

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391735** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.23

(22) Дата подачи заявки
2022.03.31

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)

**(54) НОВЫЙ КОНЬЮГАТ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО АНАЛОГА
ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ**

(31) 10-2021-0042305

(32) 2021.03.31

(33) KR

(86) PCT/KR2022/004620

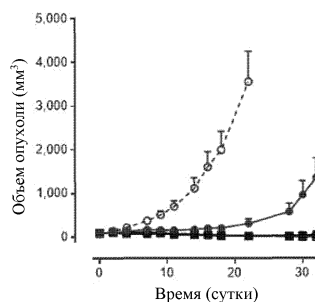
(87) WO 2022/211537 2022.10.06

(71) Заявитель:
ХАНМИ ФАРМ. КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Хо Ён Хо, О Ых Лим, Пак Да Хён,
Ким Джин Ён, Пак Чжун Соб, Ким Ю
Ён, Ли А Рам, Ким Сан Юн (KR)

(74) Представитель:
Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)

(57) Настоящее изобретение относится к конъюгату длительного действия аналога интерлейкина-2, в котором изменено сродство связывания с рецептором интерлейкина-2.



○ - отрицательный контроль (без обработки лекарственным средством)
● - алдеслейкин (3,0 мг/кг, внутривенно)
■ - конъюгат аналога интерлейкина-2 #21 (0,5 мг/кг, подкожно)
□ - конъюгат аналога интерлейкина-2 #41 (0,5 мг/кг, подкожно)
▲ - конъюгат аналога интерлейкина-2 #52 (0,5 мг/кг, подкожно)

A1

202391735

202391735

A1

PCT/KR2022/004620

МПК: *A61K 47/68* (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01) *C07K 14/55* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

НОВЫЙ КОНЬЮГАТ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО АНАЛОГА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к новому конъюгату аналога интерлейкина-2, способу его получения и его применению.

Предшествующий уровень техники

Интерлейкин-2 представляет собой важный иммуностимулятор с молекулярной массой примерно 15 кДа, состоящий в общей сложности из 133 аминокислотных остатков и активирующий различные клетки иммунной системы, включая Т-клетки и В-клетки. Высокую эффективность интерлейкина-2 в качестве иммуностимулятора можно использовать для лечения различных иммунозависимых состояний, включая рак и СПИД (публикация Корейской патентной заявки № 10-2017-0070091). В настоящее время интерлейкин-2 (торговая марка: Пролейкин) представляет собой одобренное FDA лекарственное средство для лечения метастатической почечно-клеточной карциномы и метастатической меланомы. Однако вследствие сильной токсичности, ассоциированной с лечением высокой дозой интерлейкина-2, число пациентов, к которым применимо это лечение, ограничено. Фактически это лечение применимо только к небольшому числу подходящих пациентов. Токсичность, ассоциированная с интерлейкином-2, включает сильную лихорадку, тошноту, рвоту, пропотевание жидкости из сосудов, сильную гипотензию, отек легких и синдром пропотевания жидкости из сосудов, вызывающий повреждение печени.

Рецептор интерлейкина-2 имеет три типа рецепторных субъединиц. Субъединица состоит из альфа-цепи (IL-2R α , CD25), бета-цепи (IL-2R β или CD122) и гамма-цепи (IL-2R γ или CD132). Интерлейкин-2 может проявлять различные функции путем связывания с рецепторными субъединицами в различных комбинациях. Одиночный рецептор интерлейкина-2 альфа называют рецептором с низким сродством к интерлейкину-2, и он не вовлечен в передачу сигнала. Комплекс рецепторов интерлейкина-2 бета и гамма связывается с интерлейкином-2 с промежуточным сродством. Комплекс рецепторов интерлейкина-2 альфа, бета и гамма связывается с интерлейкином-2 с высоким сродством. Комплекс рецепторов интерлейкина-2 бета и гамма необходим для

эффективного преобразования сигнала через активацию киназ в множестве сигнальных путей. В частности, рецепторы бета и гамма, связывающие интерлейкин-2, играют большую роль в клетках $CD8^+$ и естественных клетках-киллерах (NK). Кроме того, комплексы рецепторов интерлейкина-2 альфа, бета и гамма с высоким сродством обычно обнаруживают в $CD4^+$ Т-регуляторных клетках (Treg), и также недавно они были обнаружены в активированных Т-клетках. Поскольку рецепторы интерлейкина-2 бета распространены в $CD8^+$ Т-клетках или естественных клетках-киллерах (клетках NK) и вовлечены в иммунный ответ организма, были проведены исследования по разработке терапевтических агентов путем повышения активности рецепторов бета в отношении иммунной активации.

Между тем, несмотря на потенциал интерлейкина-2 в качестве терапевтического агента при различных иммунозависимых состояниях, все еще имеется не так много лекарственных средств, дозы которых можно снижать, при этом уменьшая токсичность и побочные эффекты, и, следовательно, существует возрастающая потребность в исследованиях новых и улучшенных лекарственных средств.

Описание изобретения

Техническая задача

В рамках разработки терапевтического средства для лечения иммунозависимых заболеваний, требуется разработать лекарственное средство, содержащее аналог интерлейкина-2 и обладающее отличной устойчивостью и фармакологическим действием.

Техническое решение

Задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить конъюгат длительного действия, содержащий аналог интерлейкина-2.

Другая задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить способ получения конъюгата длительного действия.

Еще одна задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить фармацевтическую композицию для предупреждения или лечения рака, содержащую аналог интерлейкина-2 или его конъюгат длительного действия.

Еще одна задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить способ предупреждения или лечения рака, включающий введение аналога интерлейкина-2, его конъюгата длительного действия или композиции, содержащей его, субъекту, нуждающемуся в этом.

Еще одна задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить применение аналога интерлейкина-2, его конъюгата длительного действия или композиции, содержащей его, для предупреждения или лечения рака.

Еще одна задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить применение для получения лекарственного средства, содержащего аналог интерлейкина-2, или его конъюгат длительного действия, или композицию, содержащую его, для предупреждения или лечения рака.

Полезные эффекты

Аналог интерлейкина-2 или конъюгат длительного действия, содержащий его, представляет собой аналог, обладающий повышенным сродством связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета *in vivo* и оказывающий действие по повышению удобства введения и уменьшению побочных эффектов для целей противоопухолевой терапии.

Краткое описание графических материалов

На Фиг. 1 представлен результат электрофореза конъюгата аналогов интерлейкина-2 (аналоги #21, #41 и #52) длительного действия в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (ДСН-ПААГ).

На Фиг. 2 представлен результат анализа чистоты конъюгата аналогов интерлейкина-2 (аналоги #21, #41 и #52) длительного действия.

На Фиг. 3 показаны результаты анализа фармакокинетики конъюгата аналогов интерлейкина-2 длительного действия у мышей ICR и C57BL/6. График А представляет собой результаты анализа фармакокинетики конъюгата аналога интерлейкина-2 #41 и конъюгата аналога интерлейкина-2 #52 на мышах ICR, график Б представляет собой результаты анализа фармакокинетики конъюгата аналога интерлейкина-2 #21, конъюгата аналога интерлейкина-2 #86, конъюгата аналога интерлейкина-2 #104 и конъюгата аналога интерлейкина-2 #105 на мышах C57BL/6. На Фиг. 3 доза и концентрация конъюгата длительного действия в сыворотке приведены только исходя из массы, приходящейся на участок аналога интерлейкина-2 во всем конъюгате.

На Фиг. 4 показаны результаты, подтверждающие противоопухолевый эффект в животной модели конъюгата аналога интерлейкина-2 #21, конъюгата аналога интерлейкина-2 #41 и конъюгата аналога интерлейкина-2 #52 на мышах. На Фиг. 4 доза конъюгата длительного действия является величиной, выраженной исходя только из массы, приходящейся на участок аналога интерлейкина-2 во всем конъюгате.

На Фиг. 5 представлен результат, подтверждающий изменение Т-клеток памяти в животной модели конъюгата аналога интерлейкина-2 длительного действия. На графике А показано ингибирующее рост опухоли действие конъюгата аналога интерлейкина-2 #21, конъюгата аналога интерлейкина-2 #41 и конъюгата аналога интерлейкина-2 #52, а график Б представляет собой результат анализа количества Т-клеток памяти конъюгата аналога интерлейкина-2 #21, конъюгата аналога интерлейкина-2 #41 и конъюгата аналога интерлейкина-2 #52. На Фиг. 5 доза конъюгата длительного действия является величиной, выраженной исходя только из массы, приходящейся на участок аналога интерлейкина-2 во всем конъюгате.

На Фиг. 6 представлен результат оценки противоопухолевой эффективности конъюгата аналогов интерлейкина-2 длительного действия в животной модели злокачественной меланомы. На графике А показан размер опухоли при обработке алдеслейкином и конъюгатом аналога интерлейкина-2 #86, а график Б представляет собой результат подтверждения выживаемости при обработке алдеслейкином и конъюгатом аналога интерлейкина-2 #86. На Фиг. 6 доза конъюгата длительного действия является величиной, выраженной исходя только из массы, приходящейся на участок аналога интерлейкина-2 во всем конъюгате.

Наилучший способ осуществления изобретения

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен новый аналог интерлейкина-2 (или аналог IL-2). Аналог интерлейкина-2 представляет собой аналог интерлейкина-2, обладающий повышенным сродством связывания с рецептором интерлейкина-2 бета по сравнению с природным интерлейкином-2 или алдеслейкином (то есть аналогом интерлейкина-2). Аналог интерлейкина-2 может включать последовательность, в которой модифицирована одна или более чем одна аминокислота природного интерлейкина-2.

В одном конкретном воплощении конъюгат длительного действия характеризуется тем, что представляет собой конъюгат длительного действия химической формулы 1, представленной ниже:

Химическая формула 1



где X представляет собой аналог интерлейкина-2, который, когда X не входит в состав конъюгата длительного действия и присутствует отдельно, представляет собой

аналог интерлейкина-2, обладающий повышенным сродством связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета по сравнению с алдеслейкином;

L представляет собой полиэтиленгликолевый линкер;

a представляет собой 0 или натуральное число, при условии что, когда a равен 2 или более, тогда каждый L независим от другого;

F представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина в форме димера; и

- указывает на наличие ковалентной связи между X и L и между L и F;

где аналог интерлейкина-2 включает последовательность, в которой одна или более чем одна аминокислота, соответствующая аминокислоте в положениях 1, 12, 18, 19, 20, 22, 32, 35, 38, 42, 43, 45, 48, 49, 61, 68, 69, 74, 76, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 96, 125, 126 и 133 в природном интерлейкине-2, модифицирована.

В другом конкретном воплощении конъюгат длительного действия содержит аналог интерлейкина-2, в котором одна или более чем одна аминокислота природного интерлейкина-2 подвергнута мутации посредством одного из способов, выбранных из группы, состоящей из замены, вставки, делеции, модификации и их комбинаций.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что он имеет измененное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 альфа по сравнению с природным интерлейкином-2 или алдеслейкином и включает аналог интерлейкина-2, обладающий повышенным сродством связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета в составе конъюгата.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что он содержит аналог интерлейкина-2, в котором одна или более чем одна аминокислота добавлена к аминокислоте, соответствующей положению 133, в составе конъюгата.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что он содержит аналог интерлейкина-2 в составе конъюгата, в котором аминокислота в положении 1 удалена, и аминокислота в положении 125 заменена на другую аминокислоту по сравнению с природным интерлейкином-2.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что он содержит аналог интерлейкина-2, дополнительно содержащий от 1 до 10 аминокислотных замен в составе конъюгата.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что он содержит аналог интерлейкина-2 в составе конъюгата, в котором одна или более чем одна аминокислота в положениях 18, 19, 20, 22, 38, 42, 43, 45, 61, 68, 69, 74, 80, 81, 84, 85, 86, 88, 89, 91, 92, 94 и 96 дополнительно заменена на другую аминокислоту.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что он содержит аналог интерлейкина-2 в составе конъюгата, в котором одна или более чем одна аминокислота в положениях 18, 22, 38, 42, 61, 68, 80, 81, 85, 86 и 92 дополнительно заменена на другую аминокислоту.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений содержит любой из следующих аналогов в качестве аналога интерлейкина-2:

(а) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 32 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(b) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 35 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(с) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 38 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(d) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 42 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(е) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 43 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(f) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 48 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(g) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 49 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(h) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 76 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(i) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 81, 92, 94 и 96 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(j) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 87 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(k) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38 и 42 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(l) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38 и 80 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(m) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38 и 84 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(n) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 19, 38 и 42 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(o) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 12, 38 и 42 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(p) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42 и 61 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(q) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42 и 84 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(r) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42 и 88 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(s) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42 и 89 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(t) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42 и 91 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(u) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42 и 94 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(v) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42 и 126 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(w) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 80 и 84 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(x) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 94 и 96 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(y) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(z) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 61, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(aa) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ab) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 80, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ac) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 81, 84 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ad) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 20, 38, 42, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ae) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(af) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 74, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ag) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 81, 84 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ah) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 81, 88 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ai) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 85, 86, и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(aj) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 80, 81, 85 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ak) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 80, 81, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(al) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(am) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 45, 74, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(an) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 74, 80, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ao) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81, 84 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ap) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 45, 80, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(aq) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ar) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 42, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(as) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 61, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(at) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 69, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(au) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 85, 86, 91 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(av) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(aw) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ax) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 45, 74, 80, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ay) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 68, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(az) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 69, 74, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ba) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 84, 85, 86, 91 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bb) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 85, 86, 92, 94 и 96 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bc) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 19, 22, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bd) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 38, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(be) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 61, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bf) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 68, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bg) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 35, 38, 42, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bh) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 45, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bi) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81, 85, 86, 91 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bj) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81, 85, 86, 92 и 95 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bk) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 35, 38, 42, 74, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bl) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 43, 61, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bm) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81, 85, 86, 91, 92 и 95 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bn) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 35, 38, 42, 74, 80, 81, 82, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bo) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2; and

(br) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 85 и 86 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что он содержит аналог интерлейкина-2, включающий любую одну или более чем одну замену, выбранную из группы, состоящей из следующих аминокислотных замен:

(a) замена, при которой аминокислота в положении 12 заменена на валин или фенилаланин;

(b) замена, при которой аминокислота в положении 18 заменена на аргинин;

(c) замена, при которой аминокислота в положении 19 заменена на тирозин, валин, фенилаланин или аргинин;

(d) замена, при которой аминокислота в положении 20 заменена на валин или фенилаланин;

(e) замена, при которой аминокислота в положении 22 заменена на глутаминовую кислоту;

(f) замена, при которой аминокислота в положении 32 заменена на цистеин;

(g) замена, при которой аминокислота в положении 35 заменена на цистеин или глутаминовую кислоту;

(h) замена, при которой аминокислота в положении 38 заменена на аланин или аспарагиновую кислоту;

(i) замена, при которой аминокислота в положении 42 заменена на лизин, аланин или триптофан;

(j) замена, при которой аминокислота в положении 43 заменена на цистеин, глутаминовую кислоту или глутамин;

(k) замена, при которой аминокислота в положении 45 заменена на аланин;

(l) замена, при которой аминокислота в положении 48 заменена на цистеин;

(m) замена, при которой аминокислота в положении 49 заменена на цистеин;

(n) замена, при которой аминокислота в положении 61 заменена на глутамин, аргинин или аспарагиновую кислоту;

(o) замена, при которой аминокислота в положении 68 заменена на аспарагиновую кислоту или глутамин;

(p) замена, при которой аминокислота в положении 69 заменена на глицин;

(q) замена, при которой аминокислота в положении 74 заменена на гистидин или аланин;

(r) замена, при которой аминокислота в положении 76 заменена на цистеин;

(s) замена, при которой аминокислота в положении 80 заменена на фенилаланин, тирозин, валин, аспарагиновую кислоту или триптофан;

(t) замена, при которой аминокислота в положении 81 заменена на аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или аспарагин;

(u) замена, при которой аминокислота в положении 82 заменена на глицин или валин;

(v) замена, при которой аминокислота в положении 84 заменена на глутаминовую кислоту, валин или фенилаланин;

(w) замена, при которой аминокислота в положении 85 заменена на валин, аланин, глицин, триптофан, тирозин, треонин, изолейцин, глутаминовую кислоту или фенилаланин;

(x) замена, при которой аминокислота в положении 86 заменена на валин, аланин, глицин или лейцин;

(y) замена, при которой аминокислота в положении 87 заменена на цистеин;

(z) замена, при которой аминокислота в положении 88 заменена на глутамин, валин, или фенилаланин;

(aa) замена, при которой аминокислота в положении 89 заменена на фенилаланин;

(ab) замена, при которой аминокислота в положении 91 заменена на треонин, фенилаланин или глутаминовую кислоту;

(ac) замена, при которой аминокислота в положении 92 заменена на фенилаланин, лейцин, тирозин или триптофан;

(ad) замена, при которой аминокислота в положении 94 заменена на фенилаланин или валин;

(ae) замена, при которой аминокислота в положении 95 заменена на аспарагиновую кислоту;

(af) замена, при которой аминокислота в положении 96 заменена на фенилаланин, валин или изолейцин;

(ag) замена, при которой аминокислота в положении 125 заменена на серин; и

(ah) замена, при которой аминокислота в положении 126 заменена на треонин.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что он содержит аналог интерлейкина-2, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-106.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что он содержит аналог интерлейкина-2, выбранный из любого из следующих аналогов:

(a) аналог интерлейкина-2, где аналог интерлейкина-2 представляет собой природный интерлейкин-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты;

(b) аналог интерлейкина-2, где аналог интерлейкина-2 представляет собой природный интерлейкин-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты;

(c) аналог интерлейкина-2, где аналог интерлейкина-2 представляет собой природный интерлейкин-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты;

(d) аналог интерлейкина-2, где аналог интерлейкина-2 представляет собой природный интерлейкин-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты;

(е) аналог интерлейкина-2, где аналог интерлейкина-2 представляет собой природный интерлейкин-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 61, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты; и

(f) аналог интерлейкина-2, где аналог интерлейкина-2 представляет собой природный интерлейкин-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 68, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что он содержит аналог интерлейкина-2, включающий любую одну или более чем одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из следующих аминокислотных замен:

- (a) замена, при которой аминокислота в положении 18 заменена на аргинин;
 - (b) замена, при которой аминокислота в положении 22 заменена на глутаминовую кислоту;
 - (c) замена, при которой аминокислота в положении 38 заменена на аланин;
 - (d) замена, при которой аминокислота в положении 42 заменена на лизин;
 - (e) замена, при которой аминокислота в положении 61 заменена на аспарагиновую кислоту;
 - (f) замена, при которой аминокислота в положении 68 заменена на аспарагиновую кислоту;
 - (g) замена, при которой аминокислота в положении 80 заменена на фенилаланин;
 - (h) замена, при которой аминокислота в положении 81 заменена на глутаминовую кислоту;
 - (i) замена, при которой аминокислота в положении 85 заменена на валин;
 - (j) замена, при которой аминокислота в положении 86 заменена на валин;
 - (k) замена, при которой аминокислота в положении 92 заменена на фенилаланин;
- и
- (l) замена, при которой аминокислота в положении 125 заменена на серин.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что он содержит Fc-фрагмент иммуноглобулина, который получен из IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, или их комбинации, или их гибрида.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что содержит Fc-фрагмент IgG4.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что содержит Fc-фрагмент иммуноглобулина, который не гликозилирован.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих воплощений характеризуется тем, что Fc-фрагмент иммуноглобулина получен из негликозилированного Fc-фрагмента человеческого IgG4.

В конъюгате длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений Fc-фрагмент иммуноглобулина имеет структуру, в которой две полипептидные цепи соединены дисульфидной связью, и присоединен только через атом азота в одной из двух цепей.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что Fc-фрагмент иммуноглобулина включает мономер, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 438.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что Fc-фрагмент иммуноглобулина представляет собой гомодимер из мономеров аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 438.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что Fc-фрагмент иммуноглобулина присоединен через атом азота N-концевого пролина.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что L содержит повторяющиеся звенья этиленгликоля, причем молекулярная масса группировки из повторяющихся звеньев этиленгликоля находится в диапазоне от 1 кДа до 100 кДа.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что одна молекула X ковалентно связана с одним из Fc-фрагментов димерного Fc-фрагмента иммуноглобулина посредством полиэтиленгликолевого линкера.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что повторяющееся звено этиленгликоля имеет формулу $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$, где n представляет собой натуральное число, а средняя молекулярная масса фрагмента $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ в конъюгате аналога интерлейкина-2, например среднечисловая молекулярная масса, как определено, составляет от 1 кДа до 100 кДа.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что значение n определяют таким образом, что средняя молекулярная масса фрагмента $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ в конъюгате аналога интерлейкина-2, например среднечисловая молекулярная масса, составляет 3,4 кДа.

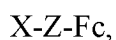
Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что a равен 1, и одна молекула X ковалентно связана с одной из цепей димерного Fc-фрагмента иммуноглобулина через линкер, содержащий повторяющиеся звенья этиленгликоля.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что один конец линкера связан только с одной из двух цепей димерного Fc-фрагмента иммуноглобулина.

Как конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений, конъюгат характеризуется тем, что один конец L связан с F , а другой конец L связан с X посредством ковалентной связи, образованной в результате взаимодействия с амино- или тиоловой группой F и с амино- или тиоловой группой X , соответственно.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен конъюгат аналога интерлейкина-2 длительного действия химической формулы 2, представленной ниже:

Химическая формула 2



где X представляет собой аналог интерлейкина-2, содержащий любую из полипептидных последовательностей, выбранных из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3-106;

Z представляет собой полиэтиленгликолевый линкер с молекулярной массой от 2 кДа до 30 кДа;

Fc представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина в форме димера; и

- указывает на наличие ковалентной связи между X и Z и между Z и Fc;

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

где конъюгат длительного действия представляет собой конъюгат длительного действия, в котором один конец Z ковалентно связан только с одной полипептидной цепью в димерном Fc-фрагменте, а одна молекула X ковалентно связана с противоположным концом Z.

В конкретном воплощении аналог интерлейкина-2 характеризуется тем, что он содержит любую из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 56, 58, 59, 60, 62, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 85, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 101, 103, 104, 105 и 106.

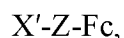
В другом конкретном воплощении аналог интерлейкина-2 характеризуется тем, что он содержит любую из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 13, 14, 16, 17, 20, 21, 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 98, 99, 100, 101, 103, 104 и 105.

Конъюгат длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что он содержит аналог интерлейкина-2, содержащий любую из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 42, 53, 87, 105 и 106.

Аналог интерлейкина-2 в конъюгате длительного действия согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что он дополнительно содержит одну или более чем одну аминокислоту на C-конце.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен конъюгат аналога интерлейкина-2 длительного действия химической формулы 3, представленной ниже:

Химическая формула 3



где X' представляет собой аналог интерлейкина-2, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1, представленной ниже:

Общая формула 1

X1-P-T-S-S-S-T-K-K-T-Q-L-Q-L-E-H-L-X18-X19-D-L-X22-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-X38-M-L-T-X42-X43-F-X45-M-P-K-K-A-T-E-L-K-H-L-Q-C-L-E-X61-E-L-K-P-L-E-X68-V-L-N-L-A-X74-S-K-N-F-H-X80-X81-P-R-X84-X85-X86-S-N-I-N-X91-X92-V-X94-E-X96-K-G-S-E-T-T-F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-S-Q-S-I-I-S-T-L-T (общая формула 1, SEQ ID NO: 212),

где в общей формуле 1 выше:

X1 представляет собой делецию;

X18 представляет собой лейцин (L) или аргинин (R);

X19 представляет собой лейцин (L) или тирозин (Y);

X22 представляет собой глутаминовую кислоту (E) или глутамин (Q);

X38 представляет собой аланин (A), аспарагиновую кислоту (D) или аргинин (R);

X42 представляет собой аланин (A), фенилаланин (F), лизин (K) или триптофан (W);

X43 представляет собой глутаминовую кислоту (E), лизин (K) или глутамин (Q);

X45 представляет собой аланин (A) или тирозин (Y);

X61 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), глутамин (Q) или аргинин (R);

X68 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X74 представляет собой гистидин (H) или глутамин (Q);

X80 представляет собой фенилаланин (F), лейцин (L), валин (V) или тирозин (Y);

X81 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E) или аргинин (R);

X84 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X85 представляет собой аланин (A), глутаминовую кислоту (E), глицин (G), лейцин (L), валин (V), триптофан (W) или тирозин (Y);

X86 представляет собой аланин (A), глицин (G), изолейцин (I) или валин (V);

X91 представляет собой треонин (T) или валин (V);

X92 представляет собой фенилаланин (F), изолейцин (I) или тирозин (Y);

X94 представляет собой фенилаланин (F) или лейцин (L);

X96 представляет собой фенилаланин (F) или лейцин (L);

Z представляет собой полиэтиленгликолевый линкер с молекулярной массой от 2 кДа до 30 кДа;

Fc представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина в форме димера; и

- указывает на наличие ковалентной связи между X' и Z и между Z и Fc;

где конъюгат длительного действия представляет собой конъюгат длительного действия, в котором один конец Z ковалентно связан только с одной полипептидной

цепью в димерном Fc-фрагменте, а одна молекула X' ковалентно связана с противоположным концом Z.

В конкретном воплощении в общей формуле 1, представленной выше,

X43 представляет собой лизин (K);

X45 представляет собой тирозин (Y);

X61 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E) или глутамин (Q);

X68 представляет собой глутаминовую кислоту (E);

X74 представляет собой глутамин (Q);

X80 представляет собой фенилаланин (F) или лейцин (L);

X85 представляет собой лейцин (L), валин (V) или тирозин (Y);

X86 представляет собой изолейцин (I) или валин (V); и

X92 представляет собой фенилаланин (F) или изолейцин (I).

В другом воплощении аналог интерлейкина-2 дополнительно содержит одну или более чем одну аминокислоту на C-конце.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен конъюгат аналога интерлейкина-2 длительного действия химической формулы 4, представленной ниже:

Химическая формула 4

$$X''\text{-Z-Fc},$$

где X'' представляет собой аналог интерлейкина-2, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 2, представленной ниже:

Общая формула 2

X1-P-T-S-S-S-T-K-K-T-Q-L-Q-L-E-H-L-X18-L-D-L-X22-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-X38-M-L-T-X42-K-F-Y-M-P-K-K-A-T-E-L-K-H-L-Q-C-L-E-X61-E-L-K-P-L-E-X68-V-L-N-L-A-Q-S-K-N-F-H-F-X81-P-R-D-X85-X86-S-N-I-N-V-F-V-L-E-L-K-G-S-E-T-T-F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-S-Q-S-I-I-S-T-L-T (общая формула 2, SEQ ID NO: 213)

X1 представляет собой делецию;

X18 представляет собой лейцин (L) или аргинин (R);

X22 представляет собой глутаминовую кислоту (E) или глутамин (Q);

X38 представляет собой аланин (A) или аргинин (R);

X42 представляет собой фенилаланин (F) или лизин (K);

X61 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X68 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X81 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X85 представляет собой лейцин (L) или валин (V);

X86 представляет собой изолейцин (I) или валин (V);

Z представляет собой полиэтиленгликолевый линкер с молекулярной массой от 2 кДа до 30 кДа;

Fc представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина в форме димера; и

- указывает на наличие ковалентной связи между X" и Z и между Z и Fc;

где конъюгат длительного действия представляет собой конъюгат длительного действия, в котором один конец Z ковалентно связан только с одной полипептидной цепью в димерном Fc-фрагменте, а одна молекула X" ковалентно связана с противоположным концом Z.

