавших лечения мышей наблюдался явный рост опухоли со средним размером опухоли 2224,38 мм³, в то время как у мышей, ранее получавших **8**, средний размер опухоли составлял 529,24 мм³ и не было полного ответа на стимуляцию опухолью ЕМТ6 (таблица 14). Напротив, мыши, ранее получавшие комбинацию на **8** и **10**, продемонстрировали значительно меньший средний размер опухоли 12,21 мм³ (значение Т-критерия $p < 0,001$), а 4/6 мышей продемонстрировали полный ответ на провокацию ЕМТ6 (таблица 14).

Таблица 14: Размеры опухолей повторно вводимых опухолей ЕМТ6 на 18-й день после начала лечения и число полных респондеров (CR) через 18 дней после начала лечения

День 18 после введения ЕМТ6					
Животные	N	Средний размер опухоли мм ³	SD	Т-тест р-значение по сравнению с наивными мышами	Количество CR на ЕМТ6

наивные	8	2224.38	1048.32	1.00	0 of 8
CR от лечения 8 и повторного введения СТ26	2	529.24	281.00	0.061	0 of 2
CR от лечения 8 + 10 и повторного введения СТ26	6	12.21	18.94	< 0.001	4 of 6

Пример 16: Фармакодинамические эффекты полимерного пролекарства **5 мутеина PL-2 Ala-M1 у аутбредных мышей CD1**

Были проведены исследования для измерения фармакодинамических эффектов **5** у здоровых мышей. **5** вводили внутривенно мышам CD-1 в рамках 22-дневного исследования повторного дозирования еженедельно (всего три дозы). Исследование включало четыре группы доз (0, 1,8, 3,6 и 6,0 мг/кг/неделю), получавших **5** внутривенно медленным болюсом один раз в неделю, и включало оценку подтипов лимфоцитов посредством иммунофенотипирования проточной цитометрией (см. Таблицу 15). **5** индуцировал устойчивую экспансию и активацию CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток у здоровых мышей CD-1, включая повышенное соотношение CD8⁺ Т-клеток к CD4⁺ Т-клеткам и CD8⁺ Т-клеток к Treg по сравнению с необработанными мышами.

Таблица 15: Субпопуляции лимфоцитов, оцененные с помощью иммунофенотипирования проточной цитометрии в 22-дневном исследовании токсичности повторных доз на мышах

Подмножество лимфоцитов	Фенотип
Всего Т-клеток	CD45 ⁺ CD3 ⁺
Вспомогательные Т-клетки (CD4 ⁺ Т-клетки):	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺
Цитотоксические Т-клетки	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺

(CD8 ⁺ Т-клетки):	
Т Регуляторные клетки:	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺
Естественные клетки-киллеры:	CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD8 ⁺ CD335 ⁺ (NKp46 ⁺) CD11b ^{+/-}
Гранзим В ⁺ НК клетки:	CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD8 ⁺ CD335 ⁺ (NKp46 ⁺) CD11b ^{+/-} Гранзим В ⁺
γδ Т клетки:	CD45 ⁺ CD3 ⁺ γδ ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻
CD44 ⁺ хелперные Т клетки:	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD44 ⁺
CD44 ⁺ цитотоксические Т клетки:	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ⁺
Гранзим В ⁺ цитотоксические Т клетки	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ Гранзим В ⁺

Образцы крови для иммунофенотипического анализа собирали после первой дозы в 1-й день и третьей дозы в 15-й день через 48, 96 и 168 часов после введения дозы и после второй дозы в 8-й день через 96 и 168 часов после введения дозы. Сильное размножение и активация CD8⁺ Т-клеток наблюдались после лечения мышей **5**. Частота CD8⁺ Т-клеток в Т-клетках увеличивалась дозозависимым образом при лечении **5** (данные не показаны), как и соотношение CD8⁺ Т-клеток к CD4⁺ Т-клеткам (таблица 16), и эти соотношения дополнительно увеличивались при втором и третьем циклах дозирования, что приводит к кумулятивным эффектам.

Таблица 16: Среднее соотношение CD8/CD4 на группу дозирования и пол у **5** получавших лечение мышей CD1:

Пол	День исследования				
	я	0 мг/кг	1.8 мг/кг	3.6 мг/кг	6.0 мг/кг
Ж	3	0.35	0.41	0.30	0.22
Ж	5	0.32	0.55	0.56	0.91
Ж	8	0.32	0.59	0.60	1.39
Ж	12	0.40	0.91	1.41	3.52
Ж	15	0.32	1.77	1.06	2.14
Ж	17	0.40	0.96	0.97	1.27
Ж	19	0.52	0.77	2.25	5.53
Ж	22	0.44	3.43	4.77	26.51
М	3	0.43	0.39	0.40	0.23

М	5	0.47	0.59	0.76	1.31
М	8	0.45	0.75	1.32	1.89
М	12	0.42	0.93	1.93	n.d.
М	15	0.40	0.94	3.66	n.d.
М	17	0.37	1.55	3.39	n.d.
М	19	0.38	0.96	2.54	n.d.
М	22	0.43	2.46	5.33	n.d.

n.d. не определено

Кроме того, соотношение CD8⁺ Т-клеток к Tregs также увеличивалось при лечении кумулятивным образом с дополнительными циклами дозирования (таблица 17).

Таблица 17: Среднее соотношение CD8/Treg на группу дозирования и пол у 5 получавших лечение мышей CD1:

Пол	День исследования	0 мг/кг	1.8 мг/кг	3.6 мг/кг	6.0 мг/кг
Ж	3	5.83	4.91	2.76	2.52
Ж	5	5.87	3.47	1.48	1.45
Ж	8	8.01	9.17	6.85	4.37
Ж	12	8.34	6.05	5.49	4.63
Ж	15	5.80	13.43	5.66	10.08
Ж	17	5.07	8.18	9.25	6.80
Ж	19	10.19	5.89	7.50	n.d.
Ж	22	10.47	30.27	33.44	44.63
М	3	10.87	3.71	3.64	3.84
М	5	7.97	4.50	3.83	2.33
М	8	12.64	9.64	12.19	5.04
М	12	8.26	5.58	4.56	n.d.
М	15	14.39	11.24	19.78	n.d.
М	17	6.66	15.27	10.25	n.d.
М	19	8.63	5.85	7.50	n.d.
М	22	8.58	41.05	33.30	n.d.

n.d. не определено

Наконец, CD8⁺ Т-клетки демонстрировали повышенный фенотип эффектора/памяти после лечения с зависимым от дозы и времени увеличением, наблюдаемым в процентах CD44⁺ клеток в популяции CD8⁺ Т-клеток (таблица 18). Следует отметить, что у контрольных мышей изменений в этих характеристиках не наблюдалось. Для всех этих показателей активации CD8⁺ Т-клеток более сильный эффект часто наблюдался у самцов (М) по сравнению с самками (Ж), особенно при дозе 3,6 мг/кг/неделю.

Таблица 18: Процент CD44⁺ CD8 Т-клеток на группу дозирования и пол у мышей CD1, получавших лечение 5:

Пол	День исследования	0 мг/кг	1.8 мг/кг	3.6 мг/кг	6.0 мг/кг
Ж	3	53.23	64.97	48.87	55.43
Ж	5	48.70	51.77	70.20	82.80
Ж	8	53.93	69.87	79.13	80.77
Ж	12	32.47	82.07	83.87	95.67
Ж	15	53.03	75.80	81.03	93.87
Ж	17	43.47	73.33	82.53	87.90
Ж	19	38.53	71.97	90.33	95.97
Ж	22	30.67	90.60	91.73	98.93
М	3	58.63	49.03	63.73	62.53
М	5	48.93	58.97	76.17	96.10
М	8	47.93	70.13	82.47	90.05
М	12	45.63	81.67	95.43	n.d.
М	15	44.37	70.53	89.83	n.d.
М	17	48.87	85.50	90.80	n.d.
М	19	68.30	75.27	85.63	n.d.
М	22	44.77	83.90	89.67	n.d.

n.d. не определено

В дополнение к эффектам Т-клеток было отмечено сильное увеличение количества НК-клеток/мкл крови в зависимости от дозы (таблица 19).

Таблица 19: Количество НК-клеток/мкл крови на группу дозирования и пол у мышей CD1, получавших лечение 5:

Пол	День исследования	0 мг/кг	1.8 мг/кг	3.6 мг/кг	6.0 мг/кг
Ж	3	156	339	168	110
Ж	5	181	1659	6257	5760
Ж	8	71	477	2412	8488
Ж	12	229	3702	13228	12354
Ж	15	189	984	5131	25376
Ж	17	182	433	1101	17301
Ж	19	172	1263	9955	18148
Ж	22	153	1588	3709	91167
М	3	61	149	118	53
М	5	304	4628	7920	12466
М	8	135	2545	6463	22322
М	12	99	14263	12822	n.d.
М	15	105	296	17025	n.d.
М	17	107	2906	5038	n.d.
М	19	222	5462	8726	n.d.
М	22	93	1129	41788	n.d.

n.d. не определено

Кроме того, обработка **5** индуцировала фенотип активированных НК-клеток, что измеряется процентом клеток гранзим В⁺ НК (таблица 20). Следует отметить, что у контрольных мышей изменений в этих характеристиках не наблюдалось.

Таблица 20: Процент НК-клеток, демонстрирующих активированный фенотип гранзим В⁺, в зависимости от группы дозирования и пола у мышей CD1, получавших лечение **5**:

Пол	День исследования	0 мг/кг	1.8 мг/кг	3.6 мг/кг	6.0 мг/кг
Ж	3	1.7	30.9	62.3	87.5
Ж	5	8.3	23.6	61.4	94.8
Ж	8	12.3	17.9	50.5	82.3
Ж	12	7.6	56.3	84.2	73.7
Ж	15	7.3	38.5	76.1	97.4

Ж	17	3.2	62.3	81.6	93.6
Ж	19	5.4	41.2	81.3	87.7
Ж	22	8.7	33.9	68.7	62.8
М	3	1.7	42.9	71.2	88.1
М	5	1.6	13.1	25.7	98,0
М	8	12.7	29.0	56.3	93.7
М	12	6.6	72.4	87.9	n.d.
М	15	9.4	25.1	70.5	n.d.
М	17	.3	94.2	97.3	n.d.
М	19	3	63.9	77.2	n.d.
М	22	6.6	31.1	81.6	n.d.

n.d. не определено

В целом, фармакологические изменения, зависящие от дозы и времени, наблюдались у мышей, обработанных **5**, которые показали значительное увеличение количества NK-клеток и селективное увеличение числа CD8⁺ T-клеток по сравнению с CD4⁺ T-клетками наряду с индукцией фенотипа клеток памяти/эффекторных клеток (CD44⁺) в CD8⁺ T-клетках.

Пример 17. Токсикокинетика соединений **5** и **3** у яванских макак

Токсикокинетика **5** и **3**, высвобождаемого из **5**, определяли после того, как **5** вводили в дни 1 и 15 обезьянам посредством внутривенного (IV) медленного болюсного введения в соответствии со схемой дозирования, показанной в Таблице 21.

Таблица 21: Уровни доз и количество животных для каждой группы дозирования

Группа	Число животных		Уровень дозы (мг/кг/раз)*
	Мужчина	Женский	
1 (низкий)	1	1	0,1
2 (средний)	1	1	0,3
3 (высокий)	1	1	День 1: 0,9
			День 15: 0,75

* Доза в мг **1** эквивалента

Образцы крови собирали у всех животных в день 1 перед введением дозы и примерно через 2, 6, 24, 48, 96, 144, 216 и 336 часов (до 2-й дозы) после введения дозы. Кроме того, образцы крови собирали у всех животных на 15-й день примерно через 2, 6, 24, 48, 96, 144, 216 и 336 часов после введения дозы. Образцы крови перерабатывали в плазму и анализировали на **5** и **3**.

5 количественно определяли в литий-гепариновой (Li-Нер) плазме яванских макаков с использованием метода сэндвич-ELISA. 96-луночный планшет покрывали крысиным моноклональным иммуноглобулином G (IgG) антителом против IL-2. После блокирования планшета образцы, содержащие **5**, пипеткой вносили в лунки с последующим добавлением биотинилированного кроличьего моноклонального антитела IgG к ПЭГ для связывания с иммобилизованным **5**. Комплекс выявляли меченной стрептавидином пероксидазой. После промывки для удаления несвязавшихся реагентов фермент выявляли по действию на субстрат ТМВ. После остановки реакции сильной кислотой интенсивность окраски (считываемая при 450 нм; корректирующая длина волны 620 нм) была прямо пропорциональна количеству **5**, присутствующему в образце.

Высвобожденный **3** отделяли от **5** в образцах плазмы Li-Нер обезьяны с использованием агарозных шариков, покрытых мышинным моноклональным иммуноглобулином M (IgM) антителом против ПЭГ. За стадией разделения следовал сэндвич-ELISA для количественного определения **3**. 96-луночный планшет покрывали крысиным моноклональным захватывающим антителом IgG против IL-2. После блокировки планшета образцы, содержащие **3**, пипеткой вносили в лунки с последующим добавлением биотинилированного кроличьего поликлонального антитела IgG против IL-2 для детекции для связывания с иммобилизованным **3**. Биотинилированное детектирующее антитело распознается конъюгатом стрептавидин-пероксидаза хрена. Связывание этого конъюгата с комплексом антитело-**3** анализировали с превращением 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ). Реакцию останавливали подкислением и регистрировали УФ-поглощение при 450 нм.

Сводка индивидуальных и средних токсикокинетических параметров для **5** и высвобожденного **3** в плазме обезьян показана ниже в Таблице 22 и Таблице 23 соответственно.

Различия по полу в средних значениях C_{\max} и AUC_{0-336} **5** и **3** были менее чем в 2 раза. Воздействие, оцениваемое по средним значениям C_{\max} и AUC_{0-336} **5** и **3**, увеличивалось с увеличением уровней дозы **5** с 0,1 до 0,9 мг/кг/введение в 1-й день и с 0,1 до 0,75 мг/кг/введение в День 15. Увеличение средних значений C_{\max} и AUC_{0-336} в целом

было пропорциональным дозе. Не наблюдалось накопления **5** или **3** после многократных доз **5** у обезьян при уровнях доз 0,1 и 0,3 мг/кг/введение (нет выводов относительно высокого уровня дозы из-за разных доз в День 1 и День 15).

Таблица 22: Сводка индивидуальных и средних токсикокинетических параметров **5** в плазме обезьяны

Интервал (день)	Группа дозы	Уровень дозы 5 (мг/кг/введение)	Пол	Животное	C _{макс.} (нг/мл)	t _{макс} (ч)	AUC ₀₋₃₃₆ (ч*нг/мл)	t _{1/2} (ч)
1	1	0.1	М	P0001	2,490	2.00	116,000	38.7
			Ж	P0301	2,370	2.00	126,000	48.5
				среднее	2,430	2.00	121,000	43.6
	2	0.3	М	P0101	7,500	2.00	310,000	47.0
			Ж	P0401	7,530	2.00	334,000	54.8
				среднее	7,520	2.00	322,000	50.9
	3	0.9	М	P0201	18,600	6.00	881,000	51.0
			Ж	P0501	18,500	6.00	862,000	44.1
				среднее	18,600	6.00	872,000	47.5
15	1	0.1	М	P0001	3,180	24.0	149,000	30.3
			Ж	P0301	2,540	2.00	118,000	55.9
				среднее	2,860	13.0	133,000	43.1
	2	0.3	М	P0101	6,540	2.00	215,000	50.5
			Ж	P0401	5,440	2.00	255,000	57.8
				среднее	5,990	2.00	235,000	54.1
	3	0.75	М	P0201	15,900	2.00	548,000	51.0
			Ж	P0501	15,700	2.00	610,000	48.4
				среднее	15,800	2.00	579,000	49.7

Примечания: медианные значения представлены для t_{макс.}
Дозы вводили в дни 1 и 15.

Таблица 23: Сводка индивидуальных и средних токсикокинетических параметров **3**, высвобожденных из **5** в плазме обезьяны

Интервал (день)	Группа дозы	Уровень дозы 5 (мг/кг/введение)	Пол	Животное	C _{макс.} (нг/мл)	t _{макс} (ч)	AUC ₀₋₃₃₆ (ч*нг/мл)	t _{1/2} (ч)
-----------------	-------------	--	-----	----------	----------------------------	-----------------------	--------------------------------	----------------------

1	1	0.1	М	P0001	28.0	2.00	1,020	35.4
			Ж	P0301	36.0	2.00	1,350	34.5
				среднее	32.0	2.00	1,190	35.0
	2	0.3	М	P0101	88.0	2.00	3,730	29.6
			Ж	P0401	110	2.00	4,540	41.1
				среднее	99.0	2.00	4,130	35.4
	3	0.9	М	P0201	290	2.00	12,600	43.0
			Ж	P0501	270	2.00	10,700	39.3
				среднее	280	2.00	11,600	41.2
15	1	0.1	М	P0001	43.0	24.0	1,690	39.4
			Ж	P0301	33.0	2.00	1,390	40.6
				среднее	38.0	13.0	1,540	40.0
	2	0.3	М	P0101	120	2.00	2,920	34.7
			Ж	P0401	100	2.00	4,340	45.0
				среднее	110	2.00	3,630	39.8
	3	0.75	М	P0201	250	2.00	9,380	63.0
			Ж	P0501	220	2.00	6,760	44.7
				среднее	235	2.00	8,070	53.8

Примечания: медианные значения представлены для t_{max} .
Дозы вводили в дни 1 и 15.

Пример 18. Связывание с рецептором конъюгата мутеина IL-2 Ala-M1-5кДа ПЭГ 3 и 4, а также смеси 7 полимерного пролекарства с высвобождением мутеина IL-2 Ala-M1 в экспериментах по связыванию IL-2R α и IL - 2R β и вычисление отклонения

Способ действия пролекарств 5 и 6 был продемонстрирован путем тестирования их активного компонента 3 и 4, соответственно, на его специфическое связывание с субъединицей IL-2R. Активным компонентом был либо очищенный вариант 3 или 4, либо основной компонент в смеси высвобождаемого полимерного пролекарства мутеина IL-2 Ala-M1 7. Исследования связывания с использованием Biacore проводили путем введения 3, 4, 7 и объективного контроля рекомбинантного человеческого IL-2, соединения 12 (SEQ ID NO:45), на сенсорные чипы, покрытые IL-2R α -Fc человека или IL-2R β -Fc человека. Результаты сведены в таблице 24. 3, 4 и 7 представляют собой несимметричные молекулы IL-2, поскольку все они не продемонстрировали связывания с IL-2R α вплоть до концентрации 2 мкМ в отличие от 12, но все показали связывание с IL-2R β . 3, 4 и 7

показали очень сравнимые константы диссоциации с IL-2R β (K_{DS} около 2 мкМ), которые немного снижены (в 3-5 раз) по сравнению с **12** (приблизительно 0,5 мкМ).

Таблица 24: Результаты связывания Вiасоге для связывания с человеческим IL-2R α или IL-2R β

Соединение	K_D для IL-2R α [нМ]	K_D для IL-2R β [мкМ]
12	9.57	0.45
3	NA	1.84
7	NA	2.23
4	NA	1.79

NA = неприменимо, т. е. значение не может быть вычислено из-за отсутствия связывания.

В независимом измерении рецепторное связывание альдеслейкина **11** измеряли по сравнению с объективным контролем рекомбинантного человеческого IL-2, соединения **12** (SEQ ID NO:45). Альдеслейкин **11** был получен в соответствии с примером 11. Было обнаружено, что оба соединения **12** и **11** имеют очень сравнимые значения K_D как для IL-2R α , так и для IL-2R β и, таким образом, имеют сравнимую аффинность связывания с обоими рецепторами.

Смещение IL-2 определяется на основе соотношений K_D модифицированного IL-2 к альдеслейкину по отношению к их связыванию с IL-2R α и IL-2R β соответственно, как описано следующей формулой.

$$\text{смещение} = \frac{\text{Соотношение}_{\text{несимметричный IL-2}}}{\text{Соотношение}_{\text{альдеслейкин}}} > 1$$

где

$$\text{Соотношение}_{\text{несимметричный IL-2}} = \frac{K_D \text{ несимметричный IL-2 к IL-2R}\alpha}{K_D \text{ несимметричный IL-2 к IL-2R}\beta}$$

$$\text{Соотношение}_{\text{альдеслейкин}} = \frac{K_D \text{ альдеслейкин к IL-2R}\alpha}{K_D \text{ альдеслейкин к IL-2R}\beta}$$

с

« K_D несимметричный IL-2 к IL-2R α » представляет собой K_D несимметричного IL-2 к IL-2R α ,

« K_D несимметричный IL-2 к IL-2R β » представляет собой K_D несимметричного IL-2 к IL-2R β ,

« K_D альдеслейкин к IL-2R α » представляет собой K_D альдеслейкина к IL-2R α , и

« K_D альдеслейкин к IL-2R β » представляет собой K_D альдеслейкина к IL-2R β .