В конкретном воплощении аналог интерлейкина-2 характеризуется тем, что он содержит любую из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 42, 53, 87, 105 и 106.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ получения конъюгата длительного действия, содержащего аналог интерлейкина-2, включающий: связывание аналога интерлейкина-2 с Fc-фрагментом иммуноглобулина через непептидный полимер.

В конкретном воплощении аналог интерлейкина-2 характеризуется тем, что одна или более чем одна аминокислота, выбранная из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 1, 12, 18, 19, 20, 22, 32, 35, 38, 42, 43, 45, 48, 49, 61, 68, 69, 74, 76, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 96, 125, 126 и 133 в природном интерлейкине-2, модифицирована.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения рака, содержащая аналог интерлейкина-2 или его конъюгат длительного действия.

В конкретном воплощении фармацевтическая композиция характеризуется тем, что она содержит фармацевтически эффективное количество конъюгата аналога интерлейкина-2 длительного действия и фармацевтически приемлемый эксципиент.

В другом конкретном воплощении аналог интерлейкина-2 фармацевтической композиции характеризуется тем, что он содержит последовательность, в которой одна или более чем одна аминокислота, соответствующая положениям 1, 12, 18, 19, 20, 22, 32, 35, 38, 42, 43, 45, 48, 49, 61, 68, 69, 74, 76, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 96, 125, 126 и 133 в природном интерлейкине-2, модифицирована.

Фармацевтическая композиция согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что она содержит аналог интерлейкина-2, имеющий повышенное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета по сравнению с алдеслейкином.

Фармацевтическая композиция согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что аналог интерлейкина-2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-106.

Фармацевтическая композиция согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что аналог интерлейкина-2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 42, 53, 87, 105 и 106.

Фармацевтическая композиция согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что конъюгат длительного действия представлен химической формулой 1, представленной ниже:

Химическая формула 1



где X представляет собой аналог интерлейкина-2, обладающий повышенным сродством связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета по сравнению с алдеслейкином;

L представляет собой полиэтиленгликолевый линкер;

a представляет собой 0 или натуральное число, при условии что, когда a равен 2 или более, тогда каждый L независим от другого;

F представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина в форме димера; и

- указывает на наличие ковалентной связи между X и L и между L и F.

Фармацевтическая композиция согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что рак представляет собой любое заболевание,

выбранное из группы, состоящей из метастатического почечно-клеточного рака, метастатической меланомы, колоректального рака, рака печени, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака почек, колоректального рака, рака легких, рака кожи, меланомы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря и рака желудка.

Фармацевтическая композиция согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что композиция демонстрирует высокую экспозицию в крови, ингибирование роста опухоли и/или ответ Т-клеток памяти по сравнению с алдеслейкином.

Фармацевтическая композиция согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что фармацевтическую композицию вводят посредством внутрибрюшинного, внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутрикожного, перорального, местного, интраназального, внутрилегочного или ректального пути.

Фармацевтическая композиция согласно любому из предыдущих конкретных воплощений характеризуется тем, что фармацевтическую композицию вводят с интервалом от 1 недели до 1 месяца.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения рака, включающий: введение аналога интерлейкина-2, его конъюгата длительного действия или композиции, содержащей его, индивидууму, нуждающемуся в этом.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено применение аналога интерлейкина-2, его конъюгата длительного действия или композиции, содержащей его, для предупреждения или лечения рака.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено применение для получения лекарственного средства, содержащего аналог интерлейкина-2, или его конъюгат длительного действия, или композицию, содержащую его, для предупреждения или лечения рака.

Способ осуществления изобретения

Далее описаны подробности осуществления настоящего изобретения. При этом, соответствующие описания и воплощения, раскрытые в настоящем изобретении, можно также применять в отношении других описаний и воплощений. То есть, все комбинации различных элементов, раскрытых в настоящем изобретении, входят в объем настоящего

изобретения. Кроме того, объем настоящего изобретения не может рассматриваться как ограниченный конкретным описанием, приведенным ниже. Кроме того, в данном описании цитируются и приводятся ссылки на ряд публикаций и патентных документов. Раскрытие цитируемых публикаций и патентных документов включено здесь посредством ссылки во всей своей полноте для дополнительного разъяснения уровня и объема предмета, к которому относится настоящее изобретение.

Во всем описании настоящего изобретения используют принятые однобуквенные и трехбуквенные обозначения аминокислот. Дополнительно, упомянутые здесь аминокислоты обозначают аббревиатурами согласно правилам номенклатуры IUPAC-IUB следующим образом:

аланин	A	аргинин	R
аспарагин	N	аспарагиновая кислота	D
цистеин	C	глутаминовая кислота	E
глутамин	Q	глицин	G
гистидин	H	изолейцин	I
лейцин	L	лизин	K
метионин	M	фенилаланин	F
пролин	P	серин	S
треонин	T	триптофан	W
тирозин	Y	валин	V

Использованный здесь термин «Aib» может быть использован в качестве синонима термина «2-аминоизомасляная кислота» или «аминоизомасляная кислота», а 2-аминоизомасляная кислота и аминокислоты могут быть использованы как взаимозаменяемые понятия.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен конъюгат длительного действия, содержащий аналог интерлейкина-2.

В частности, конъюгат длительного действия может быть представлен химической формулой 1, приведенной ниже:

Химическая формула 1



где X представляет собой аналог интерлейкина-2, обладающий повышенным сродством связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета по сравнению с алдеслейкином;

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

L представляет собой полиэтиленгликолевый линкер;

a представляет собой 0 или натуральное число, при условии что, когда a равен 2 или более, тогда каждый L независим от другого;

F представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина в форме димера; и

- указывает на наличие ковалентной связи между X и L и между L и F.

Аналог интерлейкина-2 в конъюгате длительного действия по настоящему изобретению характеризуется тем, что его сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 изменяется, когда он присутствует отдельно, не входя в состав конъюгата, и, в частности, тем, что он имеет повышенное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета. В частности, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может представлять собой аналог, который имеет повышенное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета по сравнению с природным интерлейкином-2 или известным алдеслейкином, когда он присутствует отдельно, не входя в состав конъюгата, и, более конкретно, который также имеет измененное (повышенное или пониженное) сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 альфа, и может включать последовательность, в которой модифицирована одна или более чем одна аминокислота природного интерлейкина-2.

Использованный здесь термин «интерлейкин-2 (IL-2)» относится к типу цитокина, который передает сигналы в иммунной системе *in vivo*. Интерлейкин-2 известен главным образом как важный иммуностимулятор размером приблизительно 15 кДа.

Использованный здесь термин «аналог интерлейкина-2» относится к природному интерлейкину-2, в котором модифицирована одна или более чем одна аминокислота в последовательности. В частности, в настоящем изобретении аналог интерлейкина-2 может представлять собой аналог, обладающий пониженным или повышенным сродством связывания с рецепторами интерлейкина-2 по сравнению с природным интерлейкином-2, в котором модифицированы аминокислоты природного интерлейкина-2. В частности, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может представлять собой аналог, не встречающийся в природе.

Природный интерлейкин-2 может представлять собой интерлейкин-2 человека, и его последовательность может быть получена из известных баз данных и прочих источников. В частности, природный интерлейкин-2 может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, но не ограничен ею.

В настоящем изобретении под выражением «природный интерлейкин-2 может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1» понимают не только последовательность, которая совпадает с SEQ ID NO: 1, но также и последовательности, гомологичные SEQ ID NO: 1 на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, входят в объем природного интерлейкина-2 по настоящему изобретению; и что аминокислота(ы) в соответствующем(их) положении(ях) модификации изменена(ны) относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, когда последовательности, имеющие гомологию 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более, выровнены относительно SEQ ID NO: 1.

В настоящем изобретении под выражением «одна или более чем одна аминокислота в природной последовательности изменена» понимают то, что модификация, выбранная из группы, состоящей из замены, вставки, делеции, модификации и их комбинации, произошла по меньшей мере в отношении одной аминокислоты в природной последовательности.

В частности, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может включать последовательность, в которой одна или более чем одна аминокислота, соответствующая положениям 1, 12, 18, 19, 20, 22, 32, 35, 38, 42, 43, 45, 48, 49, 61, 68, 69, 74, 76, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 96, 125, 126 и 133 природного интерлейкина-2, модифицирована. В частности, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может представлять собой природный интерлейкин-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, и аминокислота в положении 125 заменена на другую аминокислоту; и который дополнительно включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотных замен. Аминокислота в положении 125 (то есть цистеин) может быть заменена на серин, а аминокислота(ы), в которой(ых) произошли дополнительные замены, может(гут) представлять собой аминокислоту(ы), соответствующую(ие) положениям 12, 18, 19, 20, 22, 32, 35, 38, 42, 43, 45, 48, 49, 61, 68, 69, 74, 76, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 96, 126 и 133, хотя и не ограничиваются ими.

Дополнительно, аналоги интерлейкина-2, которые включают замену, вставку, делецию, модификацию и так далее аминокислотных остатков, в дополнение к описанным выше положениям для модификаций, до той степени, которая может быть проведена для стабильности и увеличения периода полувыведения пептида, известного в данной области техники, также включены в объем настоящего изобретения.

Использованный здесь термин «алдеслейкин» или «аналог интерлейкина-2 (алдеслейкин)», который представляет собой имеющийся в продаже аналог интерлейкина-2, может представлять собой алдеслейкин (торговое название: Proleukin®), и в частности может представлять собой аналог, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В настоящем изобретении эти термины используют взаимозаменяемо с термином «аналог 1 интерлейкина-2». Аналог интерлейкина по настоящему изобретению может иметь измененное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 альфа и/или повышенное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета по сравнению с аналогом 1 интерлейкина-2.

Хотя нет данных о том, что рецепторы интерлейкина-2 альфа вовлечены в сигнальную систему интерлейкина-2, они повышают сродство связывания интерлейкина-2 с другими рецепторами интерлейкина-2 (рецепторами бета или гамма) в 10-100 раз и экспрессируются в CD4⁺ регуляторных Т-клетках и так далее.

Поскольку рецепторы интерлейкина-2 бета распределены главным образом в CD8⁺ Т-клетках или естественных клетках-киллерах (NK-клетках) и играют важную роль в активации иммунных ответов и макрофагов, ожидается, что гибель опухолевых клеток и активация иммунных ответов организма могут быть стимулированы путем активации рецепторов интерлейкина-2 бета.

Соответственно, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению, имеющий повышенное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета, может иметь терапевтический эффект, при котором подавление и гибель опухолей усилены с одновременным уменьшением побочных эффектов.

В настоящем изобретении аналог интерлейкина-2 может включать последовательность природного интерлейкина-2, в которой аминокислота в положении 1 удалена, и аминокислота в положении 125 заменена на другую аминокислоту, и которая дополнительно включает от 1 до 10 аминокислотных модификаций. Например, аналог интерлейкина-2 может включать последовательность природного интерлейкина-2, в которой аминокислота в положении 125 заменена на серин, и одна или более чем одна аминокислота в положениях 12, 18, 19, 20, 22, 32, 35, 38, 42, 43, 45, 48, 49, 61, 68, 69, 74, 76, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 96 и 126 заменена на другие аминокислоты, и/или одна или более чем одна аминокислота добавлена к аминокислоте в положении 133, но последовательность не ограничена этим, и любой аналог интерлейкина-2, имеющий измененное сродство связывания с рецепторами

интерлейкина-2 альфа и повышенное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета по сравнению с природным интерлейкином-2 и/или алдеслейкином, включен без ограничения.

В качестве примера аналога интерлейкина-2 по настоящему изобретению можно привести аналог интерлейкина-2, в котором одна или более чем одна аминокислота добавлена к аминокислоте, соответствующей положению 133, но аналог интерлейкина-2 не ограничен этим. Для задач настоящего изобретения добавляемые аминокислоты не ограничены в отношении их типа или длины, при условии что аналог интерлейкина-2 имеет измененное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 альфа и повышенное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета по сравнению с природным интерлейкином-2 или алдеслейкином, и аминокислоты, не встречающиеся в природе, и аминокислоты с химической модификацией также могут быть добавлены в дополнение к природным аминокислотам.

В другом воплощении аналог интерлейкина-2 может представлять собой аналог, в котором аминокислота в положении 1 удалена, аминокислота в положении 125 заменена на другую аминокислоту, и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более аминокислот из аминокислот в положениях 18, 19, 20, 22, 38, 42, 43, 45, 61, 68, 69, 74, 80, 81, 84, 85, 86, 88, 89, 91, 92, 94 и 96 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2, но не ограничивается ими.

В другом воплощении аналог интерлейкина-2 может представлять собой аналог, в котором аминокислота в положении 1 удалена, аминокислота в положении 125 заменена на другую аминокислоту, и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более аминокислот из аминокислот в положениях 18, 19, 22, 38, 42, 43, 45, 61, 68, 74, 80, 81, 84, 85, 86, 88, 91, 92, 94 и 96 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2, но не ограничивается ими.

В другом воплощении аналог интерлейкина-2 может представлять собой аналог, в котором аминокислота в положении 1 удалена, аминокислота в положении 125 заменена на другую аминокислоту; и одна или более чем одна аминокислота из аминокислот в положениях 18, 22, 38, 42, 61, 68, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2, но не ограничивается ими.

В другом воплощении аналог интерлейкина-2 может представлять собой любой аналог, выбранный из группы, состоящей из следующих аналогов:

(a) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 32 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(b) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 35 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(c) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 38 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(d) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 42 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(e) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 43 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(f) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 48 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(g) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 49 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(h) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 76 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(i) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 81, 92, 94 и 96 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(j) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 87 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(k) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38 и 42 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(l) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38 и 80 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(m) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38 и 84 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(n) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 19, 38 и 42 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(o) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 12, 38 и 42 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(p) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42 и 61 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(q) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42 и 84 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(r) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42 и 88 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(s) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42 и 89 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(t) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42 и 91 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(u) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42 и 94 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(v) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42 и 126 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(w) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 80 и 84 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(x) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 94 и 96 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(y) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(z) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 61, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(aa) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ab) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 80, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ac) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 81, 84 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ad) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 20, 38, 42, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ae) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(af) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 74, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ag) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 81, 84 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ah) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 81, 88 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ai) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(aj) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 80, 81, 85 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ak) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 80, 81, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(al) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(am) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 45, 74, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(an) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 74, 80, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ao) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81, 84 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ар) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 45, 80, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(aq) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ar) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 42, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(as) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 61, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(at) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 69, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(au) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 85, 86, 91 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(av) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(aw) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ax) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 45, 74, 80, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ay) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 68, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(az) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 69, 74, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(ba) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 84, 85, 86, 91 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bb) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 85, 86, 92, 94 и 96 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bc) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 19, 22, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bd) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 38, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(be) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 61, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bf) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 68, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bg) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 35, 38, 42, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bh) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 45, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bi) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81, 85, 86, 91 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bj) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81, 85, 86, 92 и 95 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bk) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 35, 38, 42, 74, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bl) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 43, 61, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bm) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81, 85, 86, 91, 92 и 95 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bn) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 35, 38, 42, 74, 80, 81, 82, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bo) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2; и

(bp) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 85 и 86 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2.

В частности, аминокислотные замены, включенные в аналог интерлейкина-2, могут представлять собой любую одну или более чем одну замену, выбранную из группы, состоящей из следующих аминокислотных замен:

(a) замена, при которой аминокислота в положении 12 заменена на валин или фенилаланин;

(b) замена, при которой аминокислота в положении 18 заменена на аргинин;

(c) замена, при которой аминокислота в положении 19 заменена на тирозин, валин, фенилаланин или аргинин;

(d) замена, при которой аминокислота в положении 20 заменена на валин или фенилаланин;

(e) замена, при которой аминокислота в положении 22 заменена на глутаминовую кислоту;

(f) замена, при которой аминокислота в положении 32 заменена на цистеин;

(g) замена, при которой аминокислота в положении 35 заменена на цистеин или глутаминовую кислоту;

(h) замена, при которой аминокислота в положении 38 заменена на аланин или аспарагиновую кислоту;

(i) замена, при которой аминокислота в положении 42 заменена на лизин, аланин или триптофан;

(j) замена, при которой аминокислота в положении 43 заменена на цистеин, глутаминовую кислоту или глутамин;

(k) замена, при которой аминокислота в положении 45 заменена на аланин;

(l) замена, при которой аминокислота в положении 48 заменена на цистеин;

(m) замена, при которой аминокислота в положении 49 заменена на цистеин;

(n) замена, при которой аминокислота в положении 61 заменена на глутамин, аргинин или аспарагиновую кислоту;

(o) замена, при которой аминокислота в положении 68 заменена на аспарагиновую кислоту или глутамин;

(p) замена, при которой аминокислота в положении 69 заменена на глицин;

(q) замена, при которой аминокислота в положении 74 заменена на гистидин или аланин;

(r) замена, при которой аминокислота в положении 76 заменена на цистеин;

(s) замена, при которой аминокислота в положении 80 заменена на фенилаланин, тирозин, валин, аспарагиновую кислоту или триптофан;

(t) замена, при которой аминокислота в положении 81 заменена на аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или аспарагин;

(u) замена, при которой аминокислота в положении 82 заменена на глицин или валин;

(v) замена, при которой аминокислота в положении 84 заменена на глутаминовую кислоту, валин или фенилаланин;

(w) замена, при которой аминокислота в положении 85 заменена на валин, аланин, глицин, триптофан, тирозин, треонин, изолейцин, глутаминовую кислоту или фенилаланин;

(x) замена, при которой аминокислота в положении 86 заменена на валин, аланин, глицин или лейцин;

(y) замена, при которой аминокислота в положении 87 заменена на цистеин;

(z) замена, при которой аминокислота в положении 88 заменена на глутамин, валин или фенилаланин;

(aa) замена, при которой аминокислота в положении 89 заменена на фенилаланин;

(ab) замена, при которой аминокислота в положении 91 заменена на треонин, фенилаланин или глутаминовую кислоту;

(ac) замена, при которой аминокислота в положении 92 заменена на фенилаланин, лейцин, тирозин или триптофан;

(ad) замена, при которой аминокислота в положении 94 заменена на фенилаланин или валин;

(ae) замена, при которой аминокислота в положении 95 заменена на аспарагиновую кислоту;

(af) замена, при которой аминокислота в положении 96 заменена на фенилаланин, валин или изолейцин;

(ag) замена, при которой аминокислота в положении 125 заменена на серин; и

(ah) замена, при которой аминокислота в положении 126 заменена на треонин.

В другом воплощении аналог интерлейкина-2 может представлять собой любой аналог, выбранный из следующих аналогов интерлейкина-2:

(a) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты в аналоге природного интерлейкина-2;

(b) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты в аналоге природного интерлейкина-2;

(c) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты в аналоге природного интерлейкина-2;

(d) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты в аналоге природного интерлейкина-2;

(e) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 61, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты в аналоге природного интерлейкина-2; и

(f) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 68, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты в аналоге природного интерлейкина-2.

В частности, аминокислотные замены, включенные в аналог интерлейкина-2, могут представлять собой любую одну или более чем одну замену, выбранную из группы, состоящей из следующих аминокислотных замен:

(a) замена, при которой аминокислота в положении 18 заменена на аргинин;

(b) замена, при которой аминокислота в положении 22 заменена на глутаминовую кислоту;

(c) замена, при которой аминокислота в положении 38 заменена на аланин;

(d) замена, при которой аминокислота в положении 42 заменена на лизин;

(e) замена, при которой аминокислота в положении 61 заменена на аспарагиновую кислоту;

(f) замена, при которой аминокислота в положении 68 заменена на аспарагиновую кислоту;

(g) замена, при которой аминокислота в положении 80 заменена на фенилаланин;

(h) замена, при которой аминокислота в положении 81 заменена на глутаминовую кислоту;

(i) замена, при которой аминокислота в положении 85 заменена на валин;

(j) замена, при которой аминокислота в положении 86 заменена на валин;

(k) замена, при которой аминокислота в положении 92 заменена на фенилаланин; и

(l) замена, при которой аминокислота в положении 125 заменена на серин.

Использованный здесь термин «соответствующий» относится к аминокислотному остатку в определенном положении, указанному в пептиде, или аминокислотному остатку, который является подобным, идентичным или гомологичным остатку, указанному в пептиде. Подтверждением аминокислоты в соответствующем положении может быть определение конкретной аминокислоты в последовательности, которая относится к конкретной последовательности.

Например, каждый аминокислотный остаток аминокислотной последовательности может быть пронумерован путем выравнивания любой аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 и, на основании этого, приписывания номера положения аминокислотного остатка, соответствующего аминокислотному остатку в SEQ ID NO: 1.

Для выравнивания как такового можно использовать, например, алгоритм Нидлмана-Вунша (Needleman и Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443–453), программу “Needle” пакета “EMBOSS” (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000), (*Trends Genet.* 16:276–277) и так далее, но доступные программы не ограничены ими, и соответствующим образом можно использовать программу выравнивания последовательностей, известную в данной области техники, алгоритм попарного сравнения последовательностей и так далее.

В настоящем изобретении, даже при выражении в виде конкретного положения аминокислоты в пептиде, такое выражение может относиться к соответствующему положению в референсной последовательности.

В другом воплощении аналог интерлейкина-2 может включать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-106, по существу состоять из нее или состоять из нее, но не ограничивается этим.

Дополнительно, даже если в настоящем изобретении аналог интерлейкина-2 выражен как «аналог интерлейкина-2, состоящий из определенной SEQ ID NO», это не исключает мутации, которая может происходить путем добавления бессмысленной последовательности выше по ходу транскрипции или ниже по ходу транскрипции аминокислотной последовательности соответствующей SEQ ID NO, или мутации, которая может происходить естественным путем, или молчащей мутации в нем, при условии что аналог интерлейкина-2 обладает активностью, идентичной или эквивалентной активности аналога интерлейкина-2, состоящего из аминокислотной последовательности соответствующей SEQ ID NO, и даже если присутствует добавление или мутация последовательности, аналог интерлейкина-2 очевидно входит в объем настоящего изобретения.

Аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может включать аминокислотную последовательность, имеющую гомологию или идентичность 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 3-106, но не ограничивается этим.

В конкретном воплощении аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может включать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 21, 41, 52, 86, 104 и 105, по существу состоять из нее или состоять из нее, но не ограничивается этим.

Использованные здесь термины «гомология» и «идентичность» относятся к степени родства между двумя определенными аминокислотными последовательностями или нуклеотидными последовательностями, и она может быть выражена в процентах.

Гомология или идентичность последовательностей консервативных полинуклеотидов или полипептидов может быть определена посредством стандартных алгоритмов выравнивания, и штрафы за пробелы, установленные в используемой программе по умолчанию, можно использовать в комбинации. По существу, гомологичные или идентичные последовательности обычно могут гибридизоваться с целыми последовательностями или с частью последовательностей в умеренно или очень строгих условиях. Очевидно, что гибридизация также включает гибридизацию полинуклеотида с полинуклеотидом, который включает общий кодон или кодон с учетом вырожденности кодонов.

Термины «гомология» и «идентичность» часто могут быть использованы взаимозаменяемо.

Обладают ли любые две нуклеотидные или пептидные последовательности гомологией, сходством или идентичностью можно определить, например, с помощью известного компьютерного алгоритма (например, программы «FASTA») с использованием параметров по умолчанию, как описано в Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444. Альтернативно это можно определить с помощью алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443–453), как выполняется в программе Needleman пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16:276–277) (версия 5.0.0 или более поздняя) (включая пакет программ GCG (Devereux, J. *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. *et al.*, *J Molec Biol* 215:403 (1990); *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, и CARILLO *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). Например, гомология, сходство или идентичность могут быть определены с помощью BLAST или ClustalW от Национального центра биотехнологической информации (США).

Гомология, сходство или идентичность нуклеотидных или пептидных последовательностей могут быть определены посредством сравнения информации о последовательностях с помощью компьютерной программы GAP (например, Needleman *et al.* (1970), *J Mol Biol* 48:443), как раскрыто в Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math* (1981) 2:482. Кратко, программа GAP определяет гомологию, сходство или идентичность как число одинаково выровненных символов (то есть нуклеотидов или аминокислот), разделенное на общее число символов в более короткой из двух последовательностей. Параметры по умолчанию для программы GAP могут включать: (1) одинарную матрицу сравнения (содержащую значение 1 для совпадений и 0 для несовпадений) и взвешенную матрицу сравнения (или матрицу замен EDNAFULL (EMBOSS версия NCBI NUC4.4)) от Gribskov *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:6745, как раскрыто в Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas Of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp.353-358 (1979); (2) штраф 3,0 за каждый пропуск и дополнительный штраф 0,10 за каждый символ в каждом пропуске (или штраф за открытие пропуска 10, штраф за удлинение пропуска 0,5); и (3) отсутствие штрафа за окончание пропуска. Следовательно, термины «гомология» и «идентичность», использованные здесь, представляют соответствие между последовательностями.

Вышеизложенное можно применять в отношении других воплощений или других аспектов настоящего изобретения, но не ограничиваясь этим.

Аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может быть использован в качестве нового заменителя интерлейкина-2, активность которого *in vitro* изменена путем понижения или повышения сродства связывания этого аналога интерлейкина-2 с рецепторами интерлейкина-2 альфа и/или бета. В частности, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может быть использован в качестве эффективного терапевтического агента благодаря его активности в отношении двух типов рецепторов, потому что он не только обладает повышенным сродством связывания с рецепторами бета, но также измененным (то есть повышенным или пониженным) сродством связывания с рецепторами альфа.

В настоящем изобретении такая модификация для получения аналогов интерлейкина-2 включает все модификации с использованием аминокислот L-типа или D-типа и/или неприродных аминокислот; и/или модификацию природной последовательности, например модификацию функциональной группы боковой цепи, внутримолекулярное ковалентное связывание (например образование кольца между боковыми цепями), метилирование, ацилирование, убиквитинирование, фосфорилирование, аминоксанирование, биотинилирование и так далее.

Дополнительно модификация включает все модификации, где одна или более чем одна аминокислота добавлена к амино-концу и/или карбокси-концу природного интерлейкина-2.