С K_D **11** = K_D **12** как для связывания IL-2R α , так и для IL-2R β , и с использованием вышеупомянутой формулы были рассчитаны следующие соотношения, которые суммированы в Таблице 25.

Таблица 25: Соотношение несимметричного IL-2 к соотношению альдеслейкина для различных конъюгатов IL-2 мутеина.

Соединение	Смещение = Соотношение _{несимметричный IL-2} / Соотношение _{альдеслейкин *}
3	>51
7	>42
4	>53

* из-за отсутствия связывания с IL-2R α для расчетов использовалась самая высокая испытанная концентрация (2 мкМ)

Пример 19: Биологическая активность 3 и 7 в НН, клеточной линии, экспрессирующей IL-2R $\beta\gamma$

Для подтверждения биологической активности **3** и **7** были проведены эксперименты с клеточной линией НН, зрелой Т-клеточной линией, полученной из периферической крови пациента с агрессивным кожным Т-клеточным лейкозом/лимфомой (ATCC®^{CRL}-2105™), которая, как было продемонстрировано, только экспрессирует 2R β/γ . Одним из самых ранних событий опосредованной цитокинами активации лимфоцитов, таких как CD8⁺ Т-клетки и NK-клетки, является фосфорилирование, опосредованное янус-ассоциированной киназой, и активация преобразователя сигнала и активатора транскрипции (pSTAT5). Таким образом, pSTAT5 использовали для измерения биологической активности **3** и **7** наряду с **12**. **3** продемонстрировал явную биологическую активность в клетках НН, экспрессирующих IL-2R β/γ (EC₅₀: 773 нг/мл), которая была приблизительно в 3,5 раза ниже, чем **12** (EC₅₀: 233 нг/мл). Кроме того, **7** индуцировал биоактивность (EC₅₀: 756 нг/мл), очень сходную с **3**, демонстрируя, что **7** сохраняет биологическую активность после высвобождения из пролекарства **5** даже после ускоренных (стрессовых) условий.

Пример 20: Биологическая активность 3 и 7 в первичных лимфоцитах крови человека, яванского макака и мыши

Идентичность аминокислотной последовательности IL-2 и субъединиц его рецептора у человека и мыши или человека и яванского макака показана в таблице 26.

Таблица 26: Процентная идентичность аминокислотной последовательности между IL-2 и субъединицы рецептора IL-2 человека, мышей и яванских макак

Белок	Идентичность последовательности человека и мыши	Идентичность последовательности человека и яванского макака
IL-2	63%	96%
IL-2R α	61%	92%
IL-2R β	58%	94%
IL-2R γ	71%	97%

Хотя идентичность последовательностей IL-2 и рецептора IL-2 у человека и мыши составляет всего 58-71%, мышинные модели широко использовались для тестирования фармакологических и противоопухолевых эффектов IL-2 и вариантов IL-2. Напротив, яванские макаки имеют гораздо более высокую идентичность последовательностей IL-2 и IL-2R с человеческими (92-97%, таблица 26). Чтобы экспериментально подтвердить, что яванские макаки и мыши являются соответствующими видами для изучения **5**, экспериментов с PD с использованием **3**, а также меченого his-меченого контрольного IL-2 человека, экспрессированного млекопитающим, соединения **13** (SEQ ID NO: 46), были проведены испытания на биологическую активность с использованием образцов крови человека, яванского макака или мыши.

Для того, чтобы определить специфические для типа клетки иммуностимулирующие эффекты **3** в первичных клетках человека или обезьяны, цельную кровь человека или яванского макака от двух доноров инкубировали с различными концентрациями **3** или **13** в течение 30 минут и анализировали с помощью проточной цитометрии на внутриклеточные уровни фосфорилированного STAT5 (pSTAT5) в уникальных подмножествах клеток, таких как Tregs, которые преимущественно экспрессируют IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$, а также CD8⁺ Т-клетки (CD8) и NK-клетки, которые преимущественно экспрессируют IL-2R β/γ . Кроме того, CD8⁺ Т-клетки дополнительно анализировали на наличие подмножеств CD8⁺ CD45RA⁺ наивные (CD8 N), а также CD8⁺ CD45RA⁻ памяти (CD8 M). Аналогичные эксперименты были проведены с кровью мышей с использованием другой панели мышинных специфических антител. Все подмножества

были проанализированы на среднюю интенсивность флуоресценции pSTAT5, и значения EC₅₀ были рассчитаны для каждого соединения во всех типах клеток.

Как у людей, так и у яванских макак, по сравнению с **13**, **3** продемонстрировало существенно сниженную эффективность в отношении Treg при сохранении сходной и слегка сниженной активности в отношении CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток. Например, в крови человека **13** продемонстрировали значение EC₅₀ для pSTAT5 в Treg 0,09 нг/мл, тогда как **3** показало значительно более высокое значение EC₅₀ 34,5 нг/мл в этой популяции. Напротив, **13** продемонстрировало значение EC₅₀ для pSTAT5 в человеческих NK-клетках 6,01 нг/мл, в то время как **3** продемонстрировало сопоставимое и немного менее сильное значение EC₅₀ 11,84 нг/мл в этой популяции (таблица 27).

Таблица 27: Сводка значений активности pSTAT5 в крови человека, яванского макака и мыши

EC ₅₀ (нг/мл)	Treg	CD8	NK
человек			
13	0.09	25.69	6.01
3	34.50	62.15	11.84
яванская макака			
13	0.09	45.10	10.52
3	52.16	86.4	16.26
мышь			
13	0.37	24,040.56	9,694.74
3	92.24	10,297.50	3,614.68

У мышей, по сравнению с **13**, **3** продемонстрировал существенно сниженную эффективность в отношении мышинных Treg при сохранении аналогичной и слегка повышенной активности в отношении CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток (таблица 27). Например, в крови мышей **13** продемонстрировало значение EC₅₀ для pSTAT5 в Treg 0,37 нг/мл, тогда как **3** показало значительно более высокое значение EC₅₀ 92,24 нг/мл в этой популяции. Напротив, **13** продемонстрировало значение EC₅₀ для pSTAT5 в мышинных NK-клетках 9694,74 нг/мл, в то время как **3** показало сопоставимое значение EC₅₀ 3614,68 для этой популяции (таблица 27).

В то время как субпопуляции лимфоцитов яванского макака демонстрировали эффективность, аналогичную **3**, по сравнению с их человеческими аналогами (эффективность в 1,37-1,51 раза ниже, таблица 28), у мышей это было не так.

Примечательно, что в то время как мышинные Treg демонстрировали аналогичную общую эффективность **3** по сравнению с человеческими Treg (т. е. эффективность в 2,67 раза ниже, таблица 28), мышинные IL-2R β/γ^+ CD8⁺ Т-клетки и NK-клетки демонстрировали заметно сниженную чувствительность к **3** по сравнению с людьми (165,69-кратная меньшая активность в CD8⁺ Т-клетках и 305,29-кратная меньшая активность в NK-клетках, таблица 28). Другими словами, мышинные CD8⁺ Т-клетки и NK-клетки, по-видимому, требуют гораздо более высоких доз **3** для активности по сравнению с их человеческими аналогами (таблица 28) или по сравнению с мышинными Treg (таблица 27). Следует отметить, что те же общие тенденции были очевидны для **13**.

Таблица 28: Кратность потери активности субпопуляций лимфоцитов яванского макака или мыши по сравнению с соответствующими субпопуляциями человека

Кратность эффективности сравнению с человеком	потери по	Treg	CD8	NK
яванские макаки				
13		1	1.76	1.75
3		1.51	1.39	1.37
мышь				
13		4.11	935.79	1613.10
3		2.67	165.69	305.29

В дополнительных экспериментах с кровью человека смесь, высвобождающая полимерных пролекарств мутеина IL-2 Ala-M1, **7** показала почти идентичную биологическую активность с **3** (таблица 29), демонстрируя, что **7** сохраняет полную биологическую активность после высвобождения из **5**.

Таблица 29: Сводка значений активности pSTAT5 в дополнительных экспериментах с кровью человека

EC ₅₀ (нг/мл)	Treg	CD8	NK
человек			
13	0.047	4.94	17.59
3	22.02	9.34	51.22
7	15.01	9.79	48.18

В целом, эти эксперименты демонстрируют, что первичные клетки человека, яванского макака и мыши могут быть активированы **3**, и что для всех трех видов **3** демонстрирует существенно сниженную эффективность Treg по сравнению с **13**, что согласуется с потерей связывания IL-2R α , наблюдаемой *in vitro*, и желаемым механизмом действия. Было отмечено, что в отличие от яванских макаков или людей, мышам требуются более высокие концентрации **3** (и, вероятно, более высокие дозы **5**) для активации CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток по сравнению с активацией клеток, экспрессирующих IL-2R α .

Пример 21: Биологическая активность соединений 3, 14, 15 в субпопуляциях лимфоцитов мононуклеарных клеток периферической крови человека

Для того, чтобы лучше понять влияние размера ПЭГ на точку присоединения цистеина 38 в соединении **1**, были предприняты дополнительные эксперименты для сравнения эффективности биоанализа в криоконсервированных РВМС человека Ala-M1 либо с 5 кДа (**3**), либо 10 кДа (**14**), либо 30 кДа (**15**) присоединения ПЭГ к цистеину38. Методы, подобные описанным, например, в примере 20, использовали для исследования индукции pSTAT5 в различных субпопуляциях лимфоцитов с использованием проточной цитометрии после 30-минутной стимуляции указанными соединениями. Данные обобщены в таблицах 30 и 31 и демонстрируют, что увеличение размера ПЭГ на поверхности связывания IL-2R α , особенно после 10 кДа, снижает активность не только в Treg, но и в клетках, экспрессирующих IL2R $\beta\gamma$, таких как CD8⁺ Т-клетки и NK-клетки. Например, **15** показало значение эффективности EC₅₀ в CD8⁺ Т-клетках, которое было в 5,4 раза ниже, чем у **3** (802,17 против 148,31 соответственно, таблица 30), и в 16,46 раза ниже, чем у контрольного для IL-2 соединения **13** (таблица 31). Точно так же соединение **15** продемонстрировало значение активности EC₅₀ в NK-клетках, которое было в 6,77 раза ниже, чем у **3** (192,25 против 28,41 соответственно, таблица 30), и в 14,73 раза ниже, чем у контрольного для IL-2 соединения **13** (таблица 31). В целом эти данные показывают, что увеличение размера ПЭГ, блокирующего IL-2R α , выше 10 кДа, ингибирует эффективность в отношении типов клеток, экспрессирующих IL2R $\beta\gamma$, в то время как меньшие размеры ПЭГ 5 кДа обеспечивают блокирование IL-2R α , сохраняя при этом лучшую эффективность в отношении клеток, экспрессирующих IL2R $\beta\gamma$.