В качестве аминокислот для замены или добавления можно использовать не только 20 аминокислот, обычно обнаруживаемых в белках человека, но также атипичные аминокислоты или аминокислоты, не встречающиеся в природе. Атипичные аминокислоты имеются в продаже из источников, включая Sigma-Aldrich, ChemPep Inc. и Genzyme Pharmaceuticals. Пептиды, включающие эти аминокислоты и типичные пептидные последовательности для синтеза пептидов, могут быть синтезированы и приобретены у коммерческих поставщиков, например American Peptide Company, Bachem (США) или Anygen (Корея).

Производные аминокислот могут быть получены таким же способом, и в качестве одного примера может быть использована 4-имидазоуксусная кислота и так далее.

Дополнительно аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может находиться в модифицированной форме, где N-конец и/или C-конец и так далее

интерлейкина-2 химически модифицирован или защищен органическими группами, или аминокислоты могут быть добавлены к концу пептида и так далее для его защиты от протеаз *in vivo* при одновременном увеличении его стабильности.

В частности, в случае химически синтезированного пептида, его N- и C-концы электрически заряжены, и, следовательно, N-конец пептида может быть ацетилирован, и/или C-конец пептида может быть амидирован для снятия заряда, но пептид конкретно не ограничен этим.

Аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может быть синтезирован с помощью метода твердофазного синтеза, а также может быть получен с помощью рекомбинантного способа или может быть получен коммерческим путем, но не ограничивается этим.

Кроме того, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может быть синтезирован посредством известного в данной области техники способа в соответствии с его длиной, например с помощью автоматического синтезатора пептидов, а также может быть получен с помощью генно-инженерной технологии.

В частности, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может быть получен с помощью стандартного способа синтеза, с помощью системы рекомбинантной экспрессии или любого другого способа, известного в данной области техники. Соответственно, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может быть синтезирован посредством многих способов, включая, например, следующие способы:

(а) способ синтеза пептида посредством ступенчатого твердофазного или жидкофазного метода, или посредством сборки фрагментов, с последующим выделением и очисткой конечного пептидного продукта;

(б) способ осуществления экспрессии нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей пептид, в клетке-хозяине, и выделения экспрессированного продукта из культуры клетки-хозяина; или

(в) способ осуществления бесклеточной экспрессии *in vitro* нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей пептид, и выделения из нее продукта экспрессии; или

способ получения пептидных фрагментов с помощью любой комбинации способов (а), (б) и (в), получения данного пептида посредством связывания пептидных фрагментов и затем выделение данного пептида.

В настоящем изобретении средство связывания любого аналога интерлейкина-2 (или конъюгата длительного действия, содержащего его) с рецепторами природного

интерлейкина-2 может быть измерено при использовании метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР), представляющим собой способ измерения сродства с рецепторами.

В частности, в анализе ППР может быть использован способ, использующий принцип связывания белка с лигандом, при котором рецептор интерлейкина-2 иммобилизуют на сенсорном чипе, а аналог интерлейкина-2, разведенный в экспериментальном буфере с помощью метода серийных разведений, пропускают для инициирования связывания с иммобилизованным рецептором, а затем пропускают только экспериментальный буфер с той же скоростью потока для инициирования диссоциации аналога интерлейкина-2 с рецептором, таким образом измеряя сродство связывания; или способ, в котором антитело к Fc-фрагменту иммуноглобулина человека иммобилизуют на сенсорном чипе, затем иммобилизуют рецептор интерлейкина-2, к которому присоединен Fc-фрагмент, и аналог интерлейкина-2 пропускают для измерения сродства связывания, но способ не ограничивается этим.

Более конкретно, меченные биотином человеческие рецепторы интерлейкина-2 иммобилизовали на стрептавидиновом биосенсорном чипе, а конъюгат аналога интерлейкина-2 длительного действия, разведенный в буфере HBS-P+ с помощью метода двукратных серийных разведений, пропускали со скоростью потока 20 мкл/мин в течение 3 мин, и с той же скоростью пропускали только буфер HBS-P+, чтобы вызвать диссоциацию между рецепторами интерлейкина-2 и конъюгатом аналога интерлейкина-2 длительного действия, и полученные константы ассоциации и диссоциации использовали для измерения сродства связывания в соответствии с моделью, соответствующей связыванию 1:1, с использованием программы BIAevaluation, но не ограничивались этим.

Более конкретно, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может иметь пониженное или повышенное сродство связывания с рецептором интерлейкина-2 альфа по сравнению с природным интерлейкином-2 или аналогом интерлейкина-2 (алдеслейкином; или аналогом 1 интерлейкина-2).

В частности, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может иметь примерно 0,001-кратное или выше, примерно 0,005-кратное или выше, примерно 0,01-кратное или выше, примерно 0,05-кратное или выше, примерно 0,1-кратное или выше, примерно 0,3-кратное или выше, примерно 0,5-кратное или выше, примерно 0,7-кратное или выше, примерно 0,9-кратное или выше, примерно 1,1-кратное или выше, примерно

1,3-кратное или выше, примерно 1,5-кратное или выше или примерно 1,7-кратное или выше сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 альфа по сравнению со сродством связывания природного интерлейкина-2 или алдеслейкина с рецепторами интерлейкина-2 альфа, но числовое значение сродства связывания не ограничено, и это значение входит в объем настоящего изобретения, при условии что имеется изменение сродства связывания по сравнению со сродством связывания природного интерлейкина-2 или алдеслейкина.

Альтернативно, на основании сродства связывания алдеслейкина с рецепторами интерлейкина-2 альфа (взятого за 100%) аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может не обладать сродством связывания с рецепторами интерлейкина-2 альфа или иметь сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 альфа примерно 1% или выше, примерно 5% или выше, примерно 7% или выше, примерно 10% или выше, примерно 15% или выше, примерно 20% или выше, примерно 30% или выше, примерно 50% или выше, примерно 70% или выше, примерно 90% или выше, примерно 100% или выше, примерно 150% или выше, или примерно 200% или выше, но числовое значение сродства связывания не ограничено, и это значение входит в объем настоящего изобретения, при условии что имеется изменение сродства связывания по сравнению со сродством связывания природного интерлейкина-2 или алдеслейкина.

Кроме того, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может, в частности, иметь примерно 0,1-кратное или выше, примерно 0,3-кратное или выше, примерно 0,5-кратное или выше, примерно 0,7-кратное или выше, примерно 1,0-кратное или выше, примерно 10-кратное или выше, примерно 20-кратное или выше, примерно 30-кратное или выше, примерно 40-кратное или выше, примерно 50-кратное или выше, примерно 60-кратное или выше, примерно 70-кратное или выше, примерно 80-кратное или выше, примерно 90-кратное или выше или примерно 100-кратное или выше сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета по сравнению со сродством связывания природного интерлейкина-2 или алдеслейкина с рецепторами интерлейкина-2 бета, но числовое значение сродства связывания не ограничено, и это значение входит в объем настоящего изобретения, при условии что имеется изменение или повышение сродства связывания по сравнению со сродством связывания природного интерлейкина-2 или алдеслейкина.

Альтернативно, на основании сродства связывания алдеслейкина с рецепторами интерлейкина-2 бета (взятого за 100%) аналог интерлейкина-2 по настоящему

изобретению может иметь сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета примерно 5% или выше, примерно 9% или выше, примерно 10% или выше, примерно 20% или выше, примерно 30% или выше, примерно 50% или выше, примерно 100% или выше, примерно 200% или выше, примерно 500% или выше, примерно 700% или выше, примерно 1000% или выше, примерно 1500% или выше, примерно 3000% или выше, примерно 5000% или выше, примерно 7000% или выше, примерно 10000% или выше, примерно 12000% или выше, примерно 15000% или выше, примерно 20000% или выше или примерно 25000%, но числовое значение сродства связывания не ограничено, и это значение входит в объем настоящего изобретения при условии, что имеется повышение сродства связывания по сравнению со сродством связывания природного интерлейкина-2 или алдеслейкина.

Использованный здесь термин «примерно» относится к диапазону, включающему все из $\pm 0,5$, $\pm 0,4$, $\pm 0,3$, $\pm 0,2$, $\pm 0,1$ и так далее и включающему все значения, эквивалентные или подобные значениям, следующим за этими значениями, но диапазон не ограничен ими.

Аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению характеризуется тем, что он имеет измененное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 альфа и повышенное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета по сравнению с природным интерлейкином-2 или алдеслейкином.

В конкретном воплощении настоящего изобретения для получения аналога интерлейкина-2 по настоящему изобретению был получен аналог интерлейкина-2 на основе природного интерлейкина-2 (SEQ ID NO: 1), в который была введена модификация. Аналог интерлейкина-2, полученный в настоящем изобретении, может представлять собой аналог, включающий любую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3-106, или может представлять собой аналог, кодируемый любой нуклеотидной последовательностью из SEQ ID NO: 108-211.

Нуклеиновая кислота, кодирующая аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению, может представлять собой кислоту, модифицированную таким образом, что модификация (делеция, замена и/или добавление аминокислоты) может быть введена в аминокислоту в конкретном положении в нуклеотидной последовательности, кодирующей природный интерлейкин-2 с SEQ ID NO: 1, и в частности, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может включать нуклеотидную последовательность, кодирующую любую аминокислотную последовательность из SEQ

ID NO: 3-106. Например, нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может иметь или включать любую нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 108-211.

Нуклеотидная последовательность по настоящему изобретению может быть модифицирована различным образом в кодирующей области в пределах, не изменяющих аминокислотную последовательность аналога интерлейкина-2 по настоящему изобретению, с учетом вырожденности кодонов или предпочтительности кодонов для организма, предназначенного для экспрессии нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В частности, нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может иметь или включать нуклеотидную последовательность на 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более и менее чем на 100% гомологичную или идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 108-211; или может состоять или по существу состоять из нуклеотидной последовательности на 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более и менее чем на 100% гомологичной или идентичной любой из последовательностей SEQ ID NO: 108-211, но нуклеиновая кислота не ограничена этим.

Дополнительно нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может включать, без ограничения, зонд, который может быть получен из известной генной последовательности (например, последовательности, которая может гибридизоваться с последовательностью, комплементарной всей нуклеотидной последовательности по настоящему изобретению или ее части в жестких условиях). Термин «жесткие условия» относится к условиям, обеспечивающим специфическую гибридизацию между полинуклеотидами. Такие условия подробно описаны в литературе (см. J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 9.50-9.51, 11.7-11.8).

Для гибридизации требуется, чтобы две нуклеиновые кислоты имели комплементарные последовательности, хотя несовпадения между основаниями могут быть допустимы в зависимости от жесткости условий гибридизации. Термин «комплементарный» используют для описания взаимосвязи между нуклеотидными основаниями, которые могут гибридизоваться друг с другом. Например, в отношении ДНК, аденин комплементарен тимину, а цитозин комплементарен гуанину.

Соответственно, нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может включать выделенные фрагменты нуклеиновой кислоты, комплементарные полной последовательности, а также по существу аналогичным последовательностям нуклеиновой кислоты.

Подходящая жесткость условий гибридизации полинуклеотидов зависит от длины полинуклеотидов и степени комплементарности, и эти переменные хорошо известны в данной области техники (например, Sambrook *et al.*, выше).

Гомология и идентичность являются такими, как описано выше.

Кроме того, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может иметь увеличенный период полувыведения *in vivo* по сравнению с природным интерлейкином-2 или алдеслейкином, но конкретно этим не ограничивается. Например, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может находиться в форме конъюгата длительного действия с увеличенным периодом полувыведения за счет связывания биосовместимого материала (например Fc-фрагмента иммуноглобулина) для увеличения периода полувыведения с аналогом интерлейкина-2 непосредственно или через линкер, но этим не ограничивается.

Конъюгат длительного действия согласно настоящему изобретению не только включает аналог интерлейкина-2 с повышенным сродством связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета, но также связан с Fc-фрагментом иммуноглобулина в качестве типового носителя для увеличения периода его полувыведения, что позволяет увеличить период полувыведения аналога интерлейкина-2, повысить экспозицию в крови и усилить иммунный ответ *in vivo*, и таким образом может быть эффективно достигнуто ингибирование роста опухоли и уменьшение количества раковых клеток.

Согласно другому аспекту осуществления настоящего изобретения предложен конъюгат аналога интерлейкина-2 длительного действия.

В настоящем изобретении конъюгат аналога интерлейкина-2 длительного действия может находиться в форме, в которой с аналогом интерлейкина-2 связан биосовместимый материал, способный увеличить период его полувыведения *in vivo*. В настоящем изобретении биосовместимый материал может быть использован взаимозаменяемо с носителем.

В настоящем изобретении конъюгат длительного действия может демонстрировать более продолжительную эффективность по сравнению с аналогом

интерлейкина-2, с которым не связан носитель, и в настоящем изобретении такой конъюгат называют «конъюгатом длительного действия» или «конъюгатом».

При этом конъюгат может быть таким, который не встречается в природе.

В одном конкретном воплощении настоящего изобретения конъюгат длительного действия может представлять собой конъюгат длительного действия химической формулы 1, представленной ниже:

Химическая формула 1



где X представляет собой аналог интерлейкина-2, обладающий повышенным сродством связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета по сравнению с алдеслейкином;

L представляет собой полиэтиленгликолевый линкер;

a представляет собой 0 или натуральное число, при условии что, когда a равен 2 или более, тогда каждый L независим от другого;

F представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина в форме димера; и

- указывает на наличие ковалентной связи.

Более конкретно, X и L, а также L и F могут быть связаны друг с другом ковалентной связью. В частности, конъюгат представляет собой конъюгат, в котором X, L и F связаны ковалентными связями, соответственно, в порядке, указанном в химической формуле 1.

Кроме того, F может быть непосредственно связан с X (то есть в химической формуле 1 a равен 0) или может быть связан через линкер (L).

В настоящем изобретении аналог интерлейкина-2 может соответствовать структуре одной из группировок, составляющих конъюгат. В частности, он соответствует X в приведенной выше химической формуле 1, а аналог интерлейкина-2 является таким же, как описано выше.

В конъюгате F представляет собой материал, способный увеличивать период полувыведения X, то есть аналога интерлейкина-2, и соответствует структуре одной из группировок, составляющих конъюгат по настоящему изобретению.

F и X могут быть связаны друг с другом ковалентной химической связью, и F и X могут быть связаны друг с другом через L посредством ковалентной химической связи.

В частности, F представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина, а Fc-фрагмент иммуноглобулина может представлять собой Fc-фрагмент IgG или негликозилированный Fc-фрагмент IgG4, но конкретно этим не ограничивается.

В конкретном воплощении настоящего изобретения F (Fc-фрагмент иммуноглобулина) представляет собой димер, состоящий из двух полипептидных цепей, и может иметь структуру, в которой один конец L связан только с одной из двух полипептидных цепей, но не ограничивается этим.

Одна или более чем одна боковая аминокислотная цепь пептида по настоящему изобретению может быть присоединена к биосовместимому материалу для увеличения растворимости и/или периода полувыведения, и/или для повышения его биодоступности *in vivo*. Эти модификации могут уменьшать клиренс терапевтических белков и пептидов.

Описанный выше биосовместимый материал может быть растворимым (амфипатическим или гидрофильным), и/или нетоксичным, и/или фармацевтически приемлемым.

Кроме того, F может быть непосредственно связан с X (то есть в химической формуле 1 а равен 0) или может быть связан через полиэтиленгликолевый линкер (L).

В одном конкретном воплощении конъюгат длительного действия по настоящему изобретению может представлять собой конъюгат, в котором аналог интерлейкина-2 и Fc-фрагмент иммуноглобулина связаны, но не ограничивается этим.

В настоящем изобретении термин «Fc-фрагмент иммуноглобулина» относится к фрагменту, содержащему константную область 2 тяжелой цепи (CH₂) и/или константную область 3 тяжелой цепи (CH₃), за исключением переменных участков тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. Fc-фрагмент иммуноглобулина может быть структурой, составляющей группировку конъюгата по настоящему изобретению. В частности, Fc-фрагмент иммуноглобулина соответствует F в приведенной выше химической формуле 1.

В настоящем изобретении Fc-фрагмент включает не только природную последовательность, полученную посредством папаинового расщепления иммуноглобулина, но также ее производное, например варианты, в которых один или более чем один аминокислотный остаток в природной последовательности модифицирован посредством делеции, вставки, неконсервативной или консервативной замены или их комбинации и, таким образом, отличается от природной последовательности и так далее.

Указанные выше производные, заместители и варианты необходимы для сохранения FcRn-связывающей способности. В настоящем изобретении F может представлять собой фрагмент иммуноглобулина человека, но не ограничивается этим. В настоящей описании «биосовместимый материал» или «носитель» может относиться к Fc-фрагменту.

F (например Fc-фрагмент иммуноглобулина) имеет структуру, в которой две полипептидные цепи связаны дисульфидной связью или только через атом азота в одной из этих двух цепей, но структура F не ограничивается этими. Связь через атом азота может быть осуществлена с эпсилон-атомом N или N-концевой аминогруппой лизина посредством восстановительного аминирования.

Реакция восстановительного аминирования относится к реакции, в которой аминная группа или аминогруппа реагента взаимодействует с альдегидом другого реагента (то есть с функциональной группой, способной к восстановительному аминированию) с получением амина, и затем образуется аминная связь посредством восстановительного аминирования. Реакция восстановительного аминирования представляет собой реакцию органического синтеза, широко известную в данной области техники.

В конкретном воплощении конъюгата длительного действия по настоящему изобретению Fc-фрагмент иммуноглобулина связывается с линкером через атом азота его N-конца.

Такой Fc-фрагмент иммуноглобулина может включать шарнирную область в константной области тяжелой цепи, но не ограничивается этим.

В настоящем изобретении Fc-фрагмент иммуноглобулина может включать конкретную шарнирную последовательность на N-конце.

Использованный здесь термин «шарнирная последовательность» относится к области, которая расположена в тяжелой цепи и образует димер Fc-фрагментов иммуноглобулина посредством межцепочечной дисульфидной связи.

В настоящем изобретении шарнирная последовательность может быть изменена посредством делеции части шарнирной последовательности, имеющей следующую аминокислотную последовательность, так чтобы иметь только один цистеиновый остаток, но шарнирная последовательность не ограничивается этим:

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 418).

Шарнирная последовательность может включать только один остаток цистеина вследствие делеции остатка цистеина в положении 8 или 11 в шарнирной последовательности SEQ ID NO: 418. Шарнирная последовательность по настоящему изобретению может включать только один остаток цистеина и может состоять из 3-12 аминокислот, но не ограничивается этим. Более конкретно, шарнирная последовательность по настоящему изобретению может иметь следующую последовательность:

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 419), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro (SEQ ID NO: 420), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser (SEQ ID NO: 421), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro (SEQ ID NO: 422), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser (SEQ ID NO: 423), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys (SEQ ID NO: 424), Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys (SEQ ID NO: 425), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 426), Glu-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 427), Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 428), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 429), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 430), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 431), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys (SEQ ID NO: 432), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro (SEQ ID NO: 433), Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 434), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 435), Glu-Pro-Ser-Cys (SEQ ID NO: 436), Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 437).

Более конкретно, шарнирная последовательность может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 428 (Pro-Ser-Cys-Pro) или SEQ ID NO: 437 (Ser-Cys-Pro), но не ограничивается этим.

В более конкретном воплощении в конъюгате длительного действия по настоящему изобретению N-конец Fc-фрагмента иммуноглобулина представляет собой пролин. В этом конъюгате Fc-фрагмент связан с линкером посредством атома азота пролина.

В одном воплощении в конъюгате длительного действия по настоящему изобретению Fc-фрагмент иммуноглобулина может иметь форму димера, в котором две цепи Fc-фрагмента иммуноглобулина образуют гомодимер или гетеродимер благодаря присутствию шарнирной последовательности. Конъюгат химической формулы 1 по настоящему изобретению может находиться в форме, в которой один конец линкера связан с одной цепью димерного Fc-фрагмента иммуноглобулина, но не ограничивается этим.

Использованный здесь термин «N-конец» относится к аминоконцу белка или полипептида, и он включает терминальный конец аминоконца или включает до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более аминокислот из самого терминального конца. Fc-фрагмент иммуноглобулина по настоящему изобретению может включать шарнирную последовательность на N-конце, но не ограничивается этим.

Кроме того, Fc-фрагмент иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой удлиненный Fc-фрагмент, который включает всю или часть константной области 1 тяжелой цепи (CH1) и/или константной области 1 легкой цепи (CL1), исключая переменные области тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, при условии что он имеет по существу такой же или улучшенный эффект по сравнению с его природным типом. Кроме того, Fc-фрагмент иммуноглобулина может представлять собой фрагмент, в котором удалены некоторые довольно длинные аминокислотные последовательности, соответствующие CH2 и/или CH3.

Например, Fc-фрагмент иммуноглобулина по настоящему изобретению может представлять собой: (1) домен CH1, домен CH2, домен CH3 и домен CH4; (2) домен CH1 и домен CH2; (3) домен CH1 и домен CH3; (4) домен CH2 и домен CH3; (5) комбинацию одного, или двух, или более доменов из домена CH1, домена CH2, домена CH3 и домена CH4, и шарнирной области иммуноглобулина (или части шарнирной области); и (6) димер каждого домена константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи, но данный Fc-фрагмент иммуноглобулина не ограничивается ими.

В настоящем изобретении Fc-фрагмент иммуноглобулина может представлять собой димер или мультимер, состоящий из одноцепочечных иммуноглобулинов, состоящих из доменов такого же происхождения, но этим не ограничивается.

Кроме того, в одном воплощении в конъюгате длительного действия по настоящему изобретению Fc-фрагмент иммуноглобулина F представляет собой димер, состоящий из двух полипептидных цепей, при этом димерный Fc-фрагмент F и X могут быть ковалентно связаны посредством одного идентичного линкера L, содержащего повторяющиеся звенья этиленгликоля. В конкретном воплощении X ковалентно связан только с одной полипептидной цепью из двух полипептидных цепей димерного Fc-фрагмента F посредством линкера L. В более конкретном воплощении только одна молекула X ковалентно связана посредством L с одной полипептидной цепью, с которой связан X, из двух полипептидных цепей димерного Fc-фрагмента F. В наиболее конкретном воплощении F является гомодимером.

В другом конкретном воплощении Fc-фрагмент иммуноглобулина F представляет собой димер, состоящий из двух полипептидных цепей, и один конец L связан только с одной полипептидной цепью из двух полипептидных цепей, но Fc-фрагмент не ограничивается этим.

В другом воплощении в конъюгате длительного действия по настоящему изобретению также возможно, что две молекулы X симметрично связаны с одним Fc-фрагментом в димерной форме. В частности, Fc-фрагмент иммуноглобулина и X могут быть связаны друг с другом посредством линкера (L), но связь между Fc-фрагментом иммуноглобулина и X не ограничена примерами, описанными выше.

Кроме того, Fc-фрагмент иммуноглобулина по настоящему изобретению включает природные аминокислотные последовательности, а также их производные последовательности. Производное аминокислотной последовательности означает, что один или более чем один аминокислотный остаток в природной аминокислотной последовательности имеет другую последовательность вследствие делеции, вставки, неконсервативного или консервативного замещения или их комбинации.

Например, аминокислотные остатки в положениях 214-238, 297-299, 318-322 или 327-331 в Fc IgG, которые, как известно, являются важными для связывания, могут быть использованы в качестве подходящих для модификации сайтов.

Кроме того, возможны разные типы производных, например производное, где удален сайт, способный образовать межцепочечную дисульфидную связь; производное, где удалены несколько N-концевых аминокислот из природного Fc; производное, где остаток метионина добавлен к N-концу природного Fc и так далее. Кроме того, могут быть удалены сайты связывания комплемента, например сайты связывания C1q или сайты антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) для устранения эффекторной функции. Технологии получения производных последовательности Fc-фрагмента иммуноглобулина раскрыты в международных публикациях WO 97/34631, WO 96/32478 и других.

Аминокислотные замены в белке или пептиде, которые не изменяют всю активность молекулы, хорошо известны в данной области техники (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Наиболее распространенные замены происходят между аминокислотными остатками Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly. В некоторых случаях аминокислоты могут быть

модифицированы посредством фосфорилирования, сульфатирования, акрилирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования, ацетилирования, амидирования и так далее.

Производные Fc, описанные выше, могут представлять собой производные, которые демонстрируют такую же биологическую активность, что и Fc-фрагмент по настоящему изобретению, и имеют повышенную структурную стабильность Fc-фрагмента в отношении нагревания, pH и так далее.

Кроме того, такой Fc-фрагмент может быть получен из природного типа, выделенного у людей или животных, таких как коровы, козы, свиньи, мыши, кролики, хомяки, крысы, морские свинки и так далее, или может представлять собой их рекомбинанты или производные, полученные из трансформированных животных клеток или микроорганизмов. В частности, способ получения из природного типа представляет собой способ выделения полных иммуноглобулинов из человеческого или животных организмов и затем их обработки протеазой. При обработке папаином природный тип расщепляется на Fab и Fc, а при обработке пепсином расщепляется на $rF'c$ и $F(ab)_2$. Fc или $rF'c$ могут быть выделены при использовании гельфильтрации и так далее. В более конкретном воплощении Fc-фрагмент может представлять собой Fc-фрагмент рекомбинантного иммуноглобулина, где человеческий Fc-фрагмент получают из микроорганизма.

Кроме того, Fc-фрагмент иммуноглобулина может иметь природные гликаны или повышенное или пониженное содержание гликанов по сравнению с его природным типом, или находиться в дегликозилированной форме. Повышение, снижение уровня или удаление гликанов Fc иммуноглобулина может быть достигнуто посредством любых способов, широко используемых в данной области техники, таких как химический способ, ферментативный способ и способ генной инженерии с использованием микроорганизма. В частности, Fc-фрагмент иммуноглобулина, полученный посредством удаления гликанов, демонстрирует значительное снижение сродства связывания в отношении комплемента C1q и снижение или потерю антителозависимой цитотоксичности или комплементзависимой цитотоксичности, и, таким образом, он не индуцирует нежелательных иммунных ответов у живых организмов. Исходя из этого, Fc-фрагмент иммуноглобулина в дегликозилированной или агликозилированной форме может быть более подходящим в качестве носителя лекарственного средства, принимая во внимание задачи настоящего изобретения.

Использованный здесь термин «дегликозилирование» относится к удалению гликанов из Fc-фрагмента с использованием фермента, а термин «агликозилирование» означает, что Fc-фрагмент продуцируется в негликозилированной форме в прокариотах, и более конкретно в *E. coli*.

В то же время Fc-фрагмент иммуноглобулина может быть человеческого или животного происхождения, включая коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомяков, крыс, морских свинок и так далее, и в более конкретном воплощении он может быть человеческого происхождения.

Кроме того, Fc-фрагмент иммуноглобулина может представлять собой Fc-фрагмент, полученный на основе IgG, IgA, IgD, IgE, IgM или их комбинации или гибрида. В более конкретном воплощении он может быть получен на основе IgG или IgM, которые являются самыми многочисленными белками в человеческой крови, и в еще более конкретном воплощении он может быть получен на основе IgG, который, как известно, увеличивает периоды полувыведения лиганд-связывающих белков. В более конкретном воплощении Fc-фрагмент иммуноглобулина может представлять собой Fc-фрагмент IgG4, и в наиболее конкретном воплощении Fc-фрагмент иммуноглобулина может представлять собой агликозилированный Fc-фрагмент на основе человеческого IgG4, но Fc-фрагмент иммуноглобулина не ограничивается этим.