Таблица 30: Сводка значений эффективности pSTAT5 для **3**, **14** и **15** в криоконсервированных РВМС человека.

EC ₅₀ (нг/мл)	Treg	CD8	NK
3	105.48	148.31	28.41
14	162.87	242.50	49.41
15	432.88	802.17	192.25

Таблица 31: Кратность потери эффективности по сравнению с контрольным для IL-2 **13**, **14** и **15** в криоконсервированных РВМС человека

EC ₅₀ (нг/мл)	CD4- CD8- T клетки	CD8	NK
3	3.24	3.04	2.18
14	4.92	4.97	3.78
15	16.24	16.46	14.73

Пример 22: Биологическая активность соединений 3 и 4 в субпопуляциях лимфоцитов мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Были предприняты эксперименты для сравнения эффективности биоанализа **1** с вариантами ПЭГ 5 кДа, представленными соединениями **3** или **4**. Методы, подобные описанным, например, в примере 20, использовали для исследования индукции pSTAT5 в различных субпопуляциях лимфоцитов с использованием проточной цитометрии после 30-минутной стимуляции указанными соединениями. Данные обобщены в Таблице 32 и демонстрируют, что соединения **3** и **4** демонстрируют очень схожую эффективность.

Таблица 32: Сводка значений эффективности pSTAT5 для соединений **3** и **4** в криоконсервированных РВМС человека

EC ₅₀ (нг/мл)	Treg	CD4	CD8	CD4-CD8- T клетки	NK
3	86.36	485.76	126.59	142.31	22.05
4	90.93	485.83	133.77	155.85	24.02

Например, соединения **3** и **4** в этом эксперименте показали очень близкие значения активности EC₅₀ в CD8+ T-клетках 126,59 и 133,77 соответственно. Сходным образом, соединения **3** и **4** в этом эксперименте показали очень близкие значения эффективности EC₅₀ в NK-клетках, 22,05 и 24,02 соответственно. В целом, эти данные показывают отсутствие существенных различий в эффективности соединений **3** и **4** для типов клеток

IL-2R α / β / γ +, таких как Treg, а также для типов клеток IL-2R β / γ +, таких как CD8+ Т-клетки и NK-клетки.

Пример 23: Противоопухолевая активность полимерного пролекарства 10 мутена M1 IL-2 в сочетании с иммунотерапией против PD1 или против CTLA4

Исследование проведено на самках мышей BALB/C в возрасте 9-11 недель на день инокуляции опухоли. Мышам имплантировали 5×10^5 опухолевых клеток CT26 в правый задний бок. Когда опухоли были выращены до среднего объема опухоли около 85 мм³, мышам рандомизировали в лечебные когорты (0-й день) для введения внутривенного в 0-й, 6-й и 16-й день 200 мкл контрольного буфера, 10 мг/кг анти-mCTLA4 (9D9) внутривенно два раза в неделю в течение двух недель в дни 0, 3, 7 и 10, 10 мг/кг анти-mPD1 (RMP1-14) внутривенно два раза в неделю в течение двух недель в дни 0, 3, 7 и 10, одной внутривенной дозы в День 0 и одной внутривенной дозы в 6-й день и одной внутривенной дозы в 16-й день 200 мкл 60 мкг **10**, или комбинации одной внутривенной дозы на 0-й день и одной внутривенной дозы на 6-й день и одной внутривенной дозы на 16-й день 200 мкл 60 мкг **10**, и лечения анти-CTLA4 или анти-PD1, как описано выше

Объемы опухоли рассчитывали по формуле: Объем опухоли = $(L \times W^2) \times 0,5$, где L — длина опухоли, а W — ширина (оба в мм). Мышей исключали из исследования, как только опухоли превышали 3000 мм³, и исследование проводили в соответствии с местными правилами защиты животных. Для сравнения относительных объемов опухолей в разных группах в заранее установленный день использовали критерий Бартлетта для проверки предположения об однородности дисперсии во всех группах. Когда р-значение теста Бартлетта было $\geq 0,05$, выполняли однофакторный дисперсионный анализ для проверки общего равенства средних во всех группах. Если р-значение однофакторного ANOVA было $<0,05$, дополнительно выполняли апостериорное тестирование путем проведения тестов Тьюки HSD (достоверная значимая разница) для всех парных сравнений и тестов Даннета для сравнения каждой группы лечения с группой носителя. Когда р-значение теста Бартлетта было $<0,05$, были проведены тесты Крускала-Уоллиса для проверки общего равенства медиан среди всех групп. Если р-значение теста Крускала-Уоллиса было $<0,05$, проводили апостериорное тестирование, проводя непараметрический критерий Коновера для всех парных сравнений или для сравнения каждой лечебной группы с группой, получавшей носитель, в обоих случаях с одностадийным регулированием р-значения. Ингибирование роста опухоли (TGI) использовали в качестве индикатора противоопухолевой активности и рассчитывали по относительным объемам

опухолей в контрольной и лечебной группах из-за вариации объемов опухолей между группами в день 0. $TGI (\%) = (1-T/C) \times 100\%$, $T/C = MTV_T/MTV_C$, MTV_T : средний объем опухоли в группе лечения в день t , MTV_C : средний объем опухоли в контрольной группе в день t . Причем статистический анализ проводили на данных, собранных в тот день, когда все или большинство мышей в контрольных группах были живы.

Значения TGI на 14-й день в каждой группе суммированы в таблице 33. По сравнению с животными, обработанными буфером, значения ингибирования роста опухоли (TGI) 32,53%, 51,79% и 60,65% наблюдались при лечении **10**, анти-CTLA4 монотерапией или комбинацией **10** и анти-CTLA4 соответственно. Кроме того, комбинация **10** и анти-CTLA4 продемонстрировала более низкие средние объемы опухоли и более низкие значения p по сравнению с животными, обработанными буфером, чем лечение только **10** или анти-CTLA4 (таблица 33). Аналогичным образом, по сравнению с животными, обработанными буфером, значения TGI 47,21% и 57,82% наблюдались для групп, обработанных анти-PD1 или комбинацией анти-PD1 + **10**. Таким образом, на 14 -й день данные показывают повышенное ингибирование роста опухоли, более низкие средние объемы опухоли и более низкие (более значимые) значения p по сравнению с животными, обработанными буфером, в группах, получавших CTLA4 или PD1 в комбинации с **10**, по сравнению с группами, получавшими CTLA4 или PD1 по отдельности (таблица 33).

Таблица 33: Противоопухолевая активность **10** отдельно или в комбинации с анти-mCTLA4 (9D9) или анти-mPD1 (RMP1-14) у мышей с опухолями CT26.

Группа	Описание лечения	Средний объем опухоли (мм ³) на 14-й	T/C (%) ^b	TGI (%)	P значения
1	Буферный контроль	1643.66 ± 245.03 (8)	100.0	0.0	1.00
2	10	1109.03 ± 146.30 (8)	67.47	32.53	0.748
3	Анти-mCTLA4 (9D9)	792.33 ± 183.49 (8)	48.21	51.79	0.0082
4	Анти-mCTLA4 (9D9)	646.73 ± 162.41 (7)	39.35	60.65	0.0006
	10				

5	Анти-mPD1 (RMP1-14)	867.66 ± 134.52 (8)	52.79	47.21	0.0709
6	Анти-mPD1 (RMP1-14)	693.22 ± 85.35 (7)	42.18	57.82	0.0066
	10				

Примечания:

а. Среднее значение ± SEM (N), N — количество оставшихся животных в каждой группе.

б. T/C = MTV_t/MTV_c, MTV_t: средний объем опухоли в группах, MTV

с: средний объем опухоли в группе 1 буферного контроля.

с. TGI в обработанных группах по сравнению с группой 1 буферного контроля.

Пример 24: Кинетика высвобождения *in vitro* полимерного пролекарства 5 мутеина IL-2 Ala-M1

Кинетику высвобождения *in vitro* полимерного пролекарства 5 мутеина IL-2 Ala-M1 определяли при pH 7,4 и 37°C, чтобы имитировать физиологические условия pH и температуры. Для этой цели полимерное пролекарство 5 мутеина IL-2 Ala-M1 было подвергнуто замене буфера на 25 mM HEPES, 135 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 10 mM L-метионин, 2 мг/мл Pluronic F-68, pH 7,4, с использованием Системы Äkta и двух соединенных колонок для обессоливания HiTrap (Cytiva) с расходом 2 мл/мин и УФ-детектированием при 280 нм. Образцы с замененным буфером инкубировали при 37°C в условиях с регулируемой температурой на водяной бане в течение двух недель (333,5 ч). Определение расщепления линкера и высвобождения **3** выполняли после подкисления образцов жидкостной хроматографией высокого давления с обращенной фазой на системе Acquity UPLC I-Class Plus (Waters), оснащенной колонкой Acquity UPLC Peptide BEH C18 (300 Å, 1,7 мкм, 2,1 мм x 50 мм). Высвобождение количественно определяли в восемь различных моментов времени путем интеграции пика полимерного пролекарства **5 мутеина IL-2 Ala-M1** и видов, связанных с высвобождением (**3** и расщепленных 40 кДа mПЭГ-линкеров) на соответствующей хроматограмме ОФ-ВЭЖХ при 215 нм. Процент высвобожденных видов наносили на график в зависимости от времени инкубации, и использовали программное обеспечение для подбора кривой, чтобы применить нелинейную однофазную ассоциативную подгонку для определения времени полураспада кинетики расщепления линкера. Период полураспада линкера *in vitro* был определен как 54 часа (95% доверительный интервал = 50-58 часов) при pH 7,4 и 37°C.