Кроме того, в конкретном воплощении Fc-фрагмент иммуноглобулина может представлять собой Fc-фрагмент человеческого IgG4 в форме гомодимера, в котором два мономера связаны внутренней дисульфидной связью (межцепочечная форма) между цистеинами, которые представляют собой аминокислоты в положении 3 каждого мономера. В частности, каждый мономер гомодимера имеет или может иметь две внутренние дисульфидные связи (внутрицепочечная форма), то есть дисульфидную связь между цистеинами в положениях 35 и 95, и дисульфидную связь между цистеинами в положениях 141 и 199.

Каждый мономер может состоять из 221 аминокислоты, и аминокислоты, образующие гомодимер, могут состоять в общей сложности из 442 аминокислот, но количество аминокислот не ограничено этим. В частности, Fc-фрагмент иммуноглобулина может находиться в форме гомодимера, в котором два мономера, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 438 (состоящую из 221 аминокислоты), связаны посредством дисульфидной связи между цистеинами в положении 3 каждого мономера, в котором мономеры гомодимера независимо образуют

внутрицепочечную дисульфидную связь между цистеинами в положениях 35 и 95, и внутрицепочечную дисульфидную связь между цистеинами в положениях 141 и 199, но Fc-фрагмент иммуноглобулина не ограничивается этим.

F химической формулы 1 может включать мономер аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 438, и F может представлять собой гомодимер мономера аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 438, но не ограничивается этим.

В одном воплощении Fc-фрагмент иммуноглобулина может представлять собой гомодимер, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 439 (состоящую из 442 аминокислот), но не ограничивается этим.

В конкретном воплощении Fc-фрагмент иммуноглобулина и X могут быть не гликозилированы, но этим не ограничиваются.

В то же время использованный здесь термин «комбинация» означает, что полипептиды, кодирующие одноцепочечные Fc-фрагменты иммуноглобулина такого же происхождения, связаны с одноцепочечным полипептидом другого происхождения с образованием димера или мультимера. Другими словами димер или мультимер можно получить из двух или более фрагментов, выбранных из группы, состоящей из Fc-фрагментов IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc и IgE Fc.

Использованный здесь термин «гибрид» означает, что в одноцепочечной константной области иммуноглобулина присутствуют последовательности, соответствующие двум или более Fc-фрагментам иммуноглобулина различного происхождения. В настоящем изобретении возможны различные формы гибридов. Другими словами, гибридный домен может состоять из одного-четырех доменов, выбранных из группы, состоящей из CH1, CH2, CH3 и CH4 IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc и IgD Fc, и может включать шарнирную область.

При этом IgG можно разделить на подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а настоящее изобретение может включать их комбинации или гибриды, в частности подклассы IgG2 и IgG4, и наиболее конкретно Fc-фрагмент IgG4, который редко выполняет эффекторные функции, такие как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC).

Кроме того, описанный выше конъюгат может обладать более продолжительной эффективностью по сравнению с природным интерлейкином-2 или алдеслейкином или по сравнению с X, не модифицированным F, и такой конъюгат может находиться не

только в описанной выше форме, но и в форме, в которой он заключен в биоразлагаемые наночастицы, но не ограничивается этим.

В химической формуле 1 L представляет собой полиэтиленгликолевый линкер.

Использованный здесь термин «полиэтиленгликолевый линкер» включает биосовместимый полимер, в котором соединены два или более повторяющихся звена этиленгликоля. Повторяющиеся звенья связаны друг с другом посредством любой ковалентной связи, которая не является пептидной связью. Полиэтиленгликолевый линкер может представлять собой одну структуру, которая составляет группировку конъюгата по настоящему изобретению, и он соответствует L в химической формуле 1. В настоящем описании термин «линкер» можно использовать взаимозаменяемо с терминами «непептидный полимер» или «непептидный полимер».

В La, a может быть равен 1 или более, и когда a равен 2 или более, тогда L могут быть независимыми друг от друга.

В конкретном воплощении конъюгат может представлять собой конъюгат, в котором F и X ковалентно связаны посредством непептидного линкера, включающего реакционноспособную группу, способную связываться с F (в частности, с Fc-фрагментом иммуноглобулина) и X (в частности, с аналогом интерлейкина-2) на обоих концах.

В частности, в настоящем изобретении непептидный линкер может включать на своих концах реакционноспособные группы для образования конъюгата в результате взаимодействия с другими компонентами, составляющими конъюгат. Когда непептидный линкер, имеющий реакционноспособные функциональные группы на обоих концах, связывается с X и F химической формулы 1 посредством соответствующих реакционноспособных групп с образованием конъюгата, непептидный линкер или непептидный полимер может быть назван непептидной полимерной линкерной группировкой или непептидной линкерной группировкой.

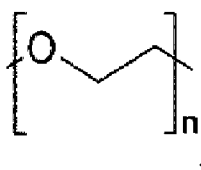
В конкретном воплощении L (полиэтиленгликолевый линкер) может представлять собой линкер, содержащий повторяющиеся звенья этиленгликоля, например полиэтиленгликоль, но не ограничивается им. Использованный здесь термин «полиэтиленгликоль» представляет собой термин, включающий все гомополимеры этиленгликоля, сополимеры PEG или метилзамещенные полимеры PEG (mPEG), но не ограничивающийся ими. Кроме того, те производные, которые уже известны в данной

области техники, и производные, которые могут быть легко получены специалистом в данной области техники, также включены в объем настоящего изобретения.

Полиэтиленгликолевый линкер может включать повторяющиеся звенья этиленгликоля и одновременно включать на своих концах функциональные группы, используемые при получении конъюгата еще до его формирования в конъюгат. В конъюгате длительного действия согласно настоящему изобретению X и F могут быть связаны посредством функциональных групп, но конъюгат не ограничивается этим. В настоящем изобретении непептидный линкер может включать две или три или более функциональные группы, при этом соответствующие функциональные группы могут быть одинаковыми или отличными друг от друга, но непептидный линкер не ограничивается этим.

В частности, линкер может представлять собой полиэтиленгликоль (PEG) химической формулы 2, представленной ниже, но не ограничивается этим:

Химическая формула 5



где n равен от 10 до 2400, n равен от 10 до 480, или n равен от 50 до 250, но не ограничивается этим.

В конъюгате длительного действия группировка PEG может включать структуру $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ и атом кислорода, расположенный между связывающим элементом и $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$, но не ограничивается этим.

В конкретном воплощении повторяющееся звено этиленгликоля может представлять собой, например, $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$, где величина n является натуральным числом и может быть определена таким образом, что средняя молекулярная масса, например, среднечисловая молекулярная масса участка $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ в конъюгате аналога интерлейкина-2 составляет от более чем 0 кДа до примерно 100 кДа, но не ограничивается этим. В другом воплощении величина n является натуральным числом и может быть определена таким образом, что средняя молекулярная масса, например, среднечисловая молекулярная масса участка $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ в пептидном конъюгате может составлять от примерно 1 кДа до примерно 100 кДа, от примерно 1 кДа до примерно 80 кДа, от примерно 1 кДа до примерно 50 кДа, от примерно 1 кДа до примерно 30 кДа,

от примерно 1 кДа до примерно 25 кДа, от примерно 1 кДа до примерно 20 кДа, от примерно 1 кДа до примерно 15 кДа, от примерно 1 кДа до примерно 13 кДа, от примерно 1 кДа до примерно 11 кДа, от примерно 1 кДа до примерно 10 кДа, от примерно 1 кДа до примерно 8 кДа, от примерно 1 кДа до примерно 5 кДа, от примерно 1 кДа до примерно 3,4 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 30 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 27 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 25 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 22 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 20 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 18 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 16 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 15 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 13 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 11 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 10 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 8 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 5 кДа, от примерно 3 кДа до примерно 3,4 кДа, от примерно 8 кДа до примерно 30 кДа, от примерно 8 кДа до примерно 27 кДа, от примерно 8 кДа до примерно 25 кДа, от примерно 8 кДа до примерно 22 кДа, от примерно 8 кДа до примерно 20 кДа, от примерно 8 кДа до примерно 18 кДа, от примерно 8 кДа до примерно 16 кДа, от примерно 8 кДа до примерно 15 кДа, от примерно 8 кДа до примерно 13 кДа, от примерно 8 кДа до примерно 11 кДа, от примерно 8 кДа до примерно 10 кДа, от примерно 9 кДа до примерно 15 кДа, от примерно 9 кДа до примерно 14 кДа, от примерно 9 кДа до примерно 13 кДа, от примерно 9 кДа до примерно 12 кДа, от примерно 9 кДа до примерно 11 кДа, от примерно 9,5 кДа до примерно 10,5 кДа, или примерно 10 кДа, но не ограничивается этим.

Кроме того, в конкретном воплощении конъюгат может иметь структуру, в которой аналог интерлейкина-2 и Fc-фрагмент иммуноглобулина (F) ковалентно связаны посредством линкера (L), содержащего повторяющееся звено этиленгликоля, но не ограничивается этим.

В другом конкретном воплощении в конъюгате длительного действия L может представлять собой линкер, содержащий повторяющиеся звенья этиленгликоля, а F может представлять собой димерный Fc-фрагмент иммуноглобулина. Более конкретно, одна молекула X ковалентно связана с одним Fc-фрагментом димерного Fc-фрагмента иммуноглобулина посредством линкера, содержащего повторяющиеся звенья этиленгликоля, но не ограничивается этим. В другом конкретном воплощении один конец линкера, содержащего повторяющиеся звенья этиленгликоля, может быть связан только с одной цепью Fc-фрагмента из двух цепей димерного Fc-фрагмента иммуноглобулина, но не ограничивается этим.

Молекулярная масса полиэтиленгликолевого линкера, который может быть использован в настоящем изобретении, может находиться в диапазоне от более чем 0 кДа до 200 кДа, в частности в диапазоне от примерно 1 кДа до 100 кДа, от примерно 1 кДа до 50 кДа, от примерно 1 кДа до 30 кДа, от примерно 2 кДа до 30 кДа, от примерно 1 кДа до 20 кДа, более конкретно в диапазоне от примерно 3,4 кДа до 10 кДа, и даже более конкретно примерно 3,4 кДа, но не ограничивается этим.

Кроме того, в качестве непептидного линкера по настоящему изобретению, конъюгированного с полипептидом, соответствующим F, может быть использован не только один тип полимера, но и комбинация различных типов полимеров.

Использованный здесь термин “примерно” включает все диапазоны, включая $\pm 0,5$, $\pm 0,4$, $\pm 0,3$, $\pm 0,2$, $\pm 0,1$ и так далее, и включает все значения в диапазоне, эквивалентные или подобные значению, следующему за термином «примерно», но не ограничивается этим.

В частности, непептидный линкер может иметь реакционноспособные группы на обоих концах в состоянии, когда F и X не связаны с ним, и может связываться с F и X посредством реакционноспособных групп.

В конкретном воплощении оба конца линкера могут связываться с тиоловой группой, аминогруппой или гидроксильной группой Fc-фрагмента иммуноглобулина и тиоловой группой, аминогруппой, азидной группой или гидроксильной группой аналога интерлейкина-2 (X), но не ограничиваются этим.

В частности, линкер может включать реакционноспособные группы, способные связываться с Fc-фрагментом иммуноглобулина и аналогом интерлейкина-2 (X), на его обоих концах, соответственно, в частности, реакционноспособные группы, способные связываться с тиоловой группой цистеина, аминогруппой, расположенной на N-конце лизина, аргинина, глутамина и/или гистидина, и/или гидроксильной группой на C-конце Fc-фрагмента иммуноглобулина; и с тиоловой группой цистеина, аминогруппой лизина, аргинина, глутамина и/или гистидина, азидной группой азидолизина, и/или гидроксильной группой аналога интерлейкина-2 (X), но не ограничивается этим.

Более конкретно, реакционноспособная группа линкера может быть одной или более чем одной группой, выбранной из группы, состоящей из альдегидной группы, малеимидной группы и сукцинимидного производного, но не ограничивается ими.

В приведенном выше примеры альдегидной группы могут включать пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу, но не ограничиваются ими.

В приведенном выше примеры сукцинимидного производного могут включать сукцинимидилвалерат, сукцинимидилметилбутаноат, сукцинимидилметилпропионат, сукцинимидилбутаноат, сукцинимидилпропионат, N-гидроксисукцинимид, гидроксисукцинимидил, сукцинимидилкарбоксиметил или сукцинимидилкарбонат, но не ограничиваются ими.

Линкер может быть связан с Fc-фрагментом иммуноглобулина F и аналогом интерлейкина-2 X посредством реакционноспособных групп для преобразования в линкерную группировку.

Кроме того, конечный продукт, полученный посредством восстановительного аминирования при помощи альдегидных связей, является значительно более стабильным, чем соединение, образованное амидной связью. Альдегидная реакционноспособная группа селективно взаимодействует с N-концом при низком pH, при этом она может образовывать ковалентную связь с остатком лизина при высоком pH, например при pH 9,0.

Кроме того, реакционноспособные группы на каждом конце линкера могут быть одинаковыми или отличающимися друг от друга, например, альдегидные группы могут присутствовать на обоих концах, и малеимидная группа может присутствовать на одном конце, а альдегидная группа, пропиональдегидная группа или бутиральдегидная группа может присутствовать на другом конце. Однако реакционноспособные группы конкретно не ограничены ими, при условии что F, в частности Fc-фрагмент иммуноглобулина, и X могут быть связаны с соответствующими концами линкера.

Например, линкер может включать в качестве реакционноспособных групп малеимидную группу на одном конце, и альдегидную группу, пропиональдегидную группу или бутиральдегидную группу на другом конце.

При использовании в качестве линкера полиэтиленгликоля, имеющего реакционноспособную гидроксильную группу на обоих его концах, конъюгат аналога интерлейкина-2 длительного действия по настоящему изобретению может быть получен посредством активирования гидроксильных групп до разных реакционноспособных групп с помощью известных химических реакций или путем использования имеющегося в продаже полиэтиленгликоля, имеющего модифицированные реакционноспособные группы.

В конкретном воплощении полимер может быть связан с остатком цистеина X и, более конкретно, с -SH группой цистеина, но не ограничивается этим.

В частности, реакционноспособная группа линкера может быть связана с -SH группой остатка цистеина, и все приведенные выше описания применимы к данной реакционноспособной группе. В случае, когда используют малеимид-PEG-альдегид, малеимидная группа связана с -SH группой X посредством тиоэфирной связи, и альдегидная группа может быть связана с -NH₂ группой F, в частности Fc иммуноглобулина, посредством реакции восстановительного аминирования, но не ограничивается этим.

В другом конкретном воплощении линкер может быть связан с остатком лизина X, более конкретно с аминогруппой лизина, но не ограничивается этим.

Кроме того, в конъюгате реакционноспособная группа линкера может быть связана с -NH₂ группой, расположенной на N-конце Fc-фрагмента иммуноглобулина, но не ограничивается этим.

Кроме того, в конъюгате аналог интерлейкина по настоящему изобретению может быть связан с линкером, имеющим реакционноспособные группы, например через C-конец.

Используемый здесь термин «С-конец» относится к карбокси-концу пептида, а применительно к задачам настоящего изобретения он относится к сайту, способному связываться с линкером. Например, С-конец может включать все аминокислотные остатки на терминальном конце С-конца и аминокислотные остатки вблизи С-конца и, в частности, с 1-го по 20-й аминокислотные остатки с терминального конца, но не ограничивается этим.

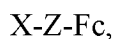
Кроме того, описанный выше конъюгат может обладать более продолжительной эффективностью по сравнению с X, не модифицированным F, и такой конъюгат может находиться не только в описанной выше форме, но и в форме, в которой он заключен в биоразлагаемые наночастицы.

Согласно другому аспекту осуществления настоящего изобретения предложен конъюгат длительного действия, в котором аналог интерлейкина-2, включающий одну любую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 3-106, и Fc-фрагмент иммуноглобулина связаны посредством линкера.

Аналог интерлейкина-2, линкер и конъюгат длительного действия, включающий их, являются такими, как описано выше.

Согласно другому аспекту осуществления настоящего изобретения предложен конъюгат аналога интерлейкина-2 длительного действия химической формулы 2, представленной ниже:

Химическая формула 2



где X представляет собой аналог интерлейкина-2, включающий любую из полипептидных последовательностей, выбранных из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3-106;

Z представляет собой полиэтиленгликолевый линкер с молекулярной массой от 2 кДа до 30 кДа;

Fc представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина в форме димера; и

- указывает на наличие ковалентной связи между X и Z и между Z и Fc;

где конъюгат длительного действия представляет собой конъюгат длительного действия, в котором один конец Z ковалентно связан только с одной полипептидной цепью в димерном Fc-фрагменте, а одна молекула X ковалентно связана с противоположным концом Z.

Аналог интерлейкина-2, линкер, Fc-фрагмент и конъюгат длительного действия, содержащий их, являются такими, как описано выше.

В конкретном воплощении аналог интерлейкина-2 может включать любую из последовательностей, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 56, 58, 59, 60, 62, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 85, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 101, 103, 104, 105 и 106, по существу состоять из нее или состоять из нее, но не ограничивается этим.

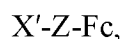
В другом конкретном воплощении аналог интерлейкина-2 может включать любую из последовательностей, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 13, 14, 16, 17, 20, 21, 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 98, 99, 100, 101, 103, 104 и 105, по существу состоять из нее или состоять из нее, но не ограничивается этим.

В другом конкретном воплощении аналог интерлейкина-2 может включать любую из последовательностей, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 42, 53, 87, 105 и 106, по существу состоять из нее или состоять из нее, но не ограничивается этим.

Кроме того, аналог интерлейкина-2 может дополнительно включать одну или более чем одну аминокислоту на С-конце.

Согласно другому аспекту осуществления настоящего изобретения предложен конъюгат аналога интерлейкина-2 длительного действия химической формулы 3, представленной ниже:

Химическая формула 3



где X' представляет собой аналог интерлейкина-2, включающий аминокислотную последовательность общей формулы 1, представленной ниже:

Общая формула 1

X1-P-T-S-S-S-T-K-K-T-Q-L-Q-L-E-H-L-X18-X19-D-L-X22-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-X38-M-L-T-X42-X43-F-X45-M-P-K-K-A-T-E-L-K-H-L-Q-C-L-E-X61-E-L-K-P-L-E-X68-V-L-N-L-A-X74-S-K-N-F-H-X80-X81-P-R-X84-X85-X86-S-N-I-N-X91-X92-V-X94-E-X96-K-G-S-E-T-T-F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-S-Q-S-I-I-S-T-L-T (общая формула 1, SEQ ID NO: 212),

где в общей формуле 1 выше:

X1 представляет собой делецию;

X18 представляет собой лейцин (L) или аргинин (R);

X19 представляет собой лейцин (L) или тирозин (Y);

X22 представляет собой глутаминовую кислоту (E) или глутамин (Q);

X38 представляет собой аланин (A), аспарагиновую кислоту (D) или аргинин (R);

X42 представляет собой аланин (A), фенилаланин (F), лизин (K) или триптофан (W);

X43 представляет собой глутаминовую кислоту (E), лизин (K) или глутамин (Q);

X45 представляет собой аланин (A) или тирозин (Y);

X61 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), глутамин (Q) или аргинин (R);

X68 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X74 представляет собой гистидин (H) или глутамин (Q);

X80 представляет собой фенилаланин (F), лейцин (L), валин (V) или тирозин (Y);

X81 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E) или аргинин (R);

X84 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X85 представляет собой аланин (A), глутаминовую кислоту (E), глицин (G), лейцин (L), валин (V), триптофан (W) или тирозин (Y);

X86 представляет собой аланин (A), глицин (G), изолейцин (I) или валин (V);

X91 представляет собой треонин (T) или валин (V);

X92 представляет собой фенилаланин (F), изолейцин (I) или тирозин (Y);

X94 представляет собой фенилаланин (F) или лейцин (L);

X96 представляет собой фенилаланин (F) или лейцин (L);

Z представляет собой полиэтиленгликолевый линкер с молекулярной массой от 2 кДа до 30 кДа;

Fc представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина в форме димера; и

- указывает на наличие ковалентной связи между X' и Z и между Z и Fc;

где конъюгат длительного действия представляет собой конъюгат длительного действия, в котором один конец Z ковалентно связан только с одной полипептидной цепью в димерном Fc-фрагменте, и одна молекула X' ковалентно связана с противоположным концом Z.

Аналог интерлейкина-2, линкер, Fc-фрагмент и конъюгат длительного действия, включающий их, являются такими, как описано выше.

В приведенной выше общей формуле 1 к треонину (T), соответствующему X133, может быть добавлена одна или более чем одна аминокислота, но этим не ограничивается.

В частности, аналог интерлейкина-2 может включать любую из последовательностей, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 56, 58, 59, 60, 62, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 85, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 101, 103, 104, 105 и 106, по существу состоять из нее или состоять из нее, но не ограничивается этим.

Такой аналог интерлейкина-2 может обладать повышенным сродством связывания с рецепторами бета по сравнению с алдеслейкином или природным интерлейкином-2, но не ограничивается этим.

В конкретном воплощении в общей формуле 1:

X43 представляет собой лизин (K);

X45 представляет собой тирозин (Y);

X61 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E) или глутамин (Q);

X68 представляет собой глутаминовую кислоту (E);

X74 представляет собой глутамин (Q);

X80 представляет собой фенилаланин (F) или лейцин (L);

X85 представляет собой лейцин (L), валин (V) или тирозин (Y);

X86 представляет собой изолейцин (I) или валин (V); и

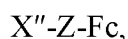
X92 представляет собой фенилаланин (F) или изолейцин (I), но не ограничивается этим.

В частности, аналог интерлейкина-2 характеризуется тем, что он включает любую из последовательностей, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 13, 14, 16, 17, 20, 21, 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 98, 99, 100, 101, 103, 104 и 105, но не ограничивается этим.

Аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению может дополнительно включать одну или более чем одну аминокислоту на С-конце, но не ограничивается этим.

Согласно другому аспекту осуществления настоящего изобретения предложен конъюгат аналога интерлейкина-2 длительного действия химической формулы 4, представленной ниже:

Химическая формула 4



где X'' представляет собой аналог интерлейкина-2, включающий аминокислотную последовательность общей формулы 2, представленной ниже:

Общая формула 2

X1-P-T-S-S-S-T-K-K-T-Q-L-Q-L-E-H-L-X18-L-D-L-X22-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-X38-M-L-T-X42-K-F-Y-M-P-K-K-A-T-E-L-K-H-L-Q-C-L-E-X61-E-L-K-P-L-E-X68-V-L-N-L-A-Q-S-K-N-F-H-F-X81-P-R-D-X85-X86-S-N-I-N-V-F-V-L-E-L-K-G-S-E-T-T-F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-S-Q-S-I-I-S-T-L-T (общая формула 2, SEQ ID NO: 213)

X1 представляет собой делецию;

X18 представляет собой лейцин (L) или аргинин (R);

X22 представляет собой глутаминовую кислоту (E) или глутамин (Q);

X38 представляет собой аланин (A) или аргинин (R);

X42 представляет собой фенилаланин (F) или лизин (K);

X61 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X68 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X81 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X85 представляет собой лейцин (L) или валин (V);

X86 представляет собой изолейцин (I) или валин (V);

Z представляет собой полиэтиленгликолевый линкер с молекулярной массой от 2 кДа до 30 кДа;

Fc представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина в форме димера; и

- указывает на наличие ковалентной связи между X" и Z и между Z и Fc;

где конъюгат длительного действия представляет собой конъюгат длительного действия, в котором один конец Z ковалентно связан только с одной полипептидной цепью в димерном Fc-фрагменте, а одна молекула X" ковалентно связана с противоположным концом Z.

Аналог интерлейкина-2, линкер, Fc-фрагмент и конъюгат длительного действия, включающий их, являются такими, как описано выше.

В частности, аналог интерлейкина-2 может включать любую из последовательностей, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 42, 53, 87, 105 и 106, но не ограничивается ими.

Кроме того, в общей формуле 2 к треонину (T), соответствующему X133, может быть добавлена одна или более чем одна аминокислота, или одна или более чем одна аминокислота может быть дополнительно включена на С-конце аналога интерлейкина-2, но этим не ограничивается.

Согласно другому аспекту осуществления настоящего изобретения предложен конъюгат длительного действия, включающий аналог интерлейкина-2.

Аналог интерлейкина-2 и конъюгат длительного действия, включающий его, являются такими, как описано выше.

В частности, способ может включать стадию связывания аналога интерлейкина-2, в который была введена модификация в одну или более чем одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 1, 12, 18, 19, 20, 22, 32, 35, 38, 42, 43, 45, 48, 49, 61, 68, 69, 74, 76, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 96, 125, 126 и 133 в природном интерлейкине-2, с биосовместимым материалом (например с Fc-фрагментом иммуноглобулина) посредством линкера (например непептидного полимера).

Способ получения конъюгата длительного действия по настоящему изобретению может дополнительно включать стадию введения модификации в одну или более чем одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 1, 12, 18, 19, 20, 22, 32, 35, 38, 42, 43, 45, 48, 49, 61, 68, 69, 74, 76, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 96, 125, 126 и 133 в природном интерлейкине-2, но способ не ограничивается конкретными стадиями или их последовательностью, при условии что будет получен конъюгат длительного действия, в котором аналог интерлейкина-2 согласно настоящему изобретению связан с биосовместимым веществом (например Fc-фрагментом иммуноглобулина).

Кроме того, способ получения конъюгата длительного действия по настоящему изобретению может дополнительно включать стадии: (а) культивирования трансформанта, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую аналог интерлейкина-2, для экспрессии аналога интерлейкина-2; и (б) выделения и очистки экспрессированного аналога интерлейкина-2, но не ограничивается этим.

Нуклеиновая кислота, кодирующая аналог интерлейкина-2, может включать или (по существу) состоять из любой нуклеотидной последовательности из SEQ ID NO: 109-212, но не ограничивается этим.

Среда, используемая для культивирования трансформанта по настоящему изобретению, должна соответствовать требованиям к культивированию клеток-хозяев соответствующим образом. Источники углерода, которые могут быть включены в среду для роста клеток-хозяев, могут быть выбраны подходящим образом, исходя из решения специалистов в данной области техники согласно типу получаемых трансформантов, а соответствующие условия культивирования могут быть выбраны для контроля времени культивирования или количества культуры.

Источники углерода, которые можно использовать, могут включать сахара и углеводы (например глюкозу, сахарозу, лактозу, фруктозу, мальтозу, крахмал и

целлюлозу); масла и жиры (например соевое масло, подсолнечное масло, касторовое масло, кокосовое масло и так далее); жирные кислоты (например пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту и линолевую кислоту); спирты (например глицерин и этанол) и органические кислоты (например уксусную кислоту). Эти вещества могут быть использованы по отдельности или в виде смеси.