Пример 25: Характер O-гликозилирования мутеина IL-2 Ala-M11 (SEQ ID NO:14)

Для поиска сайтов O-гликозилирования в мутеине IL- 2 Ala-M11 (SEQ ID NO:14) выполняли пептидное картирование. Для этой цели две партии мутеина IL-2 Ala-M11 (SEQ ID NO:14) расщепляли смесью трипсина и эндопротеиназы Lys-C в течение 18 часов при pH 8 и 37 °C (отношение фермента к субстрату = 1:10). После расщепления образцы разбавляли тем же объемом воды и анализировали с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии высокого давления с использованием колонки Halo C18 (Advanced Materials Technology, 90 Å, 2,1 x 100 мм, 2,7 мкм). Подвижная фаза состояла из 0,075 % TFA в воде (A) и 0,060 % TFA в ацетонитриле (B). Программа градиента соответствовала исходному составу 0,5 % B, который удерживался в течение 1 минуты, увеличивался до 25,7 % B за 8,2 минуты, увеличивался до 33 % B за 1,3 минуты, увеличивался до 61 % B за 15,5 минут с последующим увеличением до 99,9. % B за 0,2 мин (скорость потока = 0,5 мл/мин, температура колонки = 20,9°C). Идентификацию пептидных фрагментов проводили методом масс-спектрометрии высокого разрешения с использованием квадрупольного времяпролетного масс-спектрометра. Наиболее интенсивно гликозилированные виды определяли путем сравнения интенсивностей пиков при 215 нм.

Было обнаружено, что расщепленный пептидный фрагмент 1-8 (APTSSSTK) является O-гликозилированным (негликозилированного фрагмента APTSSSTK обнаружено не было). Возможные O-гликозилирования идентифицировали путем сравнения найденных масс пептидного фрагмента и теоретических масс из базы данных (GlycoMod Tool, ExPASy, Swiss Institute of Bioinformatics). Качественные результаты суммированы в Таблице 34 (для соответствия учитывались только биологически релевантные гликоформы).

Таблица 34: Предполагаемые гликоформы пептидного фрагмента APTSSSTK в двух партиях мутеина IL-2 Ala-M1 1 (SEQ ID NO:14)

Обнаруженная масса (массы) [M+H] ⁺	Теоретическая масса [M+H] ⁺	Отклонение [ppm]	Предполагаемая структура
1434.6346 1434.6308	1434.622	5.9 - 8.6	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)1
1450.6256	1450.617	5.9	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuGc)1
1451.6288	1451.637	-5.7	(Hex)2 (HexNAc)1 (дезоксигексоза)1
1637.7126	1637.701	5.3 - 5.8	(Hex)1 (HexNAc)2 (NeuAc)1

1637.7108			
1725.7322 1725.7284	1725.717	6.4 - 8.7	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)2 или (Hex)1 (HexNAc)3 (HexA)1
1741.7200 1741.7216	1741.712	4.4 - 5.4	(Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)1 (NeuGc)1
1799.7680 1799.7646	1799.754	5.7 - 8.8	(Hex)1 (HexNAc)2 (дезоксигексоза)1 (NeuGc)1 или (Hex)2 (HexNAc)2 (NeuAc)1

Наиболее интенсивными гликоформами в обеих партиях были (Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)2 и (Hex)1 (HexNAc)1 (NeuAc)1.

Пример 26: Экспрессия мутеинов П-2 в *E. coli*

Для экспрессии вариантов П-2 с мутациями в К35 последовательности ДНК, кодирующие Ala-M1 [SEQ ID NO:40], Ala-M1 K35E [SEQ ID NO:41], Ala-M1 K35D [SEQ ID NO:42], Ala-M1 K35Q [SEQ ID NO:43] и Ala-M1 K35S [SEQ ID NO:44] были получены из аминокислотных последовательностей (Ala-M1 [SEQ ID NO:14], Ala-M1 K35E [SEQ ID NO:35], Ala-M1 K35D [SEQ ID NO:39], Ala-M1 K35Q [SEQ ID NO:33] и Ala-M1 K35S [SEQ ID NO:29]) посредством обратной трансляции и оптимизации кодонов для экспрессии в *Escherichia палочка* (кишечная палочка). Кодон ATG был добавлен к 5'-концу каждой из последовательностей ДНК, чтобы обеспечить цитозольную экспрессию в *E. coli*. Последовательности ДНК были синтезированы (GeneArt) и клонированы в векторы экспрессии под контролем промотора Tac, индуцируемого IPTG. Векторы экспрессии, дополнительно содержащие ген устойчивости к канамицину для селекции, трансформировали в штамм-хозяин *E. coli* BL21, и полученные штаммы использовали для экспрессии мутантов Ala-M1 К35. Штаммы выращивали в течение ночи в среде LB-Кап (37°C, 250 об/мин), а ночные культуры использовали для инокуляции 50 мл среды TB-Mg-Кап во встряхиваемых колбах на 250 мл (37°C, 250 об/мин). Когда OD600 культур достигала 1, экспрессию индуцировали добавлением 0,1 мМ IPTG, и культуры оставляли при встряхивании на 5 часов перед сбором.

Для анализа выхода продукта в растворимой и нерастворимой клеточной фракции растворимые белки экстрагировали из 2 x 1 мл культуры из каждой встряхиваемой колбы с использованием 300 мкл реагента BugBuster. Оставшийся клеточный осадок растворяли в 300 мкл буфера для образцов, содержащего DTT, представляющего собой нерастворимую фракцию, и после загрузки обе фракции анализировали с помощью SDS-

PAGE. Результаты показали, что продукт присутствовал только в нерастворимой фракции для всех протестированных вариантов П-2.

Для экспериментов по рефолдингу тельца включения П-2 солюбилизировали в солюбилизирующем буфере (6 М гуанидин HCl, 8 мМ ДТТ, 50 мМ Трис, pH 8,5) и затем подвергали рефолдингу путем 50-кратного разведения в буфере для рефолдинга (1,2 М мочевины, 500 мМ аргинин HCl, 20% глицерин, 0,001% Tween 80, 12 мМ L-цистеин, 0,15 мМ цистамин 2HCl, 35 мМ Трис, pH 8,5). Смесь инкубировали 55 ч при перемешивании при комнатной температуре. После повторной укладки образцы брали для анализа ОФ-ВЭЖХ в течение времени повторной укладки. Метод RP-HPLC (колонка Waters X-bridge ВЕН C18, 300 Å, 3,5 мкм, 2,1 x 100 мм. Температура: 40°C. Элюент А: 0,05% TFA в UPW и Элюент В: 0,05% TFA в ACN. Линейный градиент от 25% до 75% В в течение 36 мин. Скорость потока 0,4 мл/мин, объем впрыска 50 мкл и УФ-детектирование при 220 нм) позволили разделить полностью восстановленный исходный материал П-2 и повторно свернутые мономерные варианты П-2 с кэпированием цистеина в R38C.

Результаты показывают увеличение концентрации правильно свернутого мономерного продукта с течением времени для всех протестированных вариантов. Более высокая начальная скорость образования и более высокая конечная концентрация свернутого мономерного продукта наблюдались для Ala-M1 K35D и Ala-M1 K35E по сравнению с Ala-M1. Мутанты Ala-M1 K35Q и Ala-M1 K35S не показали улучшения рефолдинга, но скорее имели очень сходные скорости образования и конечную концентрацию свернутого мономерного продукта по сравнению с Ala-M1. Самая высокая конечная концентрация правильно уложенного мономера была получена с вариантом Ala-M1 K35D (примерно в 1,8 раза выше, чем у Ala-M1), тогда как вариант Ala-M1 K35E имел конечную концентрацию повторно уложенного мономера, которая была примерно в 1,5 раза выше чем для Ала-М1. В данном случае кратное улучшение конечной концентрации оценивали путем сравнения площади пика продукта повторной укладки вариантов K35 с площадью пика продукта повторной укладки Ala-M1 после 47 часов повторной рефолдинга.

В попытке достичь растворимой периплазматической экспрессии Ala-M1 [SEQ ID NO: 14] и M1 [SEQ ID NO: 18] в *E.coli*, Ala-M1 и M1 были слиты на N-конце с рядом бактериальных сигнальных пептидов (dsbA, gllI, mal, OmpA, OmpC, OmpT, pelB, rhoA, torA, torT, EOX, STLL, SfmC, lamb, MglB, MmAp и tolB). Аминокислотные последовательности мутеинов П-2 по отдельности и слитые с сигнальными пептидами подвергали обратной трансляции, а полученные последовательности ДНК оптимизировали по кодонам для экспрессии в *E.coli*. Полученные последовательности

ДНК синтезировали и клонировали в вектор экспрессии, содержащий ген устойчивости к канамицину, для селекции под контролем промотора *ghm*, индуцируемого рамнозой (*Atum*). Плазмиду, сконструированную таким образом, трансформировали в штамм-хозяин *E.coli* BL21, и полученные штаммы использовали для экспресс-тестов небольшого масштаба. Штаммы выращивали при 37°C в течение ночи в среде ТВ-Кап, и ночные культуры использовали для инокуляции 0,5 мл ТВ-Mg-Кап до исходной OD600, равной 0,2. Когда OD600 культур достигала 0,8, экспрессию индуцировали добавлением 4 мМ рамнозы и культуры инкубировали при встряхивании в течение 4 часов перед сбором путем центрифугирования. Внешнюю мембрану периплазматического пространства разрушали и экстрагировали периплазматический белок из клеток перед приготовлением тотального клеточного лизата из оставшегося клеточного материала. Общий клеточный лизат разделяли на растворимую и нерастворимую фракции. Образцы фракций общего, растворимого и периплазматического белков затем денатурировали и подвергали SDS-PAGE в восстанавливающих условиях. Уровни экспрессии оценивали с помощью денситометрии полноразмерных белковых полос относительно стандарта IL-2 на гелях, окрашенных кумасси. Образцы также анализировали вестерн-блоттингом с использованием антитела IL-2. Положительный (клетки, экспрессирующие белок, присутствующий во всех анализируемых фракциях) и отрицательный (клетки с пустой экспрессионной плазмидой) контроли были включены в анализы для сравнения. Анализ SDS-PAGE не обнаружил продукта IL-2 ни в растворимых, ни в периплазматических образцах M1 или Ala-M1 с любым из протестированных сигнальных пептидов. Для M1 и Ala-M1, экспрессированных без сигнальной последовательности, во фракции тотального клеточного лизата на гелях SDS-PAGE наблюдали белковые полосы ожидаемого размера, и идентичность продукта подтверждали вестерн-блоттингом. Для M1 и Ala-M1, экспрессированных сигнальными последовательностями, в образцах тотального клеточного лизата на SDS-PAGE наблюдали белковые полосы слегка увеличенного размера, и идентичность полос подтверждали вестерн-блоттингом. Небольшое увеличение размера продукта согласуется с тем, что сигнальный пептид не отщепляется. Для некоторых сигнальных последовательностей не удалось обнаружить ни одного продукта ни в одной из фракций, в том числе в общем лизате клеток. Для M1 это имело место для 7 из 17 протестированных сигнальных пептидов (*dsbA*, *torT*, *tolB*, *EOX*, *STLL*, *SfmC* и *MmAp*), тогда как для Ala-M1 это имело место только для 3 сигнальных пептидов (*dsbA*, *torT* и *tolB*).