Источники азота, которые можно использовать, могут включать пептон, дрожжевой экстракт, мясной бульон, солодовый экстракт, кукурузный экстракт, соевую муку и мочевины или неорганические соединения (например сульфат аммония, хлорид аммония, фосфат аммония, карбонат аммония и нитрат аммония). Источники азота также могут быть использованы по отдельности или в виде смеси.

Источники фосфора, которые можно использовать, могут включать дигидрофосфат калия или гидроортофосфат калия или соответствующие им натрийсодержащие соли. Дополнительно культуральная среда может содержать соль металла (например сульфат магния и сульфат железа), необходимую для роста клеток.

Наконец, дополнительно к этим веществам могут быть использованы необходимые для роста вещества (например аминокислоты и витамины). Дополнительно могут быть использованы подходящие предшественники для культуральной среды. Вышеупомянутые исходные вещества могут быть добавлены в периодическом или непрерывном режиме соответствующим для данной культуры образом во время культивирования. Основные соединения (например гидроксид натрия, гидроксид калия и аммиак) или кислотные соединения (например фосфорная кислота и серная кислота) могут быть использованы соответствующим образом для подведения pH культуры. Дополнительно, могут быть использованы пеногасители (например полиглицоловые сложные эфиры жирных кислот) для подавления образования пены. Для поддержания аэробных условий в культуру вводят кислород или кислородсодержащий газ (например воздух).

Культивирование трансформанта по настоящему изобретению обычно проводят при температуре от 20°C до 45°C, в частности от 25°C до 40°C. Дополнительно культивирование продолжают до получения максимального количества требуемого аналога интерлейкина-2, и для этой цели обычно культивирование можно продолжать в течение 10-160 часов.

Как описано выше, если подходящие условия культивирования установлены в зависимости от клетки-хозяина, трансформант по настоящему изобретению будет

продуцировать аналог интерлейкина-2, и в зависимости от состава вектора и свойств клетки-хозяина продуцируемый аналог интерлейкина-2 может секретироваться в цитоплазму клетки-хозяина, в периплазматическое пространство или внеклеточно.

Белки, экспрессируемые в клетке-хозяине или вне ее, могут быть очищены традиционным способом. Примеры способов очистки включают высаливание (например: осаждение сульфатом аммония, осаждение фосфатом натрия и так далее), осаждение растворителем (например осаждение при фракционировании белков с использованием ацетона, этанола и так далее), диализ, гель-фильтрацию, ионный обмен, хроматографию (например хроматографию на колонке с обращенной фазой), ультрафильтрацию и так далее, и их можно использовать по отдельности или в комбинации.

Кроме того, аналог интерлейкина-2, полученный методом пептидного синтеза, может быть связан с биосовместимым материалом (например Fc-фрагментом иммуноглобулина) посредством непептидного полимера. Поскольку последовательности аналогов интерлейкина-2 по настоящему изобретению уже предложены, синтез пептидов может быть осуществлен известным методом пептидного синтеза.

Аналог интерлейкина-2 является таким, как описано выше.

Согласно другому аспекту осуществления настоящего изобретения предложен конъюгат длительного действия, полученный вышеописанным способом.

Если здесь не оговорено особо, описание в подробном описании или формуле изобретения, относящееся к «аналогу интерлейкина-2» по настоящему изобретению или «конъюгату», в котором аналог интерлейкина-2 ковалентно связан с биосовместимым материалом, может быть применено к формам, включающим не только соответствующий аналог интерлейкина-2 или конъюгат, но и соли соответствующего аналога интерлейкина-2 или конъюгата (например фармацевтически приемлемые соли аналога интерлейкина-2) или их сольваты. Соответственно, даже в том случае, когда здесь описывается только «аналог интерлейкина-2» или «конъюгат», это описание может быть в равной степени применимо к его конкретной соли, его конкретному сольвату и конкретному сольвату его конкретной соли. Эти соли могут находиться, например, в форме, в которой используются любые фармацевтически приемлемые соли. Тип соли конкретно не ограничен. Однако желательно, чтобы соль находилась в безопасной и

эффективной для субъекта, например млекопитающего, форме, но тип соли конкретно не ограничен этим.

Термин «фармацевтически приемлемый» относится к материалу, который может быть эффективно использован для требуемой цели, не вызывая избыточной токсичности, раздражения, аллергических реакций и так далее в рамках медицинского суждения.

Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемая соль» включает соли, полученные из фармацевтически приемлемых неорганических кислот, органических кислот или оснований. Примеры подходящих кислот включают соляную кислоту, бромноватую кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, хлорную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, фосфорную кислоту, гликолевую кислоту, молочную кислоту, салициловую кислоту, янтарную кислоту, толуол-*пара*-сульфоновую кислоту, винную кислоту, уксусную кислоту, лимонную кислоту, метансульфоновую кислоту, муравьиную кислоту, бензойную кислоту, малоновую кислоту, нафталин-2-сульфоновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту и так далее. Соли, полученные из подходящих оснований, могут включать соли щелочных металлов (например натрия, калия и так далее), щелочноземельных металлов (например магния и так далее), аммония и так далее.

Кроме того, используемый здесь термин «сольват» относится к комплексу, образованному между аналогом интерлейкина-2 по настоящему изобретению или его солью и молекулой растворителя.

Согласно другому аспекту осуществления настоящего изобретения предложена композиция, содержащая аналог интерлейкина-2 или его конъюгат длительного действия. Аналог интерлейкина-2 и его конъюгат длительного действия являются такими, как описано выше. Композиция по настоящему изобретению может представлять собой фармацевтическую композицию, и в конкретном воплощении она может представлять собой фармацевтическую композицию для использования в предупреждении или лечении рака.

Композиция по настоящему изобретению может содержать аналог интерлейкина-2 или его конъюгат длительного действия и, в частности, может включать фармакологически эффективное количество аналога интерлейкина-2 или его конъюгата длительного действия. Кроме того, она может содержать фармацевтически приемлемый носитель.

В конкретном воплощении композиция по настоящему изобретению может содержать аналог интерлейкина-2, включающий любую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-106; или конъюгат длительного действия, включающий его, и более конкретно, аналог интерлейкина-2, включающий любую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 42, 53, 87, 105 и 106; или конъюгат длительного действия, включающий аналог интерлейкина-2, но не ограничивается этим.

Используемый здесь термин «фармацевтически эффективное количество» может относиться к безопасной вводимой дозе, при которой интерлейкин-2 или его конъюгат проявляет эффект предупреждения или лечения рака, но не демонстрирует токсичности или побочных эффектов у пациентов, и может относиться к вводимой дозе, способной проявлять значительную активность в отношении рецепторов интерлейкина-2, в частности рецепторов бета и/или альфа.

Композиция по настоящему изобретению может проявлять одно или более чем одно из следующих свойств, но не ограничивается ими, при условии что она вызывает повышенный иммунный ответ, противораковый эффект и так далее, основанные на повышенном сродстве связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета:

- (1) высокую экспозицию в крови по сравнению с алдеслейкином;
- (2) высокий уровень ингибирования роста опухоли по сравнению с алдеслейкином;
- (3) высокий уровень ответа Т-клеток памяти по сравнению с алдеслейкином.

Интерлейкин-2, известный как фактор роста Т-клеток, представляет собой белок, участвующий в иммуномодуляции и обладающий активностью в отношении пролиферации Т-клеток, стимуляции В-клеток и секреции γ -интерферона путем воздействия на Т-клетки. На основе иммуномодулирующей активности интерлейкина-2 может быть достигнут эффект предупреждения или лечения рака посредством уничтожения раковых клеток с помощью иммунной системы организма.

В частности, аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению обладает повышенным сродством связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета, которые играют важную роль в передаче сигнала, что приводит к более эффективному противораковому воздействию иммунной системы индивидуума. Кроме того, конъюгат длительного действия, включающий аналог интерлейкина-2, демонстрирует превосходную биодоступность за счет увеличения экспозиции в крови по мере

увеличения продолжительности действия, при этом он имеет повышенное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета и, следовательно, демонстрирует превосходную способность ингибировать рост опухоли и продуцировать Т-клетки памяти, тем самым проявляя эффективное действие в отношении предупреждения или лечения рака.

В частности, конъюгат аналога интерлейкина-2 длительного действия по настоящему изобретению может не обладать сродством связывания или может иметь примерно 0,001-кратное или выше, примерно 0,005-кратное или выше, примерно 0,01-кратное или выше, примерно 0,05-кратное или выше, примерно 0,1-кратное или выше, примерно 0,3-кратное или выше, примерно 0,5-кратное или выше, примерно 0,6-кратное или выше, примерно 0,7-кратное или выше, примерно 0,8-кратное или выше, примерно 0,9-кратное или выше, примерно 1,1-кратное или выше, примерно 1,3-кратное или выше, примерно 1,5-кратное или выше или примерно 1,7-кратное или выше сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 альфа по сравнению со сродством связывания природного интерлейкина-2, алдеслейкина или конъюгата длительного действия, включающего их, с рецепторами интерлейкина-2 альфа, но числовое значение сродства связывания не ограничено, и это значение входит в объем настоящего изобретения, при условии что имеется изменение сродства связывания по сравнению со сродством связывания природного интерлейкина-2 или алдеслейкина.

Кроме того, конъюгат аналога интерлейкина-2 длительного действия по настоящему изобретению может, в частности, иметь примерно 0,1-кратное или выше, примерно 0,3-кратное или выше, примерно 0,5-кратное или выше, примерно 0,7-кратное или выше, примерно 1,0-кратное или выше, примерно 10-кратное или выше, примерно 20-кратное или выше, примерно 30-кратное или выше, примерно 40-кратное или выше, примерно 50-кратное или выше, примерно 60-кратное или выше, примерно 70-кратное или выше, примерно 80-кратное или выше, примерно 90-кратное или выше, примерно 100-кратное или выше, примерно 130-кратное или выше, примерно 150-кратное или выше и примерно 200-кратное или выше сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета по сравнению со сродством связывания природного интерлейкина-2, алдеслейкина или конъюгата длительного действия, включающего их, с рецепторами интерлейкина-2 бета, но числовое значение сродства связывания не ограничено, и это значение входит в объем настоящего изобретения, при условии что имеется изменение

или повышение сродства связывания по сравнению со сродством связывания природного интерлейкина-2 или алдеслейкина.

В настоящем изобретении рак может представлять собой любое заболевание, выбранное из группы, состоящей из колоректального рака, рака печени, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака почек, рака легких, рака кожи, меланомы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря и рака желудка, или может представлять собой метастатический рак, но не ограничивается этим. Он также может включать метастатический почечно-клеточный рак метастатическую меланому.

Использованный здесь термин «предупреждение» относится ко всем видам действий, связанным с ингибированием или задержкой развития рака или опухоли путем введения аналога интерлейкина-2 (например самого аналога интерлейкина-2 или конъюгированной формы длительного действия, в которой с ним связан биосовместимый материал) или композиции, содержащей его.

Использованный здесь термин «лечение» относится ко всем видам действий, связанным с облегчением или положительными изменениями симптомов рака путем введения аналога интерлейкина-2 (например самого аналога интерлейкина-2 или конъюгированной формы длительного действия, в которой с ним связан биосовместимый материал), или композиции, содержащей его.

Применение аналога интерлейкина-2 по настоящему изобретению или его конъюгата длительного действия имеет большие преимущества за счет улучшения качества жизни пациентов вследствие уменьшения количества введений хроническим больным, которые подвергаются ежедневному введению, благодаря резкому увеличению экспозиции в крови, периода полувыведения из крови и продолжительности действия *in vivo*.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель может представлять собой фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, который не встречается в природе.

Использованный здесь термин «фармацевтически приемлемый» относится к количеству, достаточному для оказания терапевтического эффекта без проявления побочных эффектов, и оно может быть легко определено специалистами в данной области техники на основании хорошо известных в области медицины факторов, таких

как вид заболевания, возраст, масса тела, состояние здоровья, пол и чувствительность пациента к лекарственному средству, путь введения, способ введения, частота введения, продолжительность лечения и лекарственное средство, применяемое в комбинации или совместно.

Фармацевтическая композиция, содержащая аналог интерлейкина-2 по настоящему изобретению или его конъюгат длительного действия, может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый эксципиент. Хотя эксципиент конкретно не ограничен, для перорального введения можно использовать связывающее вещество, смазывающее вещество, разрыхлитель, солюбилизатор, диспергирующее вещество, стабилизатор, суспендирующий агент, краситель и ароматизатор; для инъекционных препаратов можно использовать в комбинации буферный агент, консервант, анальгетик, солюбилизатор, изотонический агент и стабилизатор; а для местного введения можно использовать основу, эксципиент, смазывающее вещество, консервант и так далее.

Композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена в виде препарата различных форм в сочетании с вышеупомянутым фармацевтически приемлемым эксципиентом. Например, для перорального введения композиция может быть приготовлена в виде таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и так далее. Для инъекционных препаратов композиция может быть приготовлена в виде однократных ампул или многократных форм. Данная композиция также может быть приготовлена в виде растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул, препаратов с продолжительным высвобождением и так далее.

При этом примеры подходящего для приготовления препарата носителя, эксципиента и разбавителя могут включать лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, аравийскую камедь, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния или минеральное масло. Также данная композиция может дополнительно содержать наполнитель, противосвертывающее средство, смазывающее вещество, увлажнитель, ароматизатор, консервант и так далее.

Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может иметь любой вид препарата, выбранный из группы, состоящей из таблеток, пилюль, порошков, гранул, капсул, суспензий, препаратов для внутреннего применения,

эмульсий, сиропов, стерильных водных растворов, неводных растворителей, лиофилизированных препаратов и суппозиториев.

Также композиция может быть приготовлена в виде препарата стандартной лекарственной формы, подходящей для введения в организм пациента, и конкретно в виде препарата, используемого для введения белковых лекарственных средств, согласно способу, широко используемому в данной области техники, и может быть введена посредством перорального или парентерального пути введения, такого как внутрикожный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, внутрижелудочковый, внутрилегочный, чрескожный, подкожный, внутрибрюшинный, интраназальный, внутрижелудочный, местный, сублингвальный, вагинальный или ректальный путь, с использованием способа введения, широко используемого в данной области техники, но не ограничиваясь этим.

Кроме того, конъюгат может быть использован в комбинации с различными носителями, разрешенными в качестве фармацевтических средств, такими как физиологический раствор или органический растворитель. Для увеличения стабильности или всасываемости в качестве фармацевтических средств могут быть использованы углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстран, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки или другие стабилизаторы.

Согласно другому аспекту осуществления настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения рака, включающий введение аналога интерлейкина-2, его конъюгата длительного действия или фармацевтической композиции, содержащей его, нуждающемуся в этом индивидууму.

Аналог интерлейкина-2 и/или конъюгат аналога интерлейкина-2 длительного действия, композиция, содержащая его, рак, предупреждение и лечение являются такими, как описано выше.

Использованный здесь термин «индивидуум» относится к индивидууму, который болен раком или у которого подозревают наличие рака, и может относиться к млекопитающим, таким как люди, крысы, домашний скот и так далее, но любой индивидуум, которого можно лечить аналогом интерлейкина-2 и/или конъюгатом или композицией, содержащими его, может быть включен без ограничения.

Использованный здесь термин «введение» относится к введению конкретного вещества (например аналога интерлейкина-2 или его конъюгата длительного действия)

пациенту любым подходящим способом. Композиция может быть введена любым общепринятым путем, который обеспечивает доставку композиции в ткани-мишени *in vivo*, например посредством внутрибрюшинного, внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутрикожного, перорального, местного, интраназального, внутрилегочного, ректального введения, но не ограничивается этим.

Способ по настоящему изобретению может включать введение фармацевтической композиции, содержащей аналог интерлейкина-2 или его конъюгат длительного действия, в фармацевтически эффективном количестве. Подходящая общая суточная доза должна быть определена в пределах объема соответствующего медицинского заключения практикующего врача и введена один или несколько раз в разделенных дозах. Для целей настоящего изобретения конкретная терапевтически эффективная доза для любого конкретного пациента предпочтительно может применяться по-разному, в зависимости от различных факторов, хорошо известных в области медицины, включая вид и степень ответов, которые должны быть достигнуты, конкретные композиции, включая возможное использование время от времени с ними других агентов, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания пациента, время и путь введения, скорость выделения композиции, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, используемые в комбинации или одновременно с конкретной композицией, и аналогичные факторы, хорошо известные в области медицины.

В способе по настоящему изобретению дозировку и частоту введения определяют в зависимости от типа лекарственного средства, активного ингредиента, а также ряда сопутствующих факторов, таких как заболевание, подлежащее лечению, путь введения, возраст, пол и масса тела пациента и тяжесть заболевания. В частности, композиция по настоящему изобретению может включать аналог интерлейкина-2 или конъюгат длительного действия, включающий его, в фармацевтически эффективном количестве, но не ограничивается этим.

Содержание аналога интерлейкина-2 или конъюгата длительного действия в фармацевтически эффективном количестве означает уровень, при котором благодаря аналогу интерлейкина-2 или конъюгату длительного действия может быть получена требуемая фармакологическая активность (например предупреждение, положительная динамика или лечение рака), или может дополнительно означать фармацевтически приемлемый уровень, то есть уровень при котором не возникает токсичности или

побочных эффектов у индивидуума, которому осуществляют введение, но не ограничивается этим. Фармацевтически эффективное количество как таковое может быть определено посредством всестороннего рассмотрения частоты введения, пациента, препарата и так далее.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать компонент (активный ингредиент) в количестве от 0,01% до 99% по массе к объему, но конкретно этим не ограничивается.

Общая эффективная доза композиции по настоящему изобретению может быть введена пациенту в виде одной дозы или может быть введена в течение длительного периода времени в многократных дозах согласно протоколу фракционированного лечения. В фармацевтической композиции по настоящему изобретению содержание активного ингредиента может варьировать в зависимости от тяжести заболевания. В частности, предпочтительная общая суточная доза аналога интерлейкина-2 или его конъюгата длительного действия по настоящему изобретению может составлять от примерно 0,0001 мг до 500 мг на 1 кг массы тела пациента. Однако эффективную дозу аналога интерлейкина-2 или его конъюгата определяют с учетом различных факторов, включающих возраст, массу тела, состояние здоровья, пол, режим питания пациента, тяжесть заболевания и скорость выделения, а также путь введения фармацевтической композиции и частоту лечения. Таким образом, специалисты в данной области техники могут легко определить эффективную дозу, подходящую для конкретного использования композиции по настоящему изобретению. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению конкретно не ограничивается типом препарата, а также путем и способом введения, при условии что она демонстрирует эффекты по настоящему изобретению.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может иметь превосходную продолжительность действия и титр *in vivo*, тем самым значительно снижая число и частоту введений фармацевтического препарата по настоящему изобретению. Фармацевтическая композиция может быть введена посредством внутрибрюшинного, внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутрикожного, перорального, местного, интраназального, внутрилегочного или ректального пути, но введение не ограничивается конкретным путем введения, при условии что требуемый фармакологический эффект может быть получен.

В одном примере фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть введена один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели или один раз в месяц или может быть введена однократно или многократно с интервалом времени от 1 недели до 1 месяца, но частота не ограничивается этим.

Согласно другому аспекту реализации настоящего изобретения предложено применение аналога интерлейкина-2, его конъюгата длительного действия или композиции, содержащей его, в изготовлении лекарственных средств для предупреждения или лечения рака.

Аналог интерлейкина-2 и/или его конъюгат длительного действия, или композиция, содержащая его, рак, предупреждение, лечение, путь введения и частота введения являются такими, как описано выше.

Согласно другому аспекту реализации настоящего изобретения предложено применение аналога интерлейкина-2, его конъюгата длительного действия или композиции, содержащей его, в предупреждении или лечении рака.

Аналог интерлейкина-2 и/или его конъюгат длительного действия, или композиция, содержащая его, рак, предупреждение, лечение, путь введения и частота введения являются такими, как описано выше.

При этом, если в контексте настоящего описании не указано иное, такие выражения, как «включать», «включающий», «содержащий» и так далее, означают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но следует понимать, что эти выражения не исключают других целых чисел или набора целых чисел.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно посредством следующих примеров. Однако эти примеры предназначены исключительно для более подробного описания настоящего изобретения, и объем настоящего изобретения не ограничен этими примерами.

Пример 1: получение экспрессионных векторов для природного интерлейкина-2 и аналогов интерлейкина-2

Для получения экспрессионных векторов для природного интерлейкина-2, кодирующих 133 аминокислоты, интерлейкин-2, синтезированный на основе опубликованной последовательности интерлейкина-2 (NM_000586.3; SEQ ID NO: 1), клонировали в вектор pET-22b (Novagen). Дополнительно был получен новый аналог

интерлейкина-2, в котором аминокислота(ы) интерлейкина-2 была(и) модифицирована(ы) с использованием интерлейкина-2 в качестве матрицы.

Условия ПЦР (полимеразная цепная реакция) для амплификации аналога интерлейкина-2 представляли собой 16 циклов процесса, состоящего из 95°C в течение 30 секунд, 55°C в течение 60 секунд и 65°C в течение 6,5 минут. Для подтверждения того, что в нужном положении произошла правильная замена аминокислот(ы), выполняли анализ последовательности продукта мутагенеза, полученного в вышеописанных условиях. В результате было подтверждено, что были обнаружены модификации относительно нативного типа, представленные в Таблице 1 ниже, в требуемых для мутации положениях для каждого аналога интерлейкина-2. Полученные таким образом экспрессионные векторы получили названия pET22b-аналоги интерлейкина-2 с 1 по 105.

В Таблице 1 ниже показаны измененные последовательности аминокислот и названия аналогов для каждой. Для получения этих аналогов интерлейкина-2 синтезировали прямые (F) и обратные (R) праймеры и затем проводили ПЦР для амплификации каждого гена аналога.

В Таблице 1 ниже аналог 1 представляет собой алдеслейкин, и праймеры с номерами 1-204 соответствуют SEQ ID NO: 214-417, соответственно.

Таблица 1. Типы аналогов интерлейкина-2, положения для модификации и их измененные последовательности

Аналог	Положения для модификации и их измененные последовательности	Номер праймера
1	desA1, C125S	197, 198, 201, 202
2	desA1, C125S, S87C	197, 198, 201, 202, 149, 150
3	desA1, C125S, K32C	197, 198, 201, 202, 19, 20
4	desA1, C125S, K35C	197, 198, 201, 202, 21, 22
5	desA1, C125S, K43C	197, 198, 201, 202, 47, 48
6	desA1, C125S, K48C	197, 198, 201, 202, 53, 54
7	desA1, C125S, K49C	197, 198, 201, 202, 55, 56
8	desA1, C125S, K76C	197, 198, 201, 202, 73, 74
9	desA1, C125S, R38A	197, 198, 201, 202, 25, 26
10	desA1, C125S, F42K	197, 198, 201, 202, 35, 36
11	desA1, C125S, F42A	197, 198, 201, 202, 33, 34

12	desA1, C125S, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36
13	desA1, C125S, R38A, F42A	197, 198, 201, 202, 25, 26, 33, 34
14	desA1, C125S, L19Y, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 13, 14, 25, 26, 35, 36
15	desA1, C125S, R38A, F42K, D84E	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 109, 110
16	desA1, C125S, R38A, F42K, N88Q	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 153, 154
17	desA1, C125S, R38A, F42K, V91T	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 165, 166
18	desA1, C125S, R38A, F42K, E61Q	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 59, 60
19	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 97, 98, 167, 168
20	desA1, C125S, R38A, F42K, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 139, 140, 167, 168
21	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 167, 168
22	desA1, C125S, L12V, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 3, 4, 25, 26, 35, 36
23	desA1, C125S, L12F, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 1, 2, 25, 26, 35, 36
24	desA1, C125S, L19V, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 11, 12, 25, 26, 35, 36
25	desA1, C125S, L19F, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 9, 10, 25, 26, 35, 36
26	DesA1, C125S, R38A, F42K, I89F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 157, 158
27	desA1, C125S, R38A, F42K, V91F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 163, 164

28	desA1, C125S, R38A, F42K, L94V	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36
29	desA1, C125S, R38A, F42K, Q126T	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 199, 200
30	desA1, C125S, R38A, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 97, 98, 169, 170
31	desA1, C125S, R38A, D84E	197, 198, 201, 202, 27, 28, 109, 110
32	desA1, C125S, R38A, R81D, D84E, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 95, 96, 169, 170
33	desA1, C125S, R38A, L80F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 77, 78
34	desA1, C125S, R38A, L80F, D84E	197, 198, 201, 202, 27, 28, 77, 78, 109, 110
35	desA1, C125S, R38A, L94F, L96F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 189, 190
36	desA1, C125S, R38A, L94F, L96V	197, 198, 201, 202, 27, 28, 193, 194
37	desA1, C125S, R38A, L94F, L96I	197, 198, 201, 202, 27, 28, 191, 192
38	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, I92F, L94F, L96F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 97, 98, 175, 176
39	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, I92F, L94F, L96V	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 97, 98, 179, 180
40	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, I92F, L94F, L96I	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 97, 98, 177, 178
41	desA1, C125S, L80F, R81D, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 41, 42, 79, 80, 167, 168
42	desA1, C125S, R38A, F42K, R81E, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 103, 104, 169, 170

43	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, I92L	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 183, 184
44	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, D84V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 113, 114, 169, 170
45	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, D84F, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 111, 112, 169, 170
46	desA1, C125S, D20V, R38A, F42K, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 17, 18, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 169, 170
47	desA1, C125S, D20F, R38A, F42K, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 15, 16, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 169, 170
48	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, N88V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 155, 156, 169, 170
49	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, N88F, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 151, 152, 169, 170
50	desA1, C125S, F42K, L80F, R81D, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 79, 80, 139, 140, 169, 170
51	desA1, C125S, E61Q, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 59, 60, 99, 100, 169, 170
52	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 169, 170
53	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, D84E, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 95, 96, 169, 170
54	desA1, C125S, R38A, F42K, Q74H, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 71, 72, 99, 100, 169, 170
55	desA1, C125S, R38A, F42K, Q74H, L80F, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 71, 72, 79, 80, 169, 170