Аббревиатуры

AIEX	анионообменная хроматография
п.о.	пара оснований
СНО	яичник китайского хомячка
CV	объем колонки
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
DO	растворенный кислород
EDTA	Этилендиаминтетрауксусная кислота, 2,2',2'',2'''-(этан-1,2-диилдинитрило)тетрауксусная кислота
экв.	эквиваленты
HEPES	2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновая кислота
Hex	гексоза
HexNAc	N-ацетилгексоза
IL-2	интерлейуин-2
MES	4- морфолинэтансульфо кислота
mПЭГ	метоксиполиэтиленгликоль
NeuAc	N-ацетилнейраминовая кислота
NeuGc	N-гликолилнейраминовая кислота
PBS	физиологический раствор с фосфатным буфером
P. pastoris	Pichia pastoris
PTP	5 mM фосфата, 90 г/л дигидрата трегалозы, 0,2 % Pluronic F-68, pH 7,4
PVDF	Поливинилиденфторид, поли(1,1-дифторэтилен)
rcf	относительная центробежная сила
RP	обращенная фаза
ОФ-ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой
rt	комнатная температура
SDS-PAGE	Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия
SEC	Эксклюзионная хроматография по размеру
TBS	Трис-буферный раствор
TCEP	(трис(2-карбокэтил)фосфина гидрохлорид)
TMB	3,3',5,5'-тетраметилбензидин

TRIS	трис(гидроксиметил)аминометан, (гидроксиметил)пропан-1,3-диол	2-амино-2-
UPLC	Ультраэффективная жидкостная хроматография	
VCD	Плотность жизнеспособных клеток	

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль, содержащий один или несколько белков II-2 формулы (I)

Ala – SEQ A – Cys* – SEQ B (I),

где

SEQ A имеет по меньшей мере 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO:1,

SEQ B имеет по меньшей мере 94% идентичности последовательности с SEQ ID NO:2,

Ala представляет собой остаток аланина, и

Cys* представляет собой остаток цистеина.

2. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1, где SEQ A выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 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 и SEQ ID NO:11.

3. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1 или 2, где SEQ A имеет последовательность SEQ ID NO:1.

4. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1 - 3, где SEQ B имеет последовательность SEQ ID NO:2.

5. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1 - 3, где SEQ B имеет последовательность SEQ ID NO:12.

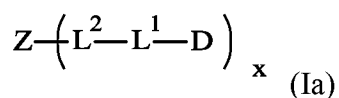
6. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1 - 5, где белок II-2 представляет собой несимметричный II-2.

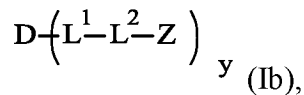
7. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1 - 3 и 5 - 6, где белок II-2 имеет последовательность SEQ ID NO:14.

8. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1 - 7, где белок II-2 содержит фрагмент M_{mod}, конъюгированный с цистеином, отмеченным звездочкой, в белке II-2 формулы (I).

9. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1 - 8, где конъюгат представляет собой несимметричный II-2.

10. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1 - 9, где конъюгат представляет собой конъюгат II-2 или его фармацевтически приемлемую соль формулы (Ia) или (Ib)





где

-D содержит белок IL-2 формулы (I),

-L¹- представляет собой линкерный фрагмент, ковалентно и обратимо присоединенный к -D,

-L²- представляет собой химическую связь или представляет собой спейсерный фрагмент,

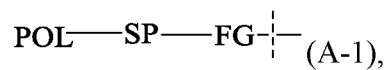
-Z представляет собой полимерный фрагмент или фрагмент замещенной жирной кислоты,

x представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16, и

y представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 2, 3, 4 и 5.

11. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 8 - 10, где M_{mod} представляет собой полимерный фрагмент.

12. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 8 - 11, где M_{mod} имеет формулу (A-1)



где

-FG- представляет собой связь,

-SP- представляет собой спейсерный фрагмент, и

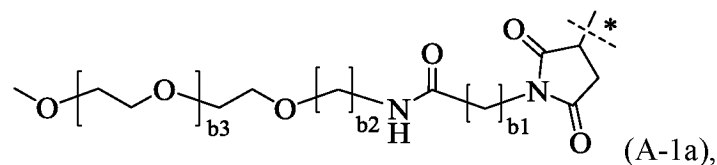
-POL представляет собой полимер.

13. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 8 - 12, где M_{mod} имеет молекулярную массу в интервале от 0.5 кДа до 1000 кДа.

14. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 8 - 13, где M_{mod} представляет собой полимер на основе ПЭГ.

15. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 8 - 14, где присоединение M_{mod} к белку IL-2 происходит через стабильную связь.

16. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 8 - 15, где M_{mod} имеет формулу (A-1a)



где

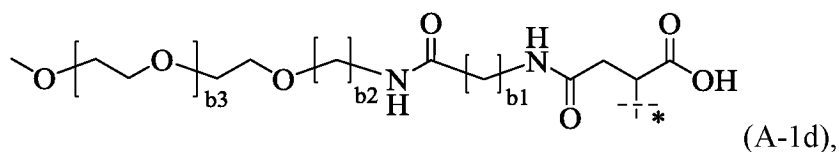
пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому серы цистеина, отмеченного звездочкой, в формуле (I),

b1 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20,

b2 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20, и

b3 представляет собой целое число в интервале от 12 до 22700.

17. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 8 - 15, где M_{mod} имеет формулу (A-1d)



где

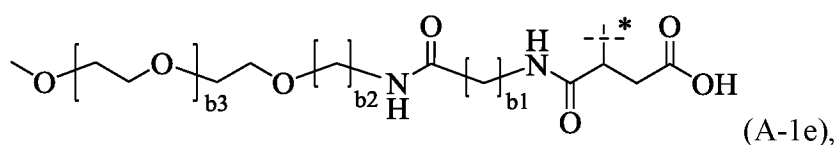
пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому серы цистеина, отмеченного звездочкой, в формуле (I),

b1 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20,

b2 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20, и

b3 представляет собой целое число в интервале от 12 до 22700.

18. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 8 - 15, где M_{mod} имеет формулу (A-1e)



где

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому серы цистеина, отмеченного звездочкой, в формуле (I),

b1 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20,

b2 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20, и

b3 представляет собой целое число в интервале от 12 до 22700.

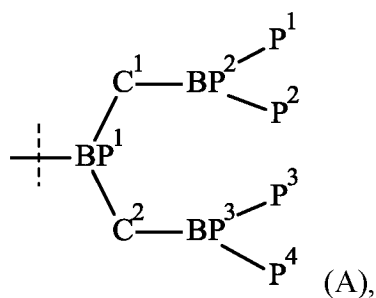
19. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 8 - 15, где во множестве конъюгатов M_{mod} содержит смесь формулы (A-1d) и формулы (A-1e).

20. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 10 - 19, где -Z представляет собой полимерный фрагмент.

21. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 10 - 20, где -Z представляет собой полимерный фрагмент, имеющий молекулярную массу в интервале от 1 кДа до 1000 кДа.

22. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 10 - 21, где -Z представляет собой полимерный фрагмент на основе ПЭГ.

23. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 10 - 22, где -Z содержит фрагмент формулы (A)



где

$-BP^1$, $-BP^2$, $-BP^3$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из $-N$ и $-C(R^8)$,

R^8 выбрано из группы, состоящей из H, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила и C_{2-6} алкинила,

$-P^1$, $-P^2$, $-P^3$, $-P^4$ независимо друг от друга представляют собой цепь на основе ПЭГ, содержащую по меньшей мере 40% ПЭГ и имеющую молекулярную массу в интервале от 3 до 40 кДа,

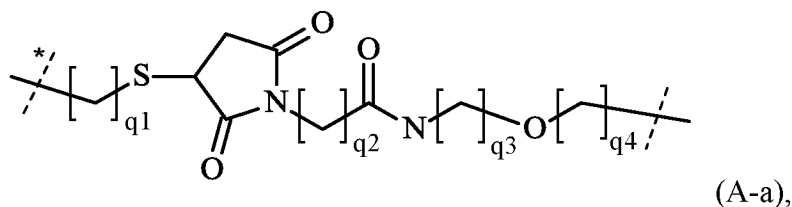
$-C^1$, $-C^2$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из C_{1-50} алкила, C_{2-50} алкенила и C_{2-50} алкинила, где C_{1-50} алкил, C_{2-50} алкенил и C_{2-50} алкинил необязательно замещены одним или несколькими $-R^9$, которые являются одинаковыми или различными, и где C_{1-50} алкил, C_{2-50} алкенил и C_{2-50} алкинил необязательно прерываются одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из $-T$, $-C(O)O$, $-O$, $-C(O)$, $-C(O)N(R^{10})$, $-S(O)_2N(R^{10})$, $-S(O)N(R^{10})$, $-S(O)_2$, $-S(O)$, $-N(R^{10})S(O)_2N(R^{10a})$, $-S$, $-N(R^{10})$, $-OC(OR^{10})(R^{10a})$, $-N(R^{10})C(O)N(R^{10a})$ и $-OC(O)N(R^{10})$,