56	desA1, C125S, R38A, F42K, Y45A, Q74H, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 49, 50, 71, 72, 99, 100, 169, 170
57	desA1, C125S, R38A, F42K, Y45A, Q74H, L80F, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 49, 50, 71, 72, 79, 80, 169, 170
58	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, L85A, I86A, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 115, 116, 167, 168
59	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, L85A, I86A, I92Y	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 115, 116, 187, 188
60	desA1, C125S, R38A, F42K, Y45A, L80Y, L85A, I86A, I92Y	197, 198, 201, 202, 27, 28, 35, 36, 41, 42, 51, 52, 93, 94, 115, 116, 187, 188
61	desA1, C125S, R38A, F42K, L80Y, R81D, L85G, I86V, I92Y	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 87, 88, 125, 126, 187, 188
62	desA1, C125S, R38A, F42K, L80W, R81E, L85G, I86A, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 35, 36, 41, 42, 85, 86, 123, 124, 171, 172
63	desA1, C125S, R38A, F42K, L80D, R81E, L85T, I86G, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 75, 76, 133, 134, 167, 168
64	desA1, C125S, R38A, F42K, L80Y, R81N, L85V, I86V, I92Y	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 91, 92, 139, 140, 167, 168
65	desA1, C125S, R38A, F42K, L80Y, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 89, 90, 139, 140, 167, 168
66	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81E, L85F, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 81, 82, 121, 122, 167, 168
67	desA1, C125S, R38A, F42K, L80Y, R81D, L85F, I86V, I92W, E95D	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 87, 88, 121, 122, 185, 186, 195, 196
68	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81E, L85I, I86V, V91E, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 81, 82, 127, 128, 159, 160, 167, 168

69	desA1, C125S, R38A, F42K, L80Y, R81E, L85F, I86L, V91E, I92W, E95D	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 89, 90, 119, 120, 161, 162, 185, 186, 195, 196
70	desA1, C125S, R38A, F42K, L80Y, R81D, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 87, 88, 139, 140, 167, 168
71	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 81, 82, 139, 140, 167, 168
72	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, L85V, I86G, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 135, 136, 167, 168
73	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, L85W, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 141, 142, 167, 168
74	desA1, C125S, R38D, F42K, L80Y, R81D, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 31, 32, 35, 36, 87, 88, 139, 140, 167, 168
75	desA1, C125S, R38A, F42K, Y45A, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 51, 52, 81, 82, 139, 140, 167, 168
76	desA1, C125S, R38A, F42K, K43Q, E61R, L80F, R81D, L85V, I86G, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 39, 40, 61, 62, 79, 80, 135, 136, 167, 168
77	desA1, C125S, R38A, F42K, K43E, E61R, L80F, R81D, L85W, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 37, 38, 61, 62, 79, 80, 143, 144, 167, 168
78	desA1, C125S, K35E, R38A, F42K, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 23, 24, 25, 26, 35, 36, 81, 82, 139, 140, 167, 168
79	desA1, C125S, K35E, R38A, F42K, Q74H, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 23, 24, 25, 26, 35, 36, 71, 72, 81, 82, 139, 140, 167, 168
80	desA1, C125S, K35E, R38A, F42K, Q74H, L80F, R81E, P82G, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 23, 24, 25, 26, 35, 36, 71, 72, 81, 82, 105, 106, 139, 140, 167, 168

81	desA1, C125S, K35E, R38A, F42K, Q74H, L80F, R81E, P82V, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 23, 24, 25, 26, 35, 36, 71, 72, 81, 82, 107, 108, 139, 140, 167, 168
82	desA1, C125S, L18R, Q22E, L80F, R81D, L85E, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 7, 8, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 79, 80, 117, 118, 167, 168
83	desA1, C125S, L18R, L19R, Q22E, L80F, R81D, L85E, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 5, 6, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 79, 80, 117, 118, 167, 168
84	desA1, C125S, L18R, Q22E, L80V, R81D, L85E, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 7, 8, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 83, 84, 117, 118, 167, 168
85	desA1, C125S, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 81, 82, 139, 140, 167, 168
86	desA1, C125S, L18R, Q22E, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 7, 8, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 81, 82, 139, 140, 167, 168
87	desA1, C125S, L18R, L19R, Q22E, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 5, 6, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 81, 82, 139, 140, 167, 168
88	desA1, C125S, E61D, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 57, 58, 81, 82, 139, 140, 167, 168
89	desA1, C125S, R38A, E68Q, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 35, 36, 43, 44, 65, 66, 81, 82, 139, 140, 167, 168
90	desA1, C125S, F42W, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 45, 46, 81, 82, 139, 140, 167, 168

91	desA1, C125S, E61Q, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 59, 60, 81, 82, 139, 140, 167, 168
92	desA1, C125S, L80F, R81E, L85V, I86V, V91T, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 81, 82, 139, 140, 147, 148, 167, 168
93	desA1, C125S, L80F, R81E, D84E, L85V, I86V, V91T, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 81, 82, 101, 102, 139, 140, 167, 168
94	desA1, C125S, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F, L94F, L96F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 81, 82, 139, 140, 173, 174
95	desA1, C125S, V69G, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 67, 68, 81, 82, 139, 140, 167, 168
96	desA1, C125S, V69G, Q74A, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 69, 70, 81, 82, 139, 140, 167, 168
97	desA1, C125S, R38A, L80F, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 35, 36, 41, 42, 79, 80, 167, 168
98	desA1, C125S, R38A, L80F, R81E, L85V, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 35, 36, 41, 42, 81, 82, 137, 138, 167, 168
99	desA1, C125S, R38A, L80F, R81E, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 35, 36, 41, 42, 81, 82, 131, 132, 167, 168
100	desA1, C125S, L80F, R81E, L85Y, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 41, 42, 81, 82, 145, 146, 167, 168
101	desA1, C125S, L80F, R81E, I86A, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 41, 42, 81, 82, 129, 130, 167, 168

102	desA1, C125S, L80F, R81E, L85V, I86V	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 41, 42, 81, 82, 139, 140, 181, 182
103	desA1, C125S, L18R, Q22E, R38A, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 7, 8, 27, 28, 35, 36, 41, 42, 81, 82, 139, 140, 167, 168
104	desA1, C125S, L18R, Q22E, E61D, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 7, 8, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 41, 42, 57, 58, 81, 82, 139, 140, 167, 168
105	desA1, C125S, L18R, Q22E, E68D, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 7, 8, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 41, 42, 63, 64, 81, 82, 139, 140, 167, 168

В Таблице 1 выше «desA1» обозначает делецию аланина, который представляет собой первую аминокислоту в интерлейкине-2.

В Таблице 2 ниже представлены полноразмерные белковые последовательности аналогов интерлейкина-2. Буквы, выделенные жирным шрифтом, в Таблице 2 обозначают положения для модификации.

Таблица 2. Последовательности аналогов интерлейкина-2

Аналог	Белковая последовательность			SEQ ID NO белков	SEQ ID NO нуклеотидов
1	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	2	107
	YKNPKLTRML	TFKFYMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEVL	NLAQSKNFHL	RPRDLISNIN		
	VIVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS TLT				
2	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	3	108
	YKNPKLTRML	TFKFYMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEVL	NLAQSKNFHL	RPRDLICNIN		
	VIVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS TLT				
3	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	4	109
	YCNPKLTRML	TFKFYMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEVL	NLAQSKNFHL	RPRDLISNIN		

	VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT		
4	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPCLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	5	110
5	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFCFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	6	111
6	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPCKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	7	112
7	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKCA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	8	113
8	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSCNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	9	114
9	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	10	115

10	PTSSSTKKT YKNPKLTRML EELKPLEEVL VIVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISNIN TATIVEFLNR	11	116
11	PTSSSTKKT YKNPKLTRML EELKPLEEVL VIVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TAKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISNIN TATIVEFLNR	12	117
12	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VIVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISNIN TATIVEFLNR	13	118
13	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VIVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TAKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISNIN TATIVEFLNR	14	119
14	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VIVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLYD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISNIN TATIVEFLNR	15	120
15	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VIVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRELISNIN TATIVEFLNR	16	121
16	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISQIN	17	122

	VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT		
17	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN TIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	18	123
18	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE Q EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	19	124
19	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL D PRDLISNIN V F VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	20	125
20	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRD V VSNNIN V F VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	21	126
21	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNF H F D PRD V VSNNIN V F VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	22	127
22	PTSSSTKKT QVQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	23	128

23	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VIVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QFQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISNIN TATIVEFLNR	24	129
24	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VIVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLVD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISNIN TATIVEFLNR	25	130
25	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VIVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLFD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISNIN TATIVEFLNR	26	131
26	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VIVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISNIN TATIVEFLNR	27	132
27	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL FIVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISNIN TATIVEFLNR	28	133
28	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VIVVELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISNIN TATIVEFLNR	29	134
29	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISNIN	30	135

	VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSTSIIS TLT		
30	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL D PRDLISNIN VVFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	31	136
31	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL R PRELISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	32	137
32	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL D PRELISNIN VVFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	33	138
33	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF R PRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	34	139
34	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF R PRELISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	35	140
35	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL R PRDLISNIN VIVFEFKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	36	141

36	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VIVFEVKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISNIN TATIVEFLNR	37	142
37	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VIVFEIKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE RPRDLISNIN TATIVEFLNR	38	143
38	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VFVFEFKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE DPRDLISNIN TATIVEFLNR	39	144
39	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VFVFEVKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE DPRDLISNIN TATIVEFLNR	40	145
40	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VFVFEIKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE DPRDLISNIN TATIVEFLNR	41	146
41	PTSSSTKKT YKNPKLTRML EELKPLEEVL VFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE DPRDVVSININ TATIVEFLNR	42	147
42	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDLISNIN	43	148

	VFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT		
43	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRDLISNIN VLVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	44	149
44	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRVLISNIN VFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	45	150
45	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRFLISNIN VFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	46	151
46	PTSSSTKKT QLQLEHLLLV LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRDLISNIN VFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	47	152
47	PTSSSTKKT QLQLEHLLLF LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRDLISNIN VFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	48	153
48	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRDLISVIN VFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	49	154

49	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE DPRDLISFIN TATIVEFLNR	50	155
50	PTSSSTKKT YKNPKLTRML EELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE DPRDVVSININ TATIVEFLNR	51	156
51	PTSSSTKKT YKNPKLTRML QELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE DPRDLISNIN TATIVEFLNR	52	157
52	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE DPRDLISNIN TATIVEFLNR	53	158
53	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE DPRELISNIN TATIVEFLNR	54	159
54	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAHNSKNFHL TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE DPRDLISNIN TATIVEFLNR	55	160
55	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAHNSKNFHF	LQMILNGINN TELKHLQCLE DPRDLISNIN	56	161

	VFVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS	TLT			
56	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	57	162
	YKNPKLTAML	TKKFAMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEVL	NLAH SK NFHL	D PRDLISNIN		
	VFVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS	TLT			
57	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	58	163
	YKNPKLTAML	TKKFAMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEVL	NLAH SK NFHF	D PRDLISNIN		
	VFVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS	TLT			
58	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	59	164
	YKNPKLTAML	TKKFYMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEVL	NLAQ SK NFHF	D PRDAASNIN		
	VFVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS	TLT			
59	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	60	165
	YKNPKLTAML	TKKFYMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEVL	NLAQ SK NFHF	D PRDAASNIN		
	VYVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS	TLT			
60	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	61	166
	YKNPKLTAML	TKKFAMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEVL	NLAQ SK NFHY	RPRDAASNIN		
	VYVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS	TLT			
61	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	62	167
	YKNPKLTAML	TKKFYMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEVL	NLAQ SK NFHY	D PRDGVSININ		
	VYVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS	TLT			

62	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VVFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHW TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDGASNIN TATIVEFLNR	63	168
63	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VVFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHD TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDTGSNIN TATIVEFLNR	64	169
64	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VYVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHY TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE NPRDVVSNIN TATIVEFLNR	65	170
65	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VVFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHY TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDVVSNIN TATIVEFLNR	66	171
66	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VVFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDFVSNIN TATIVEFLNR	67	172
67	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VWVLDLKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHY TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE DPRDFVSNIN TATIVEFLNR	68	173
68	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHF	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDIVSNIN	69	174

	EFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT		
69	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHY EPRDFLSNIN EWVLDLKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	70	175
70	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHY DPRDVVSNIN V FVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	71	176
71	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN V FVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	72	177
72	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDVGSNIN V FVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	73	178
73	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDWVSNIN V FVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	74	179
74	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLT DM L TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHY DPRDVVSNIN V FVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	75	180

75	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFAMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDVVSNIN TATIVEFLNR	76	181
76	PTSSSTKKT YKNPKLTAML RELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKQFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE DPRDVGSNIN TATIVEFLNR	77	182
77	PTSSSTKKT YKNPKLTAML RELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKEFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE DPRDWVSNIN TATIVEFLNR	78	183
78	PTSSSTKKT YKNPELTAML EELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDVVSNIN TATIVEFLNR	79	184
79	PTSSSTKKT YKNPELTAML EELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAHNSKNNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDVVSNIN TATIVEFLNR	80	185
80	PTSSSTKKT YKNPELTAML EELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAHNSKNNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EGRDVVSNIN TATIVEFLNR	81	186
81	PTSSSTKKT YKNPELTAML EELKPLEEVL	QLQLEHLLLD TKKFYMPKKA NLAHNSKNNFHF	LQMILNGINN TELKHLQCLE EVRDVVSNIN	82	187

	VFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT		
82	PTSSSTKKT QLQLEHLRLD LEMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDEVSNIN VFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	83	188
83	PTSSSTKKT QLQLEHLRRD LEMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDEVSNIN VFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	84	189
84	PTSSSTKKT QLQLEHLRLD LEMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHV DPRDEVSNIN VFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	85	190
85	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	86	191
86	PTSSSTKKT QLQLEHLRLD LEMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	87	192
87	PTSSSTKKT QLQLEHLRRD LEMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VFVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	88	193

88	PTSSSTKKT YKNPKLTRML DELKPLEEVL V FV L EL KGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDVVSNIN TATIVEFLNR	89	194
89	PTSSSTKKT YKNPKLT AML EELKPLE Q VL V FV L EL KGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDVVSNIN TATIVEFLNR	90	195
90	PTSSSTKKT YKNPKLTRML EELKPLEEVL V FV L EL KGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TWKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDVVSNIN TATIVEFLNR	91	196
91	PTSSSTKKT YKNPKLTRML Q ELKPLEEVL V FV L EL KGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDVVSNIN TATIVEFLNR	92	197
92	PTSSSTKKT YKNPKLTRML EELKPLEEVL T FVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDVVSNIN TATIVEFLNR	93	198
93	PTSSSTKKT YKNPKLTRML EELKPLEEVL T FVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPREVVSNIN TATIVEFLNR	94	199
94	PTSSSTKKT YKNPKLTRML EELKPLEEVL	QLQLEHLLLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHF	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDVVSNIN	95	200

	VFVFEFKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS	TLT			
95	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	96	201
	YKNPKLTRML	TFKFYMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEGL	NLAQSKNFHF	EPRDVVSININ		
	VFVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS	TLT			
96	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	97	202
	YKNPKLTRML	TFKFYMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEGL	NLAASKNFHF	EPRDVVSININ		
	VFVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS	TLT			
97	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	98	203
	YKNPKLTAML	TFKFYMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEVL	NLAQSKNFHF	DPRDLISININ		
	VFVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS	TLT			
98	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	99	204
	YKNPKLTAML	TFKFYMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEVL	NLAQSKNFHF	EPRDVISININ		
	VFVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS	TLT			
99	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	100	205
	YKNPKLTAML	TFKFYMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEVL	NLAQSKNFHF	EPRDLVSNIN		
	VFVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS	TLT			
100	PTSSSTKKT	QLQLEHLLLD	LQMILNGINN	101	206
	YKNPKLTRML	TFKFYMPKKA	TELKHLQCLE		
	EELKPLEEVL	NLAQSKNFHF	EPRDYVSNIN		
	VFVLELKGSE	TTFMCEYADE	TATIVEFLNR		
	WITFSQSIIS	TLT			

101	PTSSSTKKT YKNPKLTRML EELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDLASNIN TATIVEFLNR	102	207
102	PTSSSTKKT YKNPKLTRML EELKPLEEVL VIVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLLLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LQMILNGINN TELKHLQCLE EPRDVVSNIN TATIVEFLNR	103	208
103	PTSSSTKKT YKNPKLTAML EELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLRLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LEMILNGINN TELKHLQCLE EPRDVVSNIN TATIVEFLNR	104	209
104	PTSSSTKKT YKNPKLTRML DELKPLEEVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLRLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LEMILNGINN TELKHLQCLE EPRDVVSNIN TATIVEFLNR	105	210
105	PTSSSTKKT YKNPKLTRML EELKPLEDVL VFFVLELKGSE WITFSQSIIS TLT	QLQLEHLRLD TFKFYMPKKA NLAQSKNFHF TTFMCEYADE	LEMILNGINN TELKHLQCLE EPRDVVSNIN TATIVEFLNR	106	211

Пример 2: экспрессия аналогов интерлейкина-2

Экспрессию рекомбинантного аналога интерлейкина-2 под контролем промотора T7 проводили с использованием экспрессионных векторов, полученных в Примере 1. Экспрессирующий штамм *E. coli*, *E. coli* BL21DE3 (*E. coli* В F⁺dcm ompT hsdS(г⁺м⁺) gal λ(DE3); Novagen), трансформировали рекомбинантным вектором экспрессии для каждого аналога интерлейкина-2. Что касается способа трансформации, использовали способ, рекомендованный Novagen. Каждую отдельную колонию, трансформированную

каждым рекомбинантным экспрессионным вектором, собирали, инокулировали в 2-кратную среду Лурия (Luria Broth), содержащую ампициллин (50 мкг/мл) и культивировали при 37°C в течение 15 часов. Культуральный раствор каждого рекомбинантного штамма и 2-кратной среды LB, содержащей 30% глицерин, смешивали в соотношении 1:1 (об./об.) и распределяли по криопробиркам по 1 мл смеси и хранили при -150°C. Это использовали как исходный клеточный материал для получения рекомбинантного белка.

Для экспрессии каждого рекомбинантного аналога интерлейкина-2, одну пробирку каждого исходного клеточного материала растворяли, инокулировали в 500 мл 2-кратной LB и культивировали при встряхивании при 37°C в течение 14-16 часов. Когда величина поглощения при 600 нм достигала 4,0 или более, культивирование останавливали, и полученный раствор использовали в качестве посевного культурального раствора. Посевную культуру инокулировали в 1,6 л ферментативной среды, и начальное ферментирование начинали с использованием 5-литрового ферментера (Bioflo-320, NBS, США). Поддерживали следующие условия культивирования: pH 6,70 при температуре 37°C, потоке воздуха 2,0 л/мин (1 об./об/мин), скорости перемешивания 650 об/мин и 30% водного раствора аммиака. Что касается процесса ферментации, когда питательные вещества в культуральной среде истощались, проводили подпитку культуры путем добавления дополнительной среды (питательного раствора). За ростом штамма следили по поглощению, и IPTG (изопропил-бета-галактопиранозид) в конечной концентрации 500 мкМ вводили при значении поглощения 70 или более. Культивирование продолжали далее в течение примерно 23-25 часов после введения IPTG и после завершения культивирования рекомбинантный штамм выделяли путем центрифугирования и хранили при -80°C до использования.

Пример 3: выделение и рефолдинг аналогов интерлейкина-2

Для перевода в растворимую форму аналогов интерлейкина-2 из аналога интерлейкина-2, экспрессируемого в *E. coli*, полученного в Примере 2, клетки разрушали и подвергали рефолдингу. Клеточные осадки, соответствующие 100 мл культуры, суспендировали в 1-200 мл буферного раствора для лизиса (20 мМ Трис-HCl (pH 9,0), 1 мМ EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) (pH 9,0), 0,2 М NaCl, 0,5% Тритон X-100), и рекомбинантные клетки *E. coli* разрушали при 15000 фунт/кв. дюйм (1×10^8 Па) с помощью микрофлюидизатора. После центрифугирования при 13900g в течение 30 минут супернатант отбрасывали и осадок промывали 400 мл первого промывочного

буферного раствора (50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 5 мМ EDTA (рН 9,0)). После центрифугирования в таких же условиях, как описано выше, супернатант отбрасывали и осадок промывали 400 мл второго промывочного буферного раствора (50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 5 мМ EDTA (рН 9,0), 2% Тритон X-100). После центрифугирования в тех же условиях, как описано выше, супернатант отбрасывали и осадок промывали 400 мл третьего промывочного буферного раствора (50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 5 мМ EDTA (рН 9,0), 1% дезоксихолат натрия). После центрифугирования в таких же условиях, как описано выше, супернатант отбрасывали и осадок промывали 400 мл четвертого промывочного буферного раствора (50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 5 мМ EDTA (рН 9,0), 1 М NaCl). Полученный продукт подвергали центрифугированию в таких же условиях, как описано выше, и промывали, и из него получали тельца включения *E. coli*. Осадок после центрифугирования промытых телец включения ресуспендировали в 400 мл растворяющего/восстанавливающего буфера (6 М гуанидин, 100 мМ Трис (рН 8,0), 2 мМ EDTA (рН 9,0), 50 мМ DTT (дитиотреитол)) и перемешивали при 50°C в течение 30 минут. К растворимым/восстановленным аналогам интерлейкина-2 добавляли 100 мл дистиллированной воды для разведения 6 М гуанидина до 4,8 М гуанидина, и затем полученный продукт центрифугировали при 13900 g в течение 30 минут и осадок отбрасывали с получением только раствора. К разведенному раствору дополнительно добавляли 185,7 мл дистиллированной воды и 4,8 М гуанидин разводили до 3,5 М гуанидина, и рН доводили до значения 5,0 с помощью 100% уксусной кислоты. Раствор с подведенным рН перемешивали при комнатной температуре в течение одного часа. Раствор с осажденными примесями центрифугировали при 13900g в течение 30 минут и супернатант отбрасывали, а осадок промывали последним промывочным буферным раствором (3,5 М гуанидин, 20 мМ ацетат натрия (рН 5,0), 5 мМ DTT). Полученный продукт центрифугировали в таких же условиях, как описано выше, с получением осадка. Промытые аналоги интерлейкина-2 растворяли в 400 мл буферного раствора для рефолдинга (6 мМ гуанидин, 100 мМ Трис (рН 8,0), 0,1 мМ CuCl₂). Процесс рефолдинга выполняли путем перемешивания смешанного раствора при 4°C в течение 15-24 часов.

Пример 4: гель-хроматография на колонке

Раствор для рефолдинга аналога интерлейкина-2, полученный в Примере 3, концентрировали до объема менее 1 мл для нанесения на эксклюзионную колонку для очистки. Колонку уравнивали буферным раствором (2 М гуанидин, 100 мМ Трис (рН 8,0)) до введения раствора для рефолдинга и элюировали путем пропускания через

нее буферного раствора после введения раствора для рефолдинга. Поскольку элюируемый образец содержал гуанидин, его заменяли стабилизированным раствором (10 мМ ацетат натрия (pH 4,5), 5% трегалоза) и чистоту определяли посредством ОФ-ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой) и составления пептидных карт. Образец использовали в эксперименте, когда его измеренная чистота достигала 80% или более.

Пример 5: оценка сродства связывания аналогов интерлейкина-2 с рецепторами

Для измерения сродства связывания аналогов интерлейкина-2, полученных в примере 4, с каждым из рецепторов интерлейкина-2 альфа и бета использовали метод поверхностного плазмонного резонанса (BIACORE T200, GE Healthcare). Измеряли сродство связывания полученных аналогов с рецепторами альфа и рецепторами бета, и сродство связывания каждого из полученных аналогов сравнивали со сродством аналога 1 интерлейкина-2 (алдеслейкина).

Сначала антитело против иммуноглобулина человека (Abcam, #ab97221) в количестве примерно 5000 RU (резонансных единиц) иммобилизовали на чипах CM5 (GE Healthcare) путем связывания через аминокгруппу, и в заключение антитело к иммуноглобулину иммобилизовали путем обеспечения возможности связывания рецепторов интерлейкина-2 альфа (SYMANSIS, #4102H) или рецепторов интерлейкина-2 бета (SYMANSIS, #4122H), с каждым из которых был связан Fc-фрагмент иммуноглобулина человека, с каждым антителом к иммуноглобулину путем реакции связывания антиген-антитело. Далее, рекомбинантный аналог интерлейкина-2, полученный, как описано выше, разводили в буфере HBS-P+ (Cytiva, BR100671) с помощью метода двукратных серийных разведений до различных концентраций и помещали на чипы CM5, на которых в конечном счете были иммобилизованы рецепторы интерлейкина-2, для измерения сродства связывания каждого рецептора интерлейкина-2. Измерение сродства связывания состояло в измерениях константы скорости ассоциации (k_a) и константы скорости диссоциации (k_d), где скорость связывания измеряли путем пропускания потока каждого аналога интерлейкина-2 при скорости потока 10 мкл/мин в течение 3 минут, в то время как скорость диссоциации измеряли для каждого рецептора интерлейкина-2 путем пропускания потока только буфера HBS-P+ за тот же самый период времени и при такой же скорости потока. После завершения

измерения сродство связывания с рецепторами оценивали в соответствии с моделью, соответствующей связыванию 1:1, в программе Biaevaluation.

Относительное сродство связывания (K_D) (%) = сродство связывания аналога 1 (алдеслейкина) (K_D) / сродство связывания аналога (K_D) $\times 100$.

В Таблице 3 ниже, выражение «не может быть определено» указывает на то, что соответствующая физическая величина не может быть определена для соответствующего рецептора, поскольку не наблюдалось никакого связывания с рецептором при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса.

Таблица 3. Относительное сродство связывания аналогов интерлейкина-2 с рецепторами интерлейкина-2 альфа или бета по сравнению с аналогом 1 (алдеслейкином)

Рецептор интерлейкина-2	Тестируемое вещество	Относительное сродство связывания (%)
Рецептор альфа	аналог 1	100,0
	аналог 9	74,5
	аналог 12	не может быть определено
	аналог 13	1,1
	аналог 15	не может быть определено
	аналог 16	0,2
	аналог 17	29,6
	аналог 19	не может быть определено
	аналог 20	не может быть определено
	аналог 21	не может быть определено
	аналог 31	5,0
	аналог 34	9,4
	аналог 35	31,7
	аналог 41	121,3
	аналог 52	не может быть определено
	аналог 53	не может быть определено
	аналог 86	71,1
	аналог 88	101,5
	аналог 90	98,4

	аналог 91	7,9
	аналог 92	97,3
	аналог 93	92,8
	аналог 95	10,7
	аналог 96	14,9
	аналог 97	18,8
	аналог 98	7,7
	аналог 99	19,9
	аналог 100	29,1
	аналог 101	24,7
	аналог 102	151,4
	аналог 103	6,1
	аналог 104	122,4
	аналог 105	246,8
Рецептор бета	аналог 01	100,0
	аналог 09	337,4
	аналог 12	166,2
	аналог 13	148,6
	аналог 14	129,7
	аналог 15	98,1
	аналог 16	1261,8
	аналог 17	9,4
	аналог 18	35,3
	аналог 19	455,0
	аналог 20	156,5
	аналог 21	14084,2
	аналог 24	37,9
	аналог 25	21,7
	аналог 31	235,7
	аналог 34	321,8
	аналог 35	232,7

	аналог 41	22776,2
	аналог 52	3821,1
	аналог 53	690,7
	аналог 55	3025,7
	аналог 57	2569,7
	аналог 58	7771,2
	аналог 59	1533,5
	аналог 61	1039,1
	аналог 70	10199,2
	аналог 71	17083,8
	аналог 73	1591,8
	аналог 74	8153,4
	аналог 75	9571,2
	аналог 76	1040,4
	аналог 77	644,4
	аналог 84	710,7
	аналог 86	18745,8
	аналог 88	13856,6
	аналог 90	12776,2
	аналог 91	7361,9
	аналог 92	1510,3
	аналог 93	696,8
	аналог 94	35,5
	аналог 95	17,1
	аналог 96	229,3
	аналог 97	3019,4
	аналог 98	11084,5
	аналог 99	1509,1
	аналог 100	2534,1
	аналог 101	113,1
	аналог 102	4452,0

	аналог 103	13100,0
	аналог 104	25439,8
	аналог 105	26837,8

Как однозначно показано результатами тестов (Фиг. 1 и 2 и Таблица 3), было подтверждено, что аналоги интерлейкина-2 по настоящему изобретению не имели сродства связывания, имели повышенное/пониженное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 альфа по сравнению с аналогом 1 интерлейкина-2 и так далее, таким образом демонстрировали измененное сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 альфа по сравнению с природным интерлейкином-2 или алдеслейкином. Напротив, что касается рецепторов интерлейкина-2 бета, аналоги интерлейкина-2 по настоящему изобретению демонстрировали более высокое сродство связывания вплоть до 100-кратного увеличения по сравнению с природным интерлейкином-2 или алдеслейкином. Приведенные выше результаты подтверждают, что аминокислотная последовательность аналога интерлейкина-2 оказывает влияние на его связывание с рецепторами интерлейкина-2 альфа или бета. Эти результаты подтверждают, что сродство связывания с рецепторами интерлейкина-2 может быть изменено путем замены аминокислоты в определенном положении.

Эти экспериментальные результаты подтверждают, что аналоги интерлейкина-2 по настоящему изобретению обладают измененным сродством связывания с рецепторами интерлейкина-2 альфа и рецепторами интерлейкина-2 бета, и, следовательно, могут быть использованы в разработке различных лекарственных средств на их основе.

Пример 6: реакция связывания аналога интерлейкина-2 и полиэтиленгликолевого линкера (3.4K PEG) и очистка связанного материала аналога интерлейкина-2

Для получения конъюгата длительного действия, в котором аналог интерлейкина-2, полученный в Примере 4, связан с Fc-фрагментом иммуноглобулина, сначала получали связанный материал, в котором аналог интерлейкина-2 был связан с одним из концов полиэтиленгликолевого (PEG) линкера. Для получения связанного материала использовали аналоги интерлейкина-2 #21, #41, #52, #86, #104 и #105, а в качестве PEG-линкера с N-концами аналогов интерлейкина-2 конъюгировали полиэтиленгликоль (ALD(2)3.4K PEG производства NOF, Япония) с молекулярной массой 3,4 кДа, в котором атомы водорода гидроксигрупп на обоих концах были модифицированы

пропилальдегидными группами. Молярное соотношение аналог интерлейкина-2:PEG-линкер составляло от 1:15 до 1:20, и взаимодействие проводили при температуре от 2°C до 10°C в течение 1 часа, при этом концентрация аналогов интерлейкина-2 составляла 1 мг/мл или менее. Здесь взаимодействие проводили в 100 мМ фосфате калия (pH 5,5), в качестве восстановителя добавляли 20 мМ цианоборогидрида натрия (SCB). После замены реакционного раствора на 20 мМ триэтиламинный буфер (pH 8,0) с использованием обессоливающей колонки связанный материал, аналог интерлейкина-2 - 3.4K PEG, был получен путем очистки на колонке Fractogel® EMD TMAE (S) (Merck Millipore) или Source 15Q (Cytiva) с использованием градиентов концентрации триэтиламина (pH 8,0) и хлорида натрия.

Пример 7: получение конъюгата аналога интерлейкина-2 - 3.4K PEG - Fc-фрагмента иммуноглобулина длительного действия

Для получения конъюгата аналога интерлейкина-2 - 3.4K PEG - Fc-фрагмента иммуноглобулина длительного действия молярное соотношение связанного материала, аналога интерлейкина-2 - 3.4K PEG, полученного с использованием способа по Примеру 6, и Fc-фрагмента иммуноглобулина (SEQ ID NO: 438) составляло 1:10, а общая концентрация белка составляла 30 мг/мл для проведения взаимодействия при 2°C-10°C в течение 15-16 часов. Здесь в качестве реакционного раствора использовали 100 мМ фосфат калия (pH 6,0), а в качестве восстановителя добавляли 20 мМ цианоборогидрид натрия. В используемом в этот момент фрагменте иммуноглобулина два мономера, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 423 (состоящую из 221 аминокислоты), образуют гомодимер за счет дисульфидной связи между цистеином, который является 3-й аминокислотой каждого мономера, а каждый из мономеров гомодимера независимо образует внутреннюю дисульфидную связь между цистеинами в положениях 35 и 95 и внутреннюю дисульфидную связь между цистеинами в положениях 141 и 199, соответственно.

Таблица 4. Белковые последовательности Fc-фрагмента иммуноглобулина

Название	Белковая последовательность			SEQ ID NO:
Fc-фрагмент иммуноглобулина	PSCPAPEFLG	GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT	438
	PEVTCVVVDV	SQEDPEVQFN	WYVDGVEVHN	
	AKTKPREEQF	NSTYRVVSVL	TVLHQDWLNG	
	KEYKCKVSNK	GLPSSIEKTI	SKAKGQPREP	
	QVYTLPPSQE	EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	

	IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFFL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSLG K	
--	---	--

После завершения взаимодействия непрореагировавший Fc-фрагмент иммуноглобулина удаляли из реакционного раствора с помощью сорбента Butyl FF (Cytiva) с использованием буфера Бис-Трис (pH 6,5) и хлорида натрия, а реакционный раствор очищали с использованием буферного раствора цитрата натрия (pH 5,5) и сульфата аммония с помощью сорбента Source 15ISO (Cytiva) с получением конъюгата аналога интерлейкина-2 - 3.4K PEG - Fc-фрагмента иммуноглобулина (конъюгат длительного действия), в котором N-конец аналога интерлейкина-2 связан с одним концом PEG-линкера с молекулярной массой 3,4 кДа, а противоположный конец PEG-линкера с молекулярной массой 3,4 кДа связан с азотом N-концевого пролина Fc-фрагмента. Конъюгат длительного действия анализировали с помощью методов ДСН-ПААГ, ОФ-ВЭЖХ, Э-ВЭЖХ (эксклюзионная ВЭЖХ) (Фиг. 1 и 2).

Пример 8: оценка сродства связывания с рецептором интерлейкина-2 конъюгатов аналогов интерлейкина-2

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР, BIACORE T200, GE Healthcare) использовали для измерения относительного сродства связывания с рецепторами конъюгата аналога интерлейкина-2 длительного действия, полученного в Примере 7, и рецепторов интерлейкина-2 альфа и бета.

В частности, меченные биотином альфа- и бета-субъединицы рецепторов человеческого интерлейкина-2 (ACROBiosystems) иммобилизовали на стрептавидиновый биосенсорный чип (SA chip, Cytiva) в количестве примерно 100 RU и 500 RU, и конъюгаты аналогов интерлейкина-2 длительного действия, разведенные в буфере HBS-EP+ (Cytiva, BR100669) с помощью метода двукратных серийных разведений, или алдеслейкин пропускали со скоростью потока 20 мкл/мин. После связывания в течение 3 минут при той же скорости потока пропускали только HBS-EP+ буфер в течение 3 минут, чтобы вызвать диссоциацию конъюгата аналога интерлейкина-2 длительного действия или алдеслейкина из связи с рецепторами интерлейкина-2, и по полученным константе ассоциации и константе диссоциации рассчитывали сродство связывания. Сродство связывания с рецепторами оценивали согласно модели, соответствующей связыванию 1:1, в программе Biaevaluation. У подвергнутых оценке конъюгатов аналогов интерлейкина-2 было подтверждено истинное сродство

связывания с рецептором интерлейкина-2, и, в частности, было подтверждено четкое различие каждого вещества-кандидата в средстве связывания с альфа-субъединицей рецептора интерлейкина-2. При детальном рассмотрении результатов конъюгаты аналогов интерлейкина-2 #21 и #52 не связывались с альфа-субъединицей рецептора интерлейкина-2, а конъюгаты аналогов интерлейкина #41, #86, #104 и #105 показали относительное средство связывания 50,8%, 65,2%, 81,0% и 112,9% по сравнению с алдеслейкином. В случае бета-субъединицы рецептора интерлейкина-2 было подтверждено более высокое средство связывания по сравнению с алдеслейкином у всех конъюгатов аналогов интерлейкина-2, включая конъюгаты аналогов интерлейкина-2 #21 и #52.

В Таблице 5 ниже приведены значения относительного средства связывания (%) конъюгатов аналогов интерлейкина-2 длительного действия, полученные для каждого из рецепторов альфа и бета, по сравнению со средством связывания алдеслейкина. В Таблице 5 соответствующий конъюгат длительного действия обозначен номером аналога интерлейкина-2, входящего в его состав (например, конъюгат аналога интерлейкина-2 длительного действия #21 обозначен как «конъюгат аналога интерлейкина-2 #21»).

Таблица 5. Средство связывания с рецептором интерлейкина-2 конъюгатов аналогов интерлейкина-2

Материал для оценки	Альфа-субъединица рецептора интерлейкина-2	Бета-субъединица рецептора интерлейкина-2
	Относительное средство связывания (%)	Относительное средство связывания (%)
Алдеслейкин	100,0	100,0
конъюгат аналога интерлейкина-2 #21	-	5426,6
конъюгат аналога интерлейкина-2 #41	50,8	5483,0
конъюгат аналога интерлейкина-2 #52	-	2271,8
конъюгат аналога интерлейкина-2 #86	65,2	15393,1
конъюгат аналога интерлейкина-2 #104	81,0	13423,5
конъюгат аналога интерлейкина-2 #105	112,9	13293,8

Пример 9: фармакокинетическая оценка конъюгатов аналогов интерлейкина-2 длительного действия

С использованием аналогов интерлейкина-2, подтвержденных в Примерах 5 и 7, было подтверждено, что лекарственные средства на основе аналогов интерлейкина-2 и конъюгата длительного действия обладают превосходной экспозицией в крови и биодоступностью и связывающей способностью конъюгатов длительного действия, содержащих эти же аналоги, для рецепторов интерлейкина-2.

В частности, авторы настоящего изобретения сравнили и проанализировали фармакокинетику конъюгатов аналогов интерлейкина-2 длительного действия и алдеслейкина в моделях нормальных мышей линий ICR и C57BL/6.

В частности, нормальным мышам контрольной группы, получавшим алдеслейкин, и экспериментальной группы, получавшим конъюгаты аналогов интерлейкина-2 (конъюгат аналога интерлейкина-2 #21, конъюгат аналога интерлейкина-2 #41, конъюгат аналога интерлейкина-2 #52, конъюгат аналога интерлейкина-2 #86, конъюгат аналога интерлейкина-2 #104 и конъюгат аналога интерлейкина-2 #105), их вводили подкожно, внутривенно или внутривентально. В группе, где конъюгаты аналогов интерлейкина-2 вводили подкожно, кровь брали у 3 животных через 1, 4, 8, 24, 48, 72 и 96 часов путем забора крови из ретроорбитального синуса, а в группе, где алдеслейкин вводили внутривенным или внутривентальным путем, кровь брали аналогичным образом у 3 животных через 0,08, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8 и 24 часа. Кровь, взятую в каждой группе, центрифугировали, отделяли сыворотку, а конъюгаты аналогов интерлейкина-2 и алдеслейкин в крови определяли количественно методом ИФА (иммуноферментный анализ) с использованием антител к интерлейкину-2 человека. В результате конъюгаты аналогов интерлейкина-2 показали более высокие уровни экспозиции в крови нормальных мышей линий ICR и C57BL/6 по сравнению с алдеслейкином (Фиг. 3, Таблицы 6 и 7). Относительно значений дозы, AUC и концентрации конъюгатов, приведенных в таблице ниже, количество конъюгата (мг, нг) выражали только исходя из массы, приходящейся на участок аналога интерлейкина-2 во всем конъюгате.

Таблица 6. Фармакокинетика конъюгатов аналогов интерлейкина-2 у мышей линии ICR

	Алдеслейкин	Конъюгат аналога интерлейкина-2 #41	Конъюгат аналога интерлейкина-2 #52
Доза и путь введения	0,8 мг/кг (внутривенная инъекция)	0,5 мг/кг (подкожная инъекция)	0,5 мг/кг (подкожная инъекция)

AUC (нг/мл×ч)	2463,8	43511,2	82579,4
C ₀ или C _{max} (нг/мл)	20183,2	1887,9	2370,5
T _{1/2} (ч)	1,4	8,5	9,0

Таблица 7. Фармакокинетика конъюгатов аналогов интерлейкина-2 у мышей линии C57BL/6

	Алдеслейкин	Конъюгат аналога интерлейкина-2 #21	Конъюгат аналога интерлейкина-2 #86	Конъюгат аналога интерлейкина-2 #104	Конъюгат аналога интерлейкина-2 #105
Доза и путь введения	3,0 мг/кг (внутрибрюшинная инъекция)	0,5 мг/кг (подкожная инъекция)	0,5 мг/кг (подкожная инъекция)	0,5 мг/кг (подкожная инъекция)	0,5 мг/кг (подкожная инъекция)
AUC (нг/мл×ч)	1458,2	375794,2	136373,5	186068,4	107487,6
C ₀ или C _{max} (нг/мл)	1018,6	13319,0	7371,1	9288,3	6302,1

Как можно видеть из приведенных выше результатов, несмотря на введение посредством подкожного пути, конъюгаты аналогов интерлейкина-2 по настоящему изобретению демонстрировали более высокое распределение в крови по сравнению с алдеслейкином, вводимым посредством внутривенной или внутрибрюшинной инъекции. Эти результаты подтверждают, что при введении лекарственного средства большее количество конъюгата аналога интерлейкина-2 попадает в кровь даже при введении меньшего количества по сравнению с человеческим рекомбинантным интерлейкином-2, что может обеспечить удобство введения.

Пример 10: оценка противоопухолевой эффективности конъюгатов аналогов интерлейкина-2 длительного действия

Для изучения терапевтической эффективности конъюгатов аналогов интерлейкина-2 оценивали размер опухоли и смертность индивидуумов после каждого введения конъюгата аналога интерлейкина-2 #21, конъюгата аналога интерлейкина-2 #41 и аналога интерлейкина-2 #52, а также алдеслейкина в качестве контрольного материала в сингенную мышиную модель опухоли толстой кишки CT26.

В частности, клетки СТ26 (ATCC), выращенные в колбе для культивирования клеток, подкожно вводили в лапы мышей BALB/с, и через несколько суток, когда опухоли наблюдали невооруженным глазом, в каждую группу распределяли по 7 мышей так, чтобы опухоли были одинаковыми по размеру. Каждой группе подкожно периодически вводили по 0,5 мг/кг конъюгата аналога интерлейкина-2 #21, конъюгата аналога интерлейкина-2 #41 и конъюгата аналога интерлейкина-2 #52 один раз в неделю в общей сложности два раза. В данном случае доза конъюгата длительного действия относится только к массе участка аналога интерлейкина-2 в соответствующем конъюгате. В группе, получавшей алдеслейкин, 3,0 мг/кг пролейкина (Novartis) вводили один раз в сутки посредством внутрибрюшинного пути в течение 5 суток подряд, а после периода покоя в течение 2 суток проводили дополнительное введение в течение 5 суток по той же схеме.

Массу тела и смертность индивидуумов наблюдали в течение 32 суток с момента первого введения препарата, и на основании полученных результатов была подтверждена высокая противоопухолевая эффективность во всех группах, получавших конъюгаты аналогов интерлейкина-2. В частности, в группе, получавшей конъюгат аналога интерлейкина-2 #41, у всех индивидуумов наблюдали полную ремиссию. Напротив, в группе, получавшей алдеслейкин, 2 из 7 мышей погибли, и только 2 мыши продемонстрировали полную ремиссию. Это объясняется тем, что конъюгат аналога интерлейкина-2 по настоящему изобретению прочно связывается с бета-субъединицей рецептора интерлейкина-2 человека за счет изменения аминокислотной последовательности и, таким образом, проявляет превосходный противоопухолевый эффект (Фиг. 4). Кроме того, структура конъюгата длительного действия, с которой связан Fc-фрагмент иммуноглобулина человека, позволяет за счет высокой экспозиции в крови увеличить интервал дозирования, тем самым подтверждая, что можно обеспечить удобство введения препарата для пациентов и медицинского персонала путем замены традиционной инъекционной терапии на подкожный способ введения.

Пример 11: оценка ответов Т-клеток памяти при повторной экспозиции опухолей

После оценки противоопухолевой эффективности в Примере 10 была проведена оценка ответа Т-клеток памяти на повторную экспозицию опухолей. В частности, индивидуумам, у которых после завершения оценки противоопухолевой эффективности была подтверждена полная ремиссия, подкожно вводили клетки СТ26 таким же образом,

как и при первой экспозиции, на 42 и 70 сутки после первого введения лекарственного средства, и подвергали повторной экспозиции для наблюдения за ростом опухоли. На 4 и 7 сутки после второй повторной экспозиции количество Т-клеток памяти из селезенки мышей анализировали с помощью прибора FACS Canto II (Becton Dickinson).

В результате во всех группах, получавших лекарственное средство, за исключением группы отрицательного контроля, рост опухоли подавлялся после повторной экспозиции, а в селезенке наблюдалось значительное увеличение количества Т-клеток памяти (Фиг. 5). В заключение следует отметить, что конъюгаты аналогов интерлейкина-2 по настоящему изобретению индуцировали ответ иммунной памяти в сингенной мышинной модели опухоли толстой кишки СТ26 с помощью только одного агента, и, таким образом, сильная противоопухолевая эффективность сохранялась не только при первой экспозиции опухоли, но и при повторной экспозиции.

Пример 12: оценка противоопухолевой эффективности конъюгата аналога интерлейкина-2 длительного действия при злокачественной меланоме

Для оценки противоопухолевой эффективности конъюгата аналога интерлейкина-2 по настоящему изобретению конъюгат аналога интерлейкина-2 #86 и алдеслейкин в качестве контрольного материала вводили в сингенную мышиную модель меланомы B16F10 для оценки размера опухоли и выживаемости индивидуумов.

В частности, клетки B16F10 (ATCC), выращенные в колбе для культивирования клеток, подкожно вводили в бедро мышам C57BL/6, и через несколько суток, когда опухоли наблюдали невооруженным глазом, в каждую группу распределяли по 9 мышей так, чтобы опухоли были одинаковыми по размеру. Из конъюгатов длительного действия, исходя из массы участка аналога интерлейкина-2, от 0,08 мг/кг до 10 мг/кг конъюгата аналога интерлейкина-2 #86 вводили подкожно один раз в неделю, в общей сложности 4 раза. Кроме того, в контрольной группе, получавшей алдеслейкин, 3,0 мг/кг пролейкина (Novartis) вводили один раз в сутки посредством внутрибрюшинного пути в течение 5 суток подряд с последующим периодом покоя в течение 2 суток, и введение повторяли в общей сложности 4 раза.

На 15-е сутки от первых суток введения наблюдали размер опухоли в каждой группе (Фиг. 6A) и выживаемость каждого индивидуума в течение 60 суток (Фиг. 6B). В результате было подтверждено, что в группе, получавшей конъюгат аналога интерлейкина-2 #86 по настоящему изобретению, размер опухоли был меньше, а выживаемость индивидуума выше по сравнению с группой, получавшей алдеслейкин, и

подтверждена дозозависимая противоопухолевая эффективность конъюгата длительного действия по настоящему изобретению. В частности, в группе, получавшей конъюгат аналога интерлейкина-2 #86 в дозе 4,0 мг/кг и более в неделю, у некоторых индивидуумов наблюдали полную ремиссию с полным устранением опухоли. Напротив, в группе, где алдеслейкин вводили в дозе 3,0 мг/кг последовательно в течение 5 суток, полная ремиссия не обнаружена ни у одного индивидуума.

Это означает, что конъюгаты аналогов интерлейкина-2 по настоящему изобретению были разработаны таким образом, что они обладают свойством связывания с бета-субъединицей рецептора интерлейкина-2 человека, которое является относительно сильным по сравнению с альдеслейкином, и, таким образом, могут демонстрировать превосходный противоопухолевый эффект. Кроме того, они эффективно контролируют чрезмерный иммунный ответ за счет связывания с альфа-субъединицей рецептора интерлейкина-2 человека, что не вызывает нежелательных побочных эффектов, так что побочных эффектов не наблюдалось в той степени, чтобы прекращать прием препарата даже в группе с высокой дозировкой 10 мг/кг или более, исходя из массы участка аналога интерлейкина-2 в конъюгатах длительного действия.

Описанные выше результаты экспериментов показывают, что конъюгат длительного действия, содержащий аналог интерлейкина-2, в котором в нативный интерлейкин-2 по настоящему изобретению введена аминокислотная мутация, обладает измененным сродством связывания с рецептором интерлейкина-2 альфа и сродством связывания с рецептором интерлейкина-2 бета, что подтверждает возможность его использования для разработки различных лекарственных средств с использованием конъюгата, в частности для разработки противоопухолевых лекарственных средств.

На основании вышеизложенного описания специалисту в данной области техники будет понятно, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без изменения его технических идей или существенных характеристик. В этом отношении следует понимать, что приведенное выше воплощение не является ограничивающим, а предназначено для иллюстративных целей во всех аспектах. Объем изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения, а не предшествующим ей описанием, и поэтому все изменения и модификации, которые соответствуют пунктам формулы изобретения или эквивалентам этих пунктов, охватываются формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат длительного действия, содержащий аналог интерлейкина-2, химической формулы 1, представленной ниже:

Химическая формула 1



где X представляет собой аналог интерлейкина-2, обладающий повышенным сродством связывания с рецепторами интерлейкина-2 бета по сравнению с алдеслейкином;

L представляет собой полиэтиленгликолевый линкер;

a представляет собой 0 или натуральное число, при условии что, когда a равен 2 или более, тогда каждый L независим от другого;

F представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина в форме димера; и

- указывает на наличие ковалентной связи между X и L и между L и F;

где аналог интерлейкина-2 включает последовательность, в которой одна или более чем одна аминокислота, соответствующая аминокислоте в положениях 1, 12, 18, 19, 20, 22, 32, 35, 38, 42, 43, 45, 48, 49, 61, 68, 69, 74, 76, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 94, 95, 96, 125, 126 и 133 в природном интерлейкине-2, модифицирована.

2. Конъюгат длительного действия по п. 1, где аналог интерлейкина-2 обладает измененным сродством связывания с рецепторами интерлейкина-2 альфа по сравнению с алдеслейкином.

3. Конъюгат длительного действия по п. 1, где одна или более чем одна аминокислота добавлена к аминокислоте, соответствующей положению 133.

4. Конъюгат длительного действия по п. 1, где аналог интерлейкина-2 является таким, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислота в положении 125 заменена на другую аминокислоту в аналоге природного интерлейкина-2.

5. Конъюгат длительного действия по п. 4, где аналог интерлейкина-2 дополнительно содержит от 1 до 10 аминокислотных замен.

6. Конъюгат длительного действия по п. 5, где аналог интерлейкина-2 содержит замены, в которых одна или более чем одна аминокислота в положениях 18, 19, 20, 22, 38, 42, 43, 45, 61, 68, 69, 74, 80, 81, 84, 85, 86, 88, 89, 91, 92, 94 и 96 дополнительно заменена на другую аминокислоту.

7. Конъюгат длительного действия по п. 5, где аналог интерлейкина-2 содержит замены, в которых одна или более чем одна аминокислота в положениях 18, 22, 38, 42, 61, 68, 80, 81, 85, 86 и 92 дополнительно заменена на другую аминокислоту.

8. Конъюгат длительного действия по п. 1, где аналог интерлейкина-2 представляет собой любой из следующих аналогов:

(a) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 32 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(b) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 35 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(c) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 38 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(d) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 42 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(e) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 43 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(f) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 48 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(g) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 49 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(h) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125 и 76 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(i) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 81, 92, 94 и 96 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bm) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81, 85, 86, 91, 92 и 95 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bn) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 35, 38, 42, 74, 80, 81, 82, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2;

(bo) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2; и

(bp) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 85 и 86 заменены на другие аминокислоты по сравнению с природным интерлейкином-2.

9. Конъюгат длительного действия по п. 8, где аминокислотная замена представляет собой любую замену, выбранную из группы, состоящей из следующих аминокислотных замен:

(a) замена, при которой аминокислота в положении 12 заменена на валин или фенилаланин;

(b) замена, при которой аминокислота в положении 18 заменена на аргинин;

(c) замена, при которой аминокислота в положении 19 заменена на тирозин, валин, фенилаланин или аргинин;

(d) замена, при которой аминокислота в положении 20 заменена на валин или фенилаланин;

(e) замена, при которой аминокислота в положении 22 заменена на глутаминовую кислоту;

(f) замена, при которой аминокислота в положении 32 заменена на цистеин;

(g) замена, при которой аминокислота в положении 35 заменена на цистеин или глутаминовую кислоту;

(h) замена, при которой аминокислота в положении 38 заменена на аланин или аспарагиновую кислоту;

(i) замена, при которой аминокислота в положении 42 заменена на лизин, аланин или триптофан;

(j) замена, при которой аминокислота в положении 43 заменена на цистеин, глутаминовую кислоту или глутамин;

- (k) замена, при которой аминокислота в положении 45 заменена на аланин;
- (l) замена, при которой аминокислота в положении 48 заменена на цистеин;
- (m) замена, при которой аминокислота в положении 49 заменена на цистеин;
- (n) замена, при которой аминокислота в положении 61 заменена на глутамин, аргинин или аспарагиновую кислоту;
- (o) замена, при которой аминокислота в положении 68 заменена на аспарагиновую кислоту или глутамин;
- (p) замена, при которой аминокислота в положении 69 заменена на глицин;
- (q) замена, при которой аминокислота в положении 74 заменена на гистидин или аланин;
- (r) замена, при которой аминокислота в положении 76 заменена на цистеин;
- (s) замена, при которой аминокислота в положении 80 заменена на фенилаланин, тирозин, валин, аспарагиновую кислоту или триптофан;
- (t) замена, при которой аминокислота в положении 81 заменена на аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту или аспарагин;
- (u) замена, при которой аминокислота в положении 82 заменена на глицин или валин;
- (v) замена, при которой аминокислота в положении 84 заменена на глутаминовую кислоту, валин или фенилаланин;
- (w) замена, при которой аминокислота в положении 85 заменена на валин, аланин, глицин, триптофан, тирозин, треонин, изолейцин, глутаминовую кислоту или фенилаланин;
- (x) замена, при которой аминокислота в положении 86 заменена на валин, аланин, глицин или лейцин;
- (y) замена, при которой аминокислота в положении 87 заменена на цистеин;
- (z) замена, при которой аминокислота в положении 88 заменена на глутамин, валин или фенилаланин;
- (aa) замена, при которой аминокислота в положении 89 заменена на фенилаланин;
- (ab) замена, при которой аминокислота в положении 91 заменена на треонин, фенилаланин или глутаминовую кислоту;
- (ac) замена, при которой аминокислота в положении 92 заменена на фенилаланин, лейцин, тирозин или триптофан;

(ad) замена, при которой аминокислота в положении 94 заменена на фенилаланин или валин;

(ae) замена, при которой аминокислота в положении 95 заменена на аспарагиновую кислоту;

(af) замена, при которой аминокислота в положении 96 заменена на фенилаланин, валин или изолейцин;

(ag) замена, при которой аминокислота в положении 125 заменена на серин; и

(ah) замена, при которой аминокислота в положении 126 заменена на треонин.