каждый T независимо выбран из группы, состоящей из фенила, нафтила, инденила, инданила, тетралина, C_{3-10} циклоалкил, 3-10-ти членного гетероцикла, 8-11-ти членного гетеробипцикла, 8-30-ти членного карбополицикла и 8-30-ти членного гетерополицикла, где каждый T независимо необязательно замещен одним или несколькими $-R^9$, которые являются одинаковыми или различными,

каждый $-R^9$ независимо выбран из группы, состоящей из галогена, $-CN$, оксо ($=O$), $-COOR^{11}$, $-OR^{11}$, $-C(O)R^{11}$, $-C(O)N(R^{11}R^{11a})$, $-S(O)_2N(R^{11}R^{11a})$, $-S(O)N(R^{11}R^{11a})$, $-S(O)_2R^{11}$, $-S(O)R^{11}$, $-N(R^{11})S(O)_2N(R^{11a}R^{11b})$, $-SR^{11}$, $-N(R^{11}R^{11a})$, $-NO_2$, $-OC(O)R^{11}$, $-N(R^{11})C(O)R^{11a}$, $-N(R^{11})S(O)_2R^{11a}$, $-N(R^{11})S(O)R^{11a}$, $-N(R^{11})C(O)OR^{11a}$, $-N(R^{11})C(O)N(R^{11a}R^{11b})$, $-OC(O)N(R^{11}R^{11a})$ и C_{1-6} алкил, где C_{1-6} алкил независимо необязательно замещен одним или несколькими галогенами, которые являются одинаковыми или различными, и

каждый $-R^{10}$, $-R^{10a}$, $-R^{11}$, $-R^{11a}$ и $-R^{11b}$ независимо выбран из группы, состоящей из $-H$ и C_{1-6} алкил, где C_{1-6} алкил независимо необязательно замещен одним или несколькими галогенами, которые являются одинаковыми или различными.

24. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по п. 23, где C^1 и C^2 имеют формулу (A-a)



где

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к BP^1 ,

неотмеченная пунктирная линия показывает присоединение к BP^2 или BP^3 ,

соответственно,

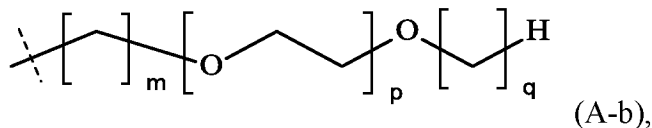
q_1 выбрано из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8,

q_2 выбрано из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, и 5,

q_3 выбрано из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8, и

q_4 выбрано из группы, состоящей из 1, 2 и 3.

25. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по п. 23 или 24, где P^1 , P^2 , P^3 и P^4 независимо друг от друга имеют формулу (A-b)



где

пунктирная линия показывает присоединение к остальной части $-Z$,

m представляет собой 0 или 1,

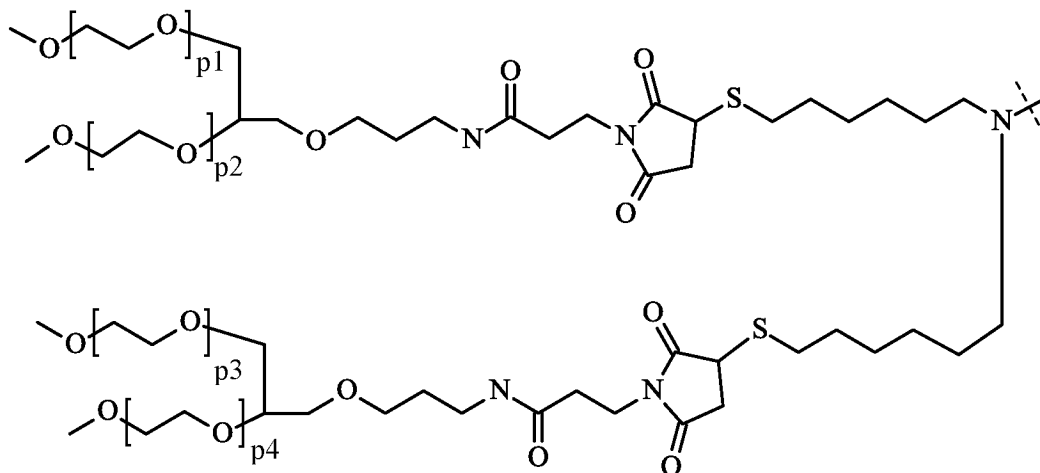
p представляет собой целое число в интервале от 70 до 900, и

q выбрано из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

26. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 23 - 25, где BP^1 представляет собой $-N<$.

27. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 23 - 26, где BP^2 и bP^2 оба представляют собой $-CH<$.

28. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 10 - 27, где $-Z$ содержит фрагмент формулы (A-c):

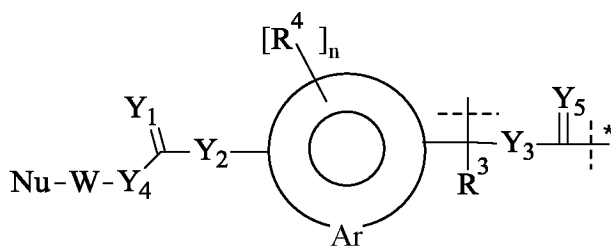


(A-c),

где

p_1 , p_2 , p_3 , p_4 независимо друг от друга представляют собой целое число в интервале от 70 до 900.

29. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 10 - 28, где $-L^1$ имеет формулу (IX-a):



(IX-a),

где

пунктирная линия, помеченная звездочкой, указывает присоединение к атому азота в $-D$, и непомеченная пунктирная линия указывает присоединение к $-L^2-Z$;

n представляет собой 0, 1, 2, 3, или 4;

$=Y_1$, выбран из группы, состоящей из $=O$ и $=S$;

$-Y_2$ - выбран из группы, состоящей из $-O$ -и $-S$ -;

$-Y_3$ - выбран из группы, состоящей из $-O$ -и $-S$ -;

$-Y_4$ - выбран из группы, состоящей из $-O$ -, $-NR^5$ -и $-C(R^6R^{6a})$ -;

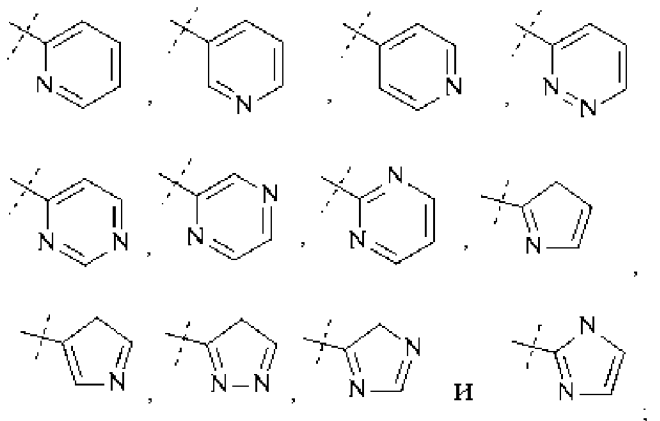
$=Y_5$ выбран из группы, состоящей из $=O$ и $=S$;

$-R^3$, $-R^5$, $-R^6$, $-R^{6a}$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из -H, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила, трет-бутила, н-пентила, 2-метилбутила, 2,2-диметилпропила, н-гексила, 2-метилпентила, 3-метилпентила, 2,2-диметилбутила, 2,3-диметилбутила и 3,3-диметилпропила;

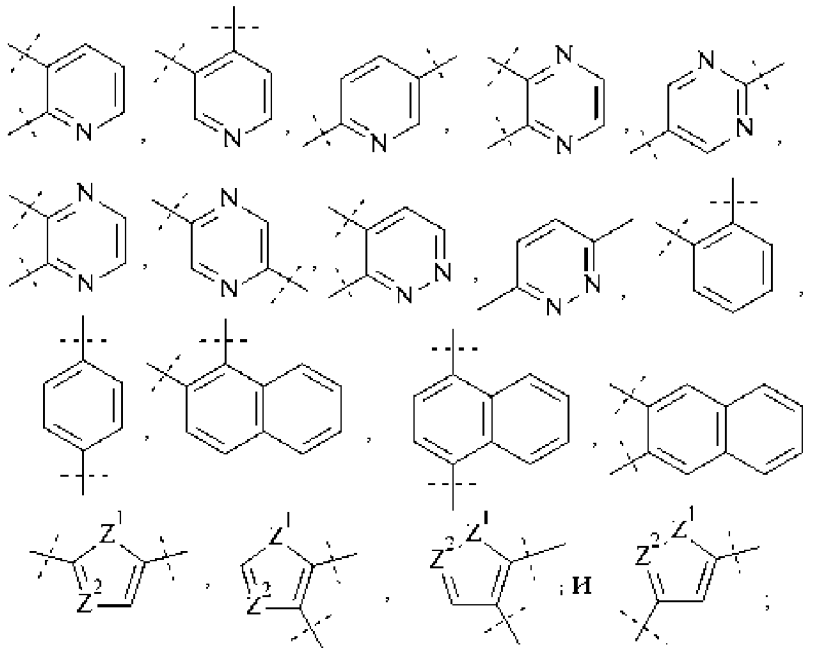
$-R^4$ выбран из группы, состоящей из метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила, трет-бутила, н-пентила, 2-метилбутила, 2,2-диметилпропила, н-гексила, 2-метилпентила, 3-метилпентила, 2,2-диметилбутила, 2,3-диметилбутила и 3,3-диметилпропила;

$-W$ - выбран из группы, состоящей из C_{1-20} алкила, необязательно прерывающимся одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из C_{3-10} циклоалкила, 8-30-ти членного карбополициклила, 3-10-ти членный гетероциклила, $-C(O)-$, $-C(O)N(R^7)-$, $-O-$, $-S-$ и $-N(R^7)-$;

$-Nu$ представляет собой нуклеофил, выбранный из группы, состоящей из $-N(R^7R^{7a})$, $-N(R^7OH)$, $-N(R^7)-N(R^{7a}R^{7b})$, $-S(R^7)$, $-COOH$,



$-Ar$ - выбран из группы, состоящей из



где

пунктирная линия указывает присоединение к оставшейся части $-L^1-$,

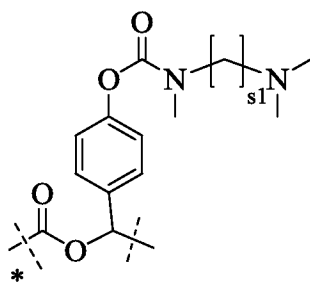
$-Z^1-$ выбран из группы, состоящей из $-O-$, $-S-$ и $-N(R^7)-$, и

$-Z^2-$ представляет собой $-N(R^7)-$; и

$-R^7$, $-R^{7a}$, $-R^{7b}$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из $-H$, C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила и C_{2-6} алкинила;

где $-L^1-$ необязательно дополнительно замещен.

30. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 10 - 29, где $-L^1-$ имеет формулу (IX-c)



(IX-c),

где

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к атому азота $-D$,

неотмеченная пунктирная линия показывает присоединение к $-L^2-Z$, и

s_1 представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

31. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по п. 30, где s_1 представляет собой 3.

32. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 10 - 31, где $-L^2$ - представляет собой спейсер.

33. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 10 - 32, где $-L^2$ - выбран из группы, состоящей из $-T$ -, $-C(O)O$ -, $-O$ -, $-C(O)$ -, $-C(O)N(R^{y1})$ -, $-S(O)_2N(R^{y1})$ -, $-S(O)N(R^{y1})$ -, $-S(O)_2$ -, $-S(O)$ -, $-N(R^{y1})S(O)_2N(R^{y1a})$ -, $-S$ -, $-N(R^{y1})$ -, $-OC(OR^{y1})(R^{y1a})$ -, $-N(R^{y1})C(O)N(R^{y1a})$ -, $-OC(O)N(R^{y1})$ -, C_{1-50} алкила, C_{2-50} алкенила и C_{2-50} алкинила, где $-T$ -, C_{1-50} алкил, C_{2-50} алкенил и C_{2-50} алкинил необязательно замещены одним или несколькими $-R^{y2}$, которые являются одинаковыми или различными, и где C_{1-50} алкил, C_{2-50} алкенил и C_{2-50} алкинил необязательно прерываются одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из $-T$ -, $-C(O)O$ -, $-O$ -, $-C(O)$ -, $-C(O)N(R^{y3})$ -, $-S(O)_2N(R^{y3})$ -, $-S(O)N(R^{y3})$ -, $-S(O)_2$ -, $-S(O)$ -, $-N(R^{y3})S(O)_2N(R^{y3a})$ -, $-S$ -, $-N(R^{y3})$ -, $-OC(OR^{y3})(R^{y3a})$ -, $-N(R^{y3})C(O)N(R^{y3a})$ - и $-OC(O)N(R^{y3})$ -,

$-R^{y1}$ и $-R^{y1a}$ независимо друг от друга выбраны из группы, состоящей из $-H$ -, $-T$ -, C_{1-50} алкила, C_{2-50} алкенила и C_{2-50} алкинила, где $-T$ -, C_{1-50} алкил, C_{2-50} алкенил и C_{2-50} алкинил необязательно замещены одним или несколькими $-R^{y2}$, которые являются одинаковыми или различными, и где C_{1-50} алкил, C_{2-50} алкенил и C_{2-50} алкинил необязательно прерываются одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из $-T$ -, $-C(O)O$ -, $-O$ -, $-C(O)$ -, $-C(O)N(R^{y4})$ -, $-S(O)_2N(R^{y4})$ -, $-S(O)N(R^{y4})$ -, $-S(O)_2$ -, $-S(O)$ -, $-N(R^{y4})S(O)_2N(R^{y4a})$ -, $-S$ -, $-N(R^{y4})$ -, $-OC(OR^{y4})(R^{y4a})$ -, $-N(R^{y4})C(O)N(R^{y4a})$ -, и $-OC(O)N(R^{y4})$ -,

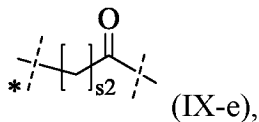
каждый T независимо выбран из группы, состоящей из фенила, нафтила, инденила, инданила, тетралина, C_{3-10} циклоалкила, 3-10-ти членного гетероцикла, 8-11-ти членного гетеробифенила, 8-30-ти членного карбополицикла и 8-30-ти членного гетерополицикла, где каждый T независимо необязательно замещен одним или несколькими $-R^{y2}$, которые являются одинаковыми или различными,

каждый $-R^{y2}$ независимо выбран из группы, состоящей из галогена, $-CN$, оксо ($=O$), $-COOR^{y5}$, $-OR^{y5}$, $-C(O)R^{y5}$, $-C(O)N(R^{y5}R^{y5a})$, $-S(O)_2N(R^{y5}R^{y5a})$, $-S(O)N(R^{y5}R^{y5a})$, $-S(O)_2R^{y5}$, $-S(O)R^{y5}$, $-N(R^{y5})S(O)_2N(R^{y5a}R^{y5b})$, $-SR^{y5}$, $-N(R^{y5}R^{y5a})$, $-NO_2$, $-OC(O)R^{y5}$, $-N(R^{y5})C(O)R^{y5a}$, $-N(R^{y5})S(O)_2R^{y5a}$, $-N(R^{y5})S(O)R^{y5a}$, $-N(R^{y5})C(O)OR^{y5a}$, $-N(R^{y5})C(O)N(R^{y5a}R^{y5b})$, $-OC(O)N(R^{y5}R^{y5a})$ и C_{1-6} алкила, где C_{1-6} алкил независимо замещен одним или несколькими галогенами, которые являются одинаковыми или различными, и

каждый $-R^{y3}$, $-R^{y3a}$, $-R^{y4}$, $-R^{y4a}$, $-R^{y5}$, $-R^{y5a}$ и $-R^{y5b}$ независимо выбран из группы, состоящей из $-H$ и C_{1-6} алкила, где C_{1-6} алкил независимо необязательно замещен одним или несколькими галогенами, которые являются одинаковыми или различными.

34. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 10 - 33, где $-L^2$ - представляет собой C_{1-20} алкильную цепь, которая необязательно прерывается одной или несколькими группами, независимо выбранными из $-O-$, $-T-$ и $-C(O)N(R^{y1})-$, и где C_{1-20} алкильная цепь необязательно замещен одной или несколькими группами, независимо выбранными из $-OH$, $-T$ и $-C(O)N(R^{y6}R^{y6a})$, где $-R^{y1}$, $-R^{y6}$, $-R^{y6a}$ независимо выбраны из группы, состоящей из H и C_{1-4} алкила, и где T выбрано из группы, состоящей из фенила, нафтила, инденила, инданила, тетралинила, C_{3-10} циклоалкила, 3-10-ти членного гетероциклила, 8-11-ти членного гетеробиициклила, 8-30-ти членного карбополициклила и 8-30-ти членного гетерополициклила.

35. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 10 - 34, где $-L^2$ - имеет формулу (IX-e)



где

пунктирная линия, отмеченная звездочкой, показывает присоединение к $-L^1$,

неотмеченная пунктирная линия показывает присоединение к $-Z$, и

$s2$ представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20.

36. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по п. 35, где $s2$ представляет собой 3.

37. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере один конъюгат или его фармацевтически приемлемую соль по любому из пп. 1 - 36 и по меньшей мере один эксципиент.

38. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1 - 36 или фармацевтическая композиция по п. 37 для применения в качестве лекарственного средства.

39. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1 - 36 или фармацевтическая композиция по п. 37 для применения в способе лечения рака.

40. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция для применения по п. 39, где рак выбран из группы, состоящей из саркомы, хордомы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака

поджелудочной железы, рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, плоскоклеточного рака, базальноклеточного рака, аденокарциномы, рака потовых желез, рака сальных желез, папиллярного рака, папиллярной аденокарциномы, цистаденокарциномы, медуллярного рака, бронхогенного рака, почечно-клеточного рака, гепатомы, рака желчных протоков, хориокарциномы, семиномы, эмбрионального рака, опухоли Вильмса, рака шейки матки, рака яичка, рака желудка, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака мочевого пузыря, почечно-клеточного рака, уротелиального рака, эпителиального рака, глиомы, астроцитомы, медуллобластомы, краниофарингиомы, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластомы, нейромы слухового нерва, олигодендроглиомы, менингиомы, меланомы, нейробластомы, ретинобластомы, неходжкинской лимфомы, кожной Т-клеточной лимфомы, острого миелоидного лейкоза и лейкозов.

41. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция для применения по п. 39 или 40, где конъюгат или его фармацевтически приемлемую соль или фармацевтическую композицию вводят пациенту до, одновременно с или после введения одного или нескольких дополнительных лекарственных средств.

42. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция для применения по п. 41, где одно или несколько дополнительных лекарственных средств выбрано из группы, состоящей из агонистов паттерн-распознающих рецепторов (PRRA), цитотоксических/химиотерапевтических средств, ингибиторов или антагонистов иммунных контрольных точек, агонистов иммунных контрольных точек, агонистов иммуноактивирующих рецепторов, мультиспецифических лекарственных средств, конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), конъюгатов антитело-адьювант (AAC), радионуклидов или таргетных радионуклидных терапевтических средств, ингибиторов репарации повреждений ДНК, ингибиторов метаболизма опухоли, агонистов паттерн-распознающих рецепторов, ингибиторов протеинкиназы, агонистов хемокиновых и хемоаттрактантных рецепторов, антагонистов хемокиновых и хемоаттрактантных рецепторов, агонистов цитокиновых рецепторов, агонистов рецепторов смерти, Антагонистов CD47 или SIRP α , онколитических лекарственных средств, белков-преобразователей сигналов, эпигенетических модификаторов, опухолевых пептидов или противоопухолевых вакцин, ингибиторов белков теплового шока (HSP), протеолитических ферментов, ингибиторов убиквитина и протеасом, антагонистов молекул адгезии, гормонов, включая гормональные пептиды и синтетические гормоны, и адоптивной клеточной терапии, такой как терапия инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL), терапия химерными антигенными

рецепторами (CAR), терапия Т-клетками, терапия естественными клетками-киллерами (NK), терапия CAR-T, терапия CAR-NK, терапия CAR- $\gamma\delta$, терапия CAR-макрофагами или любая другая клеточная терапия с использованием генетически модифицированного или генетически немодифицированного типа иммунных клеток.

43. Конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция для применения по п. 38 или 39, где конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция приводят к увеличению $\gamma\delta$ Т-клеток по меньшей мере 100-кратно по сравнению с исходным уровнем.