10. Конъюгат длительного действия по п. 8, где аналог интерлейкина-2 представляет собой любой из следующих аналогов:

(a) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81 и 92 заменены на другие аминокислоты в аналоге природного интерлейкина-2;

(b) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты в аналоге природного интерлейкина-2;

(c) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты в аналоге природного интерлейкина-2;

(d) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 38, 42, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты в аналоге природного интерлейкина-2;

(e) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 61, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты в аналоге природного интерлейкина-2; и

(f) аналог интерлейкина-2, в котором аминокислота в положении 1 удалена, а аминокислоты в положениях 125, 18, 22, 68, 80, 81, 85, 86 и 92 заменены на другие аминокислоты в аналоге природного интерлейкина-2.

11. Конъюгат длительного действия по п. 10, где аминокислотная замена представляет собой любую замену, выбранную из группы, состоящей из следующих аминокислотных замен:

(a) замена, при которой аминокислота в положении 18 заменена на аргинин;

(b) замена, при которой аминокислота в положении 22 заменена на глутаминовую кислоту;

(c) замена, при которой аминокислота в положении 38 заменена на аланин;

(d) замена, при которой аминокислота в положении 42 заменена на лизин;

(e) замена, при которой аминокислота в положении 61 заменена на аспарагиновую кислоту;

(f) замена, при которой аминокислота в положении 68 заменена на аспарагиновую кислоту;

(g) замена, при которой аминокислота в положении 80 заменена на фенилаланин;

(h) замена, при которой аминокислота в положении 81 заменена на глутаминовую кислоту;

(i) замена, при которой аминокислота в положении 85 заменена на валин;

(j) замена, при которой аминокислота в положении 86 заменена на валин;

(k) замена, при которой аминокислота в положении 92 заменена на фенилаланин; и

(l) замена, при которой аминокислота в положении 125 заменена на серин.

12. Конъюгат длительного действия по п. 1, где Fc-фрагмент иммуноглобулина представляет собой фрагмент, который получен из IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, или их комбинации, или их гибрида.

13. Конъюгат длительного действия по п. 1, где Fc-фрагмент иммуноглобулина представляет собой Fc-фрагмент IgG4.

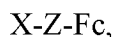
14. Конъюгат длительного действия по п. 1, где Fc-фрагмент иммуноглобулина является негликозилированным.

15. Конъюгат длительного действия по п. 1, где L содержит повторяющиеся звенья этиленгликоля, а молекулярная масса группировки из повторяющихся звеньев этиленгликоля находится в диапазоне от 1 кДа до 100 кДа.

16. Конъюгат длительного действия по п. 1, где конъюгат длительного действия представляет собой конъюгат длительного действия, в котором одна молекула X ковалентно связана с одним из Fc-фрагментов димерного Fc-фрагмента иммуноглобулина посредством полиэтиленгликолевого линкера.

17. Конъюгат длительного действия аналога интерлейкина-2 химической формулы 2, представленной ниже:

Химическая формула 2



где X представляет собой аналог интерлейкина-2, содержащий любую из полипептидных последовательностей, выбранных из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3-106;

Z представляет собой полиэтиленгликолевый линкер с молекулярной массой от 2 кДа до 30 кДа;

Fc представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина в форме димера; и

- указывает на наличие ковалентной связи между X и Z и между Z и Fc;

где конъюгат длительного действия представляет собой конъюгат длительного действия, в котором один конец Z ковалентно связан только с одной полипептидной цепью в димерном Fc-фрагменте, а одна молекула X ковалентно связана с противоположным концом Z.

18. Конъюгат длительного действия по п. 17, где аналог интерлейкина-2 содержит любую из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 56, 58, 59, 60, 62, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 85, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 101, 103, 104, 105 и 106.

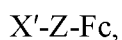
19. Конъюгат длительного действия по п. 17, где аналог интерлейкина-2 содержит любую из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 13, 14, 16, 17, 20, 21, 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 98, 99, 100, 101, 103, 104 и 105.

20. Конъюгат длительного действия по п. 17, где аналог интерлейкина-2 содержит любую из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 42, 53, 87, 105 и 106.

21. Конъюгат длительного действия по п. 17, где аналог интерлейкина-2 дополнительно содержит одну или более чем одну аминокислоту на С-конце.

22. Конъюгат длительного действия аналога интерлейкина-2 химической формулы 3, представленной ниже:

Химическая формула 3



где X' представляет собой аналог интерлейкина-2, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 1, представленной ниже:

Общая формула 1

X1-P-T-S-S-S-T-K-K-T-Q-L-Q-L-E-H-L-X18-X19-D-L-X22-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-X38-M-L-T-X42-X43-F-X45-M-P-K-K-A-T-E-L-K-H-L-Q-C-L-E-X61-E-L-K-P-L-E-X68-V-L-N-L-A-X74-S-K-N-F-H-X80-X81-P-R-X84-X85-X86-S-N-I-N-X91-X92-V-X94-E-X96-K-G-S-E-T-T-F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-S-Q-S-I-I-S-T-L-T (общая формула 1, SEQ ID NO: 212),

где в общей формуле 1 выше:

X1 представляет собой делецию;

X18 представляет собой лейцин (L) или аргинин (R);

X19 представляет собой лейцин (L) или тирозин (Y);

X22 представляет собой глутаминовую кислоту (E) или глутамин (Q);

X38 представляет собой аланин (A), аспарагиновую кислоту (D) или аргинин (R);

X42 представляет собой аланин (A), фенилаланин (F), лизин (K) или триптофан (W);

X43 представляет собой глутаминовую кислоту (E), лизин (K) или глутамин (Q);

X45 представляет собой аланин (A) или тирозин (Y);

X61 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), глутамин (Q) или аргинин (R);

X68 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X74 представляет собой гистидин (H) или глутамин (Q);

X80 представляет собой фенилаланин (F), лейцин (L), валин (V) или тирозин (Y);

X81 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E) или аргинин (R);

X84 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X85 представляет собой аланин (A), глутаминовую кислоту (E), глицин (G), лейцин (L), валин (V), триптофан (W) или тирозин (Y);

X86 представляет собой аланин (A), глицин (G), изолейцин (I) или валин (V);

X91 представляет собой треонин (T) или валин (V);

X92 представляет собой фенилаланин (F), изолейцин (I) или тирозин (Y);

X94 представляет собой фенилаланин (F) или лейцин (L);

X96 представляет собой фенилаланин (F) или лейцин (L);

Z представляет собой полиэтиленгликолевый линкер с молекулярной массой от 2 кДа до 30 кДа;

Fc представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина в форме димера; и

- указывает на наличие ковалентной связи между X' и Z и между Z и Fc;

где конъюгат длительного действия представляет собой конъюгат длительного действия, в котором один конец Z ковалентно связан только с одной полипептидной цепью в димерном Fc-фрагменте, а одна молекула X' ковалентно связана с противоположным концом Z.

23. Конъюгат длительного действия по п. 22, где

в общей формуле 1, представленной выше,

X43 представляет собой лизин (K);

X45 представляет собой тирозин (Y);

X61 представляет собой аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E) или глутамин (Q);

X68 представляет собой глутаминовую кислоту (E);

X74 представляет собой глутамин (Q);

X80 представляет собой фенилаланин (F) или лейцин (L);

X85 представляет собой лейцин (L), валин (V) или тирозин (Y);

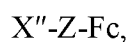
X86 представляет собой изолейцин (I) или валин (V); и

X92 представляет собой фенилаланин (F) или изолейцин (I).

24. Конъюгат длительного действия по п. 22, где аналог интерлейкина-2 дополнительно содержит одну или более чем одну аминокислоту на C-конце.

25. Конъюгат длительного действия аналога интерлейкина-2 химической формулы 4, представленной ниже:

Химическая формула 4



где X'' представляет собой аналог интерлейкина-2, содержащий аминокислотную последовательность общей формулы 2, представленной ниже:

Общая формула 2

X1-P-T-S-S-S-T-K-K-T-Q-L-Q-L-E-H-L-X18-L-D-L-X22-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-X38-M-L-T-X42-K-F-Y-M-P-K-K-A-T-E-L-K-H-L-Q-C-L-E-X61-E-L-K-P-L-E-X68-V-L-N-L-A-Q-S-K-N-F-H-F-X81-P-R-D-X85-X86-

S-N-I-N-V-F-V-L-E-L-K-G-S-E-T-T-F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-S-Q-S-I-I-S-T-L-T (общая формула 2, SEQ ID NO: 213),

X1 представляет собой делецию;

X18 представляет собой лейцин (L) или аргинин (R);

X22 представляет собой глутаминовую кислоту (E) или глутамин (Q);

X38 представляет собой аланин (A) или аргинин (R);

X42 представляет собой фенилаланин (F) или лизин (K);

X61 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X68 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X81 представляет собой аспарагиновую кислоту (D) или глутаминовую кислоту (E);

X85 представляет собой лейцин (L) или валин (V);

X86 представляет собой изолейцин (I) или валин (V);

Z представляет собой полиэтиленгликолевый линкер с молекулярной массой от 2 кДа до 30 кДа;

Fc представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина в форме димера; и

- указывает на наличие ковалентной связи между X" и Z и между Z и Fc;

где конъюгат длительного действия представляет собой конъюгат длительного действия, в котором один конец Z ковалентно связан только с одной полипептидной цепью в димерном Fc-фрагменте, а одна молекула X" ковалентно связана с противоположным концом Z.

26. Конъюгат длительного действия по п. 25, где аналог интерлейкина-2 содержит любую из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 42, 53, 87, 105 и 106.

27. Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения рака, содержащая фармацевтически эффективное количество конъюгата длительного действия по п. 1 или 17 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

28. Фармацевтическая композиция по п. 27, где аналог интерлейкина-2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22, 42, 53, 87, 105 и 106.

29. Фармацевтическая композиция по п. 27, где рак выбран из группы, состоящей из метастатического почечно-клеточного рака, метастатической меланомы,

колоректального рака, рака печени, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака почек, колоректального рака, рака легких, рака кожи, меланомы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря и рака желудка.

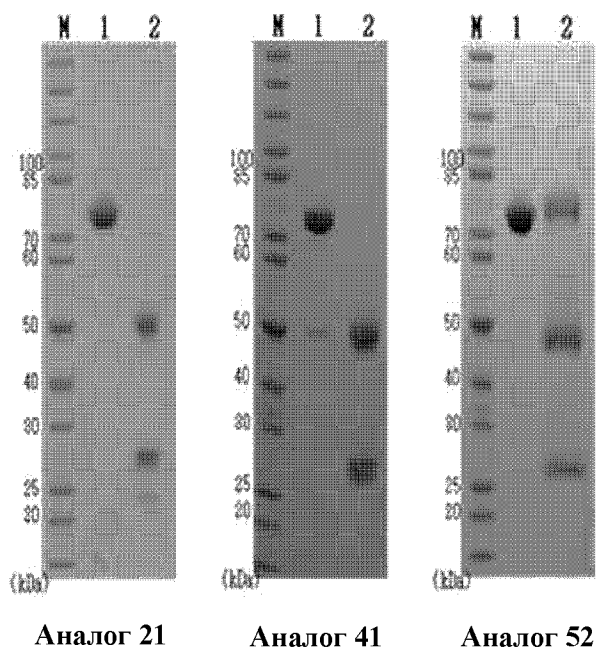
30. Фармацевтическая композиция по п. 27, где фармацевтическая композиция демонстрирует одно или более чем одно из следующих свойств:

- (1) высокая экспозиция в крови по сравнению с алдеслейкином,
- (2) высокая ингибиторная активность в отношении роста опухоли по сравнению с алдеслейкином,
- (3) высокий уровень ответа Т-клеток памяти по сравнению с алдеслейкином.

31. Фармацевтическая композиция по п. 27, вводимая посредством внутрибрюшинного, внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутрикожного, перорального, местного, интраназального, внутрилегочного или ректального пути.

32. Фармацевтическая композиция по п. 27, вводимая с интервалом от 1 недели до 1 месяца.

Фиг. 1

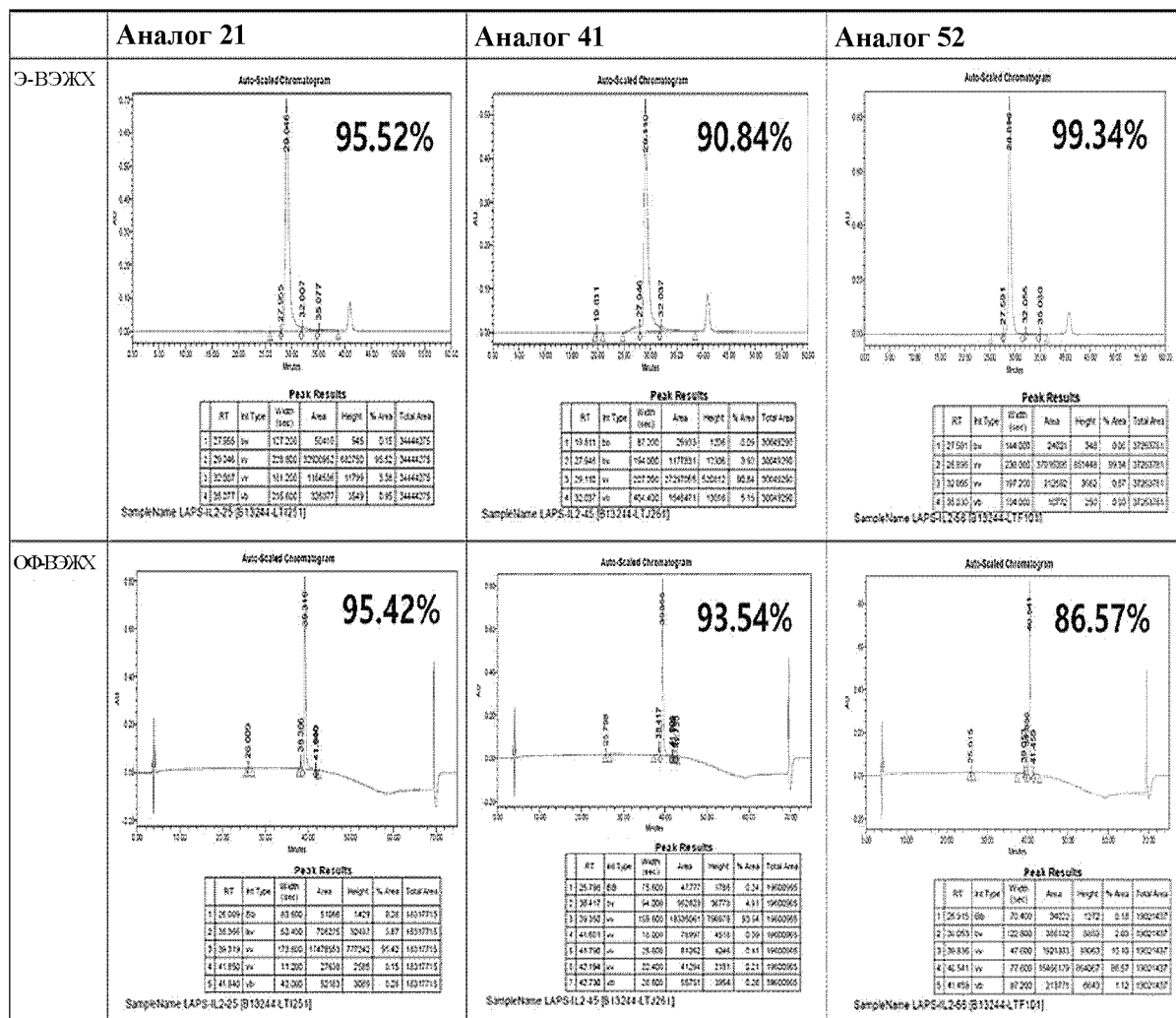


M: Маркер (Unstained Ladder Thermo Fisher, 26614)

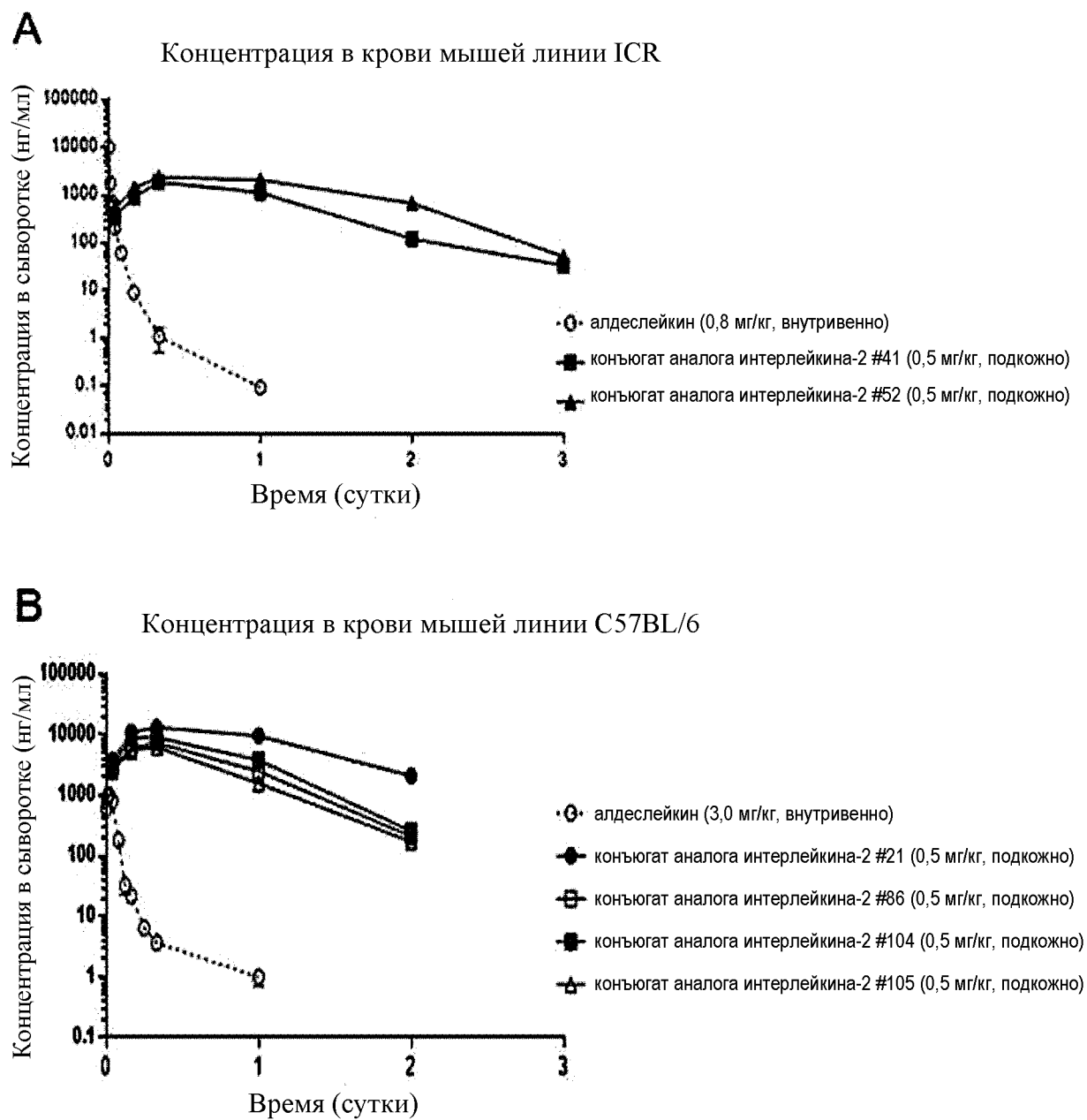
1: Невосстановленный конъюгат аналога интерлейкина-2 - 3.4K PEG - FC-фрагмента

2: Восстановленный конъюгат аналога интерлейкина-2 - 3.4K PEG - FC-фрагмента

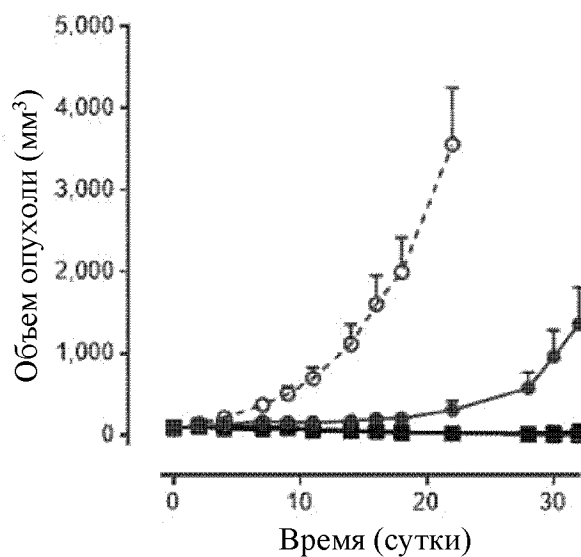
Фиг. 2



Фиг. 3

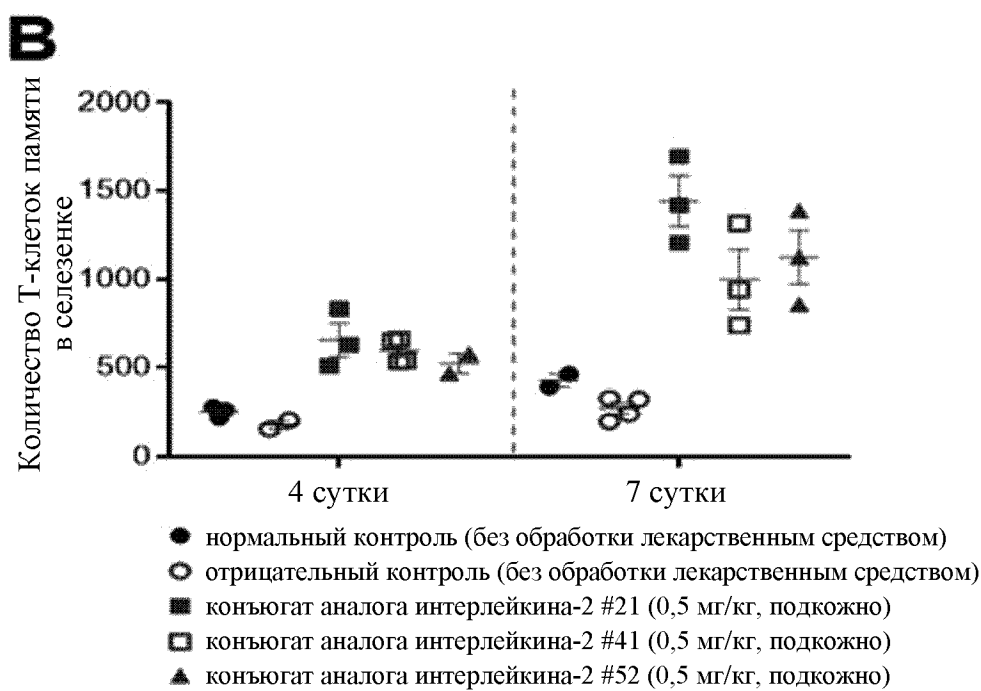
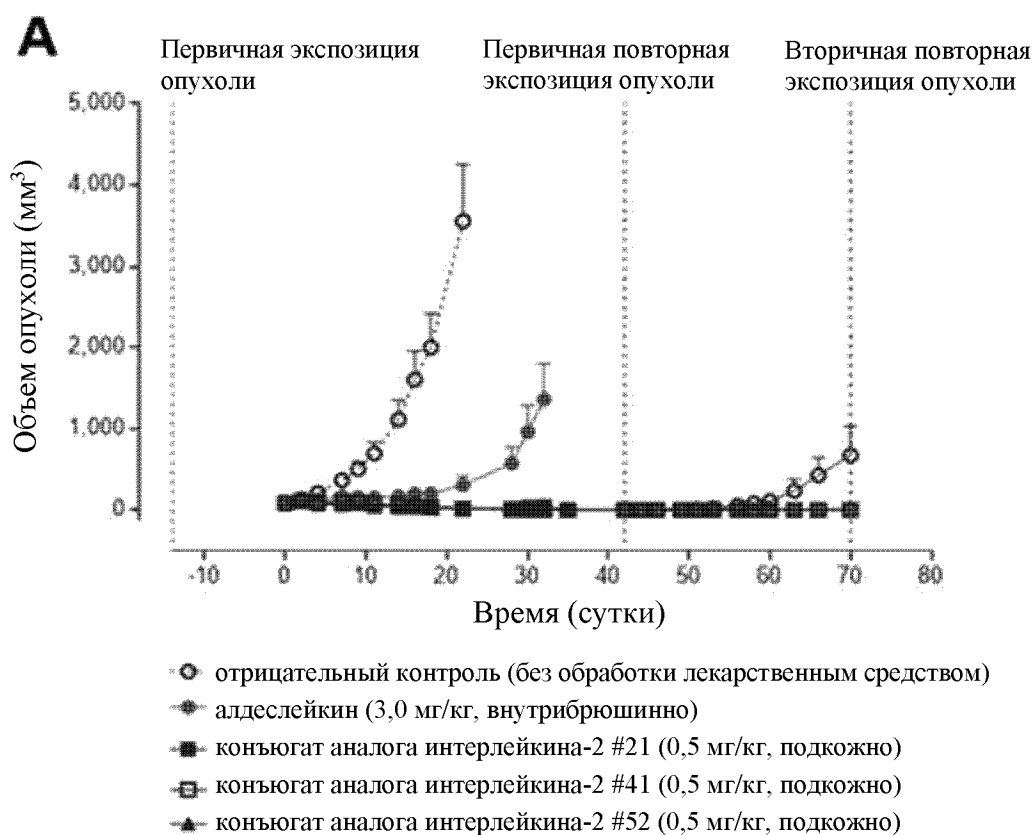


Фиг. 4



- отрицательный контроль (без обработки лекарственным средством)
- алдеслейкин (3,0 мг/кг, внутривенно)
- конъюгат аналога интерлейкина-2 #21 (0,5 мг/кг, подкожно)
- ▤ конъюгат аналога интерлейкина-2 #41 (0,5 мг/кг, подкожно)
- ▲ конъюгат аналога интерлейкина-2 #52 (0,5 мг/кг, подкожно)

Фиг. 5



Фиг. 6